



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES
EN MOSTOS DE AGAVE Y TEQUILAS POR FIA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LUCERO MATILDE CASTAÑEDA PONCE



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE : Profesor: Humberto Ramón Gómez Ruíz

VOCAL : Profesor: Víctor Manuel Ugalde Saldivar

SECRETARIO: Profesora: Bertha Julieta Sandoval Guillén

1er. SUPLENTE: Profesora: Inés Miranda Martínez

2°. SUPLENTE: Profesora: Lucía Hernández Garciadiego

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Química. UNAM.
Departamento de Química Analítica DEPg. Laboratorio 108.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruíz

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Lucía Hernández Garciadiego.

SUSTENTANTE:

Lucero Matilde Castañeda Ponce.

Agradecimiento

En primer lugar quiero dedicar esta tesis a mi mamá, ya que sin su apoyo invaluable nada de esto hubiera sido posible. Gracias por estar conmigo y por darme los recursos para concretar este pequeño sueño que es ser Química de alimentos; gracias a ti también hermanito por estar cuidando de nosotras y a pesar de todo, saben que los quiero y son fundamentales en mi vida.

A ustedes mis cuatro loquitos pegajosos, sin su amor el mundo no sería lo mismo.

Gracias a mi tía Diana por estar al pendiente de mí, a pesar de que casi no nos vemos, sabes que ocupas un lugar muy especial en mi corazón.

Gracias a todos mis amigos por haber estado junto a mí durante todo este tiempo, en especial a mis amigas Griselda y Aly, no sé qué haría sin unas hermanas postizas como ustedes, las quiero.

A la profesora Lucía y al profesor Humberto, les quiero agradecer por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio 108 y transmitirme tantos conocimientos que estoy segura serán de mucha utilidad en un futuro muy próximo.

Quiero agradecer a mi jurado de tesis, profesor Humberto, Víctor y profesora Julieta, por haberme apoyado en las correcciones de mi trabajo de tesis.

Gracias a Dios por darme una familia en especial por mi mamá que es la mejor persona que me pudo haber educado y guiado.

Un especial agradecimiento al Consejo Regulador del Tequila por proporcionar las muestras de mostos de agave y tequilas utilizadas en el presente trabajo.

Introducción.

El tequila es una bebida alcohólica cuya elaboración comprende la selección y jima de las piñas de agave, cocción (hidrólisis de azúcares complejos), molienda para la obtención de mostos (jugos ricos en azúcares), fermentación (hasta alcanzar un contenido alcohólico entre 13-15% [mosto muerto]) y finalmente la bidestilación, obteniéndose el tequila blanco. A partir del tequila blanco se obtienen distintas clases de tequilas añejados mediante dos procesos. El primero, es el añejamiento del tequila blanco en barricas de roble o encino por un periodo determinado. El segundo llamado "abocado" consiste en la adición de productos como caramelos, colorantes, esencias de roble o encino al tequila blanco y su posterior añejamiento en barricas de roble o encino. Dependiendo el tiempo de añejamiento se obtiene tequila reposado, añejo, extra añejo.

La determinación de azúcares presentes en mostos de agave es uno de los aspectos más importantes durante la elaboración del tequila, ya que a partir de éste se puede calcular el rendimiento teórico de etanol que se obtendrá después de la fermentación y por consecuencia se puede controlar la producción de tequila 100% agave.

Por otra parte, es importante conocer el contenido de azúcares presentes en los distintos tipos de tequila, ya que éste puede proporcionar información acerca del tratamiento por cual fue obtenido un tequila madurado.

En México la determinación de azúcares se realiza de acuerdo a la NMX-V-006-2005. Donde se utiliza el método volumétrico Lane-Eynon, que se fundamenta en la reducción del tartrato de cobre (II) a óxido cuproso (precipitado color rojo) en medio alcalino por acción de una disolución de azúcares reductores; para que se lleve a cabo la reacción es necesario tener la disolución del tartrato de cobre a temperatura de ebullición, la adición del indicador redox, debe ser cercana al punto de equivalencia, de no ser así el azúcar lo reducirá antes que al cobre presente. Lo cual significa que la determinación exacta y con precisión se dificulta.

La introducción de métodos automatizados al análisis rutinario ha sido de gran ventaja ya que se obtienen resultados confiables en el menor tiempo posible. En el presente trabajo se propone la determinación de fructosa por un método FIA en mostos de agave y tequila, utilizando la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en medio alcalino. Se realizó el estudio para caracterizar el sistema con glucosa y fructosa, ya que son los azúcares presentes mayoritariamente en el agave. Para la cuantificación de glucosa se utilizó una metodología que consiste en la determinación enzimática de glucosa por un método FIA.

Con los métodos establecidos se obtuvo el intervalo lineal, los límites de detección y cuantificación para cada azúcar. Con base en la composición de las muestras se propusieron como interferentes al etanol en tequilas y el color en los mostos. El método se aplicó al análisis de muestras de tequila y mostos de *agave tequilana Weber variedad azul*.

Objetivo general.

- Proponer un método para llevar a cabo la determinación de azúcares en mostos de agave y tequila.

Objetivos particulares.

- Obtener las condiciones óptimas para llevar a cabo las cuantificaciones.
- Evaluar los posibles interferentes presentes en las muestras de estudio.
- Determinar la concentración de fructosa y glucosa en las muestras de mosto.
- Determinar la concentración de fructosa y glucosa en muestras de tequilas.

Índice

Portada.	i
Agradecimientos.	iii
Introducción.	v
Objetivos.	vii
Índice.	viii
Capítulo 1. Antecedentes.	
1.1. Tequila.	1
1.1.1. Elaboración del tequila.	1
1.1.2. Clasificación del tequila.	3
1.1.3. Clases de tequila.	4
1.2 Azúcares presentes en el <i>agave tequilana Weber variedad azul</i>.	5
1.3 Análisis por inyección en flujo. FIA. (Flowinjectionanalysis).	8
1.3.1. Fundamentos del análisis por inyección en flujo.	8
1.3.2. Principios del FIA.	9
1.3.3. Configuración FIA.	10
1.3.4. Factor de dispersión.	13
1.3.4.1. Dispersión debida al volumen de Inyección.	14
1.3.4.2. Dispersión debida al transporte.	15
1.3.4.3. Dispersión debida al sistema de detección.	17
1.4. Enzimas	18
1.4.1. Uso de las enzimas en la química analítica.	18
1.4.1.1. Utilización de enzimas en sistemas FIA.	19
1.4.2. Inmovilización de enzimas.	20
1.4.2.1. Clasificación de las técnicas de inmovilización de enzimas.	20
1.4.2.1.1. Métodos físicos.	21
1.4.2.1.2. Métodos químicos.	22
1.4.2.3. Efecto de la inmovilización en la actividad enzimática.	24
1.5. Métodos para la determinación de azúcares.	25
1.5.1. Métodos espectroscópicos.	25
1.5.2. Métodos cromatográficos.	26
1.5.2.1. Cromatografía de líquidos.	27
1.5.2.2. Cromatografía de gases.	27
1.5.3. Determinación de azúcares reductores, según la NMX-V-006- 2005.	28
	29

1.5.4 Determinación de azúcares reductores con la reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).	
1.5.5. Determinación de glucosa utilizando la enzima glucosa oxidasa.	32
Capítulo 2. Desarrollo experimental.	
Desarrollo experimental.	33
Equipo y material.	34
Reactivos y disolventes.	35
2.1. Determinación de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.	36
2.1.1. Disoluciones.	36
2.1.2. Configuración.	37
2.1.2.1. Influencia de la temperatura en la reacción.	37
2.1.3. Sensibilidad del método en la determinación de glucosa y fructosa.	38
2.1.4. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.	38
2.2. Determinación enzimática de glucosa.	38
2.2.1. Disoluciones.	38
2.2.1.1. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa.	38
2.2.1.2. Determinación enzimática de glucosa.	39
2.2.2. Inmovilización de glucosa oxidasa.	40
2.2.2.1. Limpieza del vidrio.	40
2.2.2.2. Silanización.	40
2.2.2.3. Acoplamiento con glutaraldehído.	41
2.2.2.4 Unión de la enzima.	41
2.2.3. Configuración.	42
2.2.3.1. Optimización del flujo.	43
2.2.4. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.	43
2.3. Aplicación de la metodología propuesta al análisis de muestras de tequilas y mostos de agave.	43
2.3.1. Evaluación del etanol como interferente en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.	43
2.3.2. Hidrólisis ácida.	44
2.3.3. Determinación de fructosa y glucosa en mostos de agave.	44
2.3.3.1. Determinación de fructosa en mostos de agave.	44
2.3.3.1.1. Evaluación del color de las muestras como interferente.	45

2.3.3.2. Determinación de glucosa en mostos de agave.	45
2.3.4. Determinación de fructosa y glucosa en muestras de tequila.	45
2.3.4.1. Cuantificación de fructosa en muestras de tequila.	45
2.3.4.1.1. Determinación del efecto de la matriz sobre la cuantificación de fructosa.	45
2.3.4.2. Determinación de glucosa en muestras de tequila.	46
Capítulo 3. Resultados y análisis.	
3.1. Determinación de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.	47
3.1.1. Influencia de la temperatura en la reacción.	47
3.1.1.1. El reactor sumergido en un baño de agua a 85°C.	47
3.1.1.2. El reactor sumergido en un baño de agua en ebullición a 92°C.	48
3.1.1.3. El reactor en el horno para columna Hot-pocket a 85°C.	50
3.1.2. Sensibilidad del método en la determinación de glucosa y fructosa.	53
3.1.2.1. Longitud de onda de detección.	55
3.1.2.2. Adición de la sal de Rochelle al reactivo del DNS.	59
3.1.3. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.	64
3.2. Determinación enzimática de glucosa.	67
3.2.1. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa.	67
3.2.2. Optimización del flujo.	68
3.2.3. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.	71
3.3. Aplicación de la metodología propuesta al análisis de muestras de tequilas y mostos de agave.	74
3.3.1. Evaluación del etanol como interferente en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.	76
3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en muestras de mostos de agave.	78
3.3.2.1. Evaluación del color de los mostos como interferente sobre la señal en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.	78

3.3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en las muestras de tequila.	78
3.3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en las muestras de tequila.	78
3.3.3. Determinación de fructosa y glucosa en muestras de tequila.	88
3.3.3.1. Evaluación del efecto de la matriz en muestras de tequila.	88
3.3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en las muestras de tequila.	92
Conclusiones.	98
Bibliografía.	100
Apéndice A.	105
Apéndice B.	120

Capítulo 1. Antecedentes.

1.1. Tequila. [1, 2]

El tequila es una bebida alcohólica elaborada a partir de la fermentación y destilación del mosto obtenido del *agave tequilana Weber variedad azul*, que es producida dentro de ciertas regiones específicas en México.



Figura 1.1. Territorio de denominación de origen. Comprende todos los municipios del estado de Jalisco, es decir 125, 8 municipios de Nayarit , 7 municipios de Guanajuato, 30 municipios de Michoacán y 11 municipios de Tamaulipas .

El agave tequilero, es una planta que pertenece a la familia de las agaváceas, de hojas largas, fibrosas, en forma lanceolada, y color verde azulado. Para la elaboración del tequila se utiliza la piña o cabeza, ya que es rica en azúcares.

1.1.1. Elaboración del tequila.

Debido a su gran tradición, actualmente el tequila es elaborado de la misma manera que lo hacían nuestros antepasados, pero con algunas modificaciones debidas al desarrollo tecnológico. El proceso de la elaboración del tequila comprende:

Selección de las plantas de agave: aproximadamente a los 10 años, la planta alcanza su plena madurez; es decir, es capaz aportar una mayor cantidad de azúcares para la producción de los mostos, y está lista para la jima.

Jima: consiste en cortar las hojas de la planta al ras de la base, para dejar únicamente la cabeza o corazón de agave.

Cocción: la cabeza del agave se somete al proceso de cocción con vapor de agua a presión, ya sea en los tradicionales hornos de mampostería (durante 48 horas) o en autoclaves (durante 12 horas). La finalidad de esta etapa es convertir los fructanos (azúcares del agave) en moléculas menos complejas como la fructosa, glucosa y sacarosa, las cuales son fáciles de fermentar.

Molienda: el agave cocido es transportado a molinos donde se corta en pequeños pedazos. Para la extracción de las mieles de agave se aplica agua a presión al bagazo y se exprime. Las mieles extraídas del agave cocido también llamadas mostos, son captadas en depósitos y transportadas por tuberías a las tinas de formulación o de fermentación, según sea el caso.

Fermentación del mosto: La fermentación se lleva a cabo en grandes tinas de acero inoxidable, las cuales son cargadas con los mostos. A estos se les adicionan levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación. El tiempo de fermentación varía de acuerdo con la temperatura ambiental. Los productos de esta fermentación son: alcohol, CO₂, H₂O y energía (en forma de calor). El mosto en fermentación es efervescente, el movimiento cesa cuando las levaduras han terminado de fermentar los azúcares y el contenido alcohólico es de 13.5 - 15 % v/v, ya que la *S. cerevisiae* sólo es capaz de resistir hasta esta concentración de etanol, en ese momento finaliza el proceso y se acostumbra decir que el mosto está muerto.

Bidestilación: Mediante calor el mosto fermentado es separado en productos de riqueza alcohólica (tequila) y vinazas; estas últimas constituyen un producto de desecho, al igual que otros subproductos del inicio y final de la destilación conocidos como “cabezas y colas”, respectivamente.

En la elaboración del tequila son necesarias dos destilaciones, la primera llamada destripamiento y la segunda, rectificación. Al tequila que se recibe del destripamiento se le llama “tequila ordinario”. Con la rectificación se incrementa

la riqueza alcohólica y se eliminan compuestos indeseables, obteniendo un producto de mayor pureza, que es considerado como “tequila blanco”.

Maduración: La maduración del tequila tiene como objetivo transformar lentamente el producto, permitiéndole adquirir características sensoriales adicionales, por medio de procesos fisicoquímicos que tienen lugar durante su permanencia en recipientes de madera de roble o encino.

A partir del tequila blanco se puede obtener tequilas reposados o madurados por medio de dos procesos. El primero, es el añejamiento en barricas de roble o encino por un periodo mínimo de 3 meses (el tiempo depende del tipo de tequila). El segundo llamado "abocado" consiste en la adición de uno o más de los siguientes ingredientes para suavizar el sabor del tequila: color caramelo, extracto de roble o encino natural, glicerina y jarabe a base de azúcar. Finalmente su reposo en barricas de roble o encino.

1.1.2. Clasificación del tequila.

De acuerdo al porcentaje de los azúcares provenientes del agave que se utilice en la elaboración del tequila, éste se puede clasificar en una de las siguientes categorías:

- **Tequila 100 % agave:** Es el producto que no es susceptible de ser enriquecido en la fermentación con otros azúcares distintos a los obtenidos del agave *tequilana Weber variedad azul* cultivado en el territorio comprendido en la denominación de origen (D.O.). Para que este producto sea considerado como “Tequila 100 % de agave” debe ser embotellado en una planta ubicada dentro del territorio comprendido en la declaración.
- **Tequila:** Es aquel producto en el que los mostos son susceptibles de ser enriquecidos y mezclados con otros azúcares previo a ser fermentado. Las mieles de agave (mínimo 51 %) se mezclan con un preparado de otras mieles, azúcar estándar, piloncillo, glucosa, fructuosa, melaza, etcétera, en una proporción no mayor al 49 %.

1.1.3. Clases de tequila. [1, 2]

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación, el Tequila se clasifica en:

- **Tequila blanco.** Producto cuyo contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.
- **Tequila joven u oro.** Producto susceptible de ser abocado, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de Tequila blanco con Tequilas reposados y/o añejos y/o extra añejo, se considera como Tequila joven u oro.
- **Tequila reposado.** Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble o encino. Su contenido alcohólico comercial debe ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de tequila reposado con tequilas añejos o extra añejos, se considera como tequila reposado.
- **Tequila añejo.** Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de tequila añejo con tequila extra añejo se considera como Tequila añejo.
- **Tequila extra añejo.** Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres años, sin especificar el tiempo de maduración en la etiqueta, en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe ajustarse con agua de dilución.

1.2. Azúcares presentes en el *agave tequilana Weber variedad azul*. [3, 4, 5]

Los azúcares presentes en el agave tequilero, se conocen como fructanos. Los fructanos están presentes en distintas especies vegetales como son: la cebolla (1 al 5 % del peso en base húmeda), el ajo (4 a 12 %), plátano (0.2 %), en raíz de achicoria (15 a 20 %). Esta última es la materia prima más utilizada para la extracción industrial de fructanos.

En la naturaleza se pueden encontrar 5 diferentes grupos de fructanos, cuyas diferencias radican en el tipo de enlace entre las unidades de fructosa y la posición de la glucosa en la estructura. Estos grupos consisten en:

Inulinas: Son cadenas lineales de fructosa con enlaces β (2-1); a esta cadena se une una molécula de sacarosa por el extremo de la fructosa con un enlace β (2-1). La estructura de las inulinas se muestra en la **figura 1.2**.

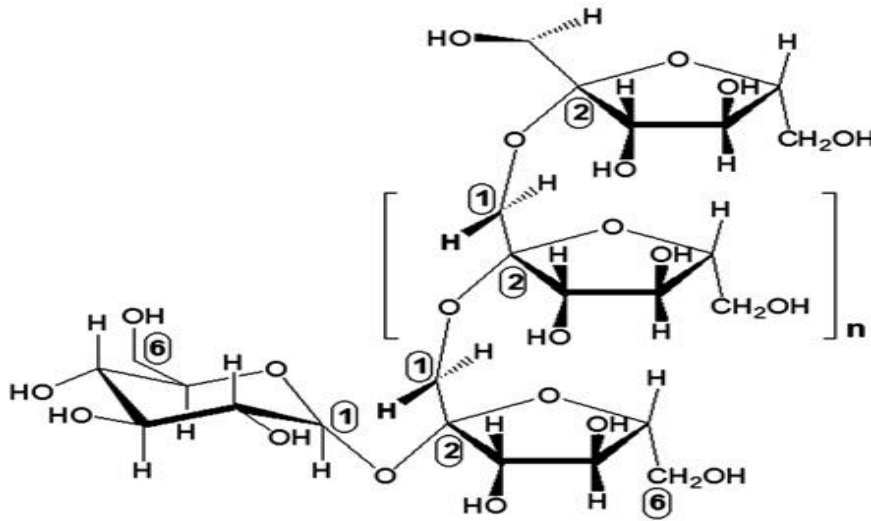


Figura 1.2. Estructura de las inulinas.

Neoseries de inulinas: constituidas por dos cadenas de fructosa unidas con enlaces β (2-1), unidas a una molécula de sacarosa; una de las cadenas está unida al extremo de glucosa con un enlace β (2-6), y la otra cadena está unida con un enlace β (2-1) al extremo de fructosa. La estructura de las neoseries de inulinas se muestra en la **figura 1.3**.

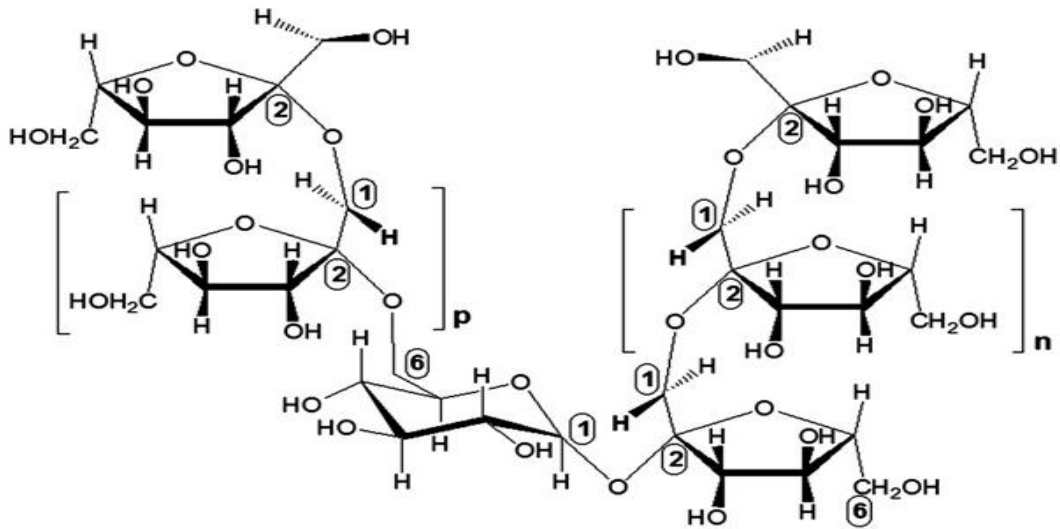


Figura 1.3. Estructura de las neoseries de inulinas.

Levanos: Formados por cadenas lineales de fructosa con enlaces β (2-6), a esta cadena se une una molécula de sacarosa por el extremo de fructosa con un enlace β (2-6). La estructura de los levanos se muestra en la **figura 1.4**.

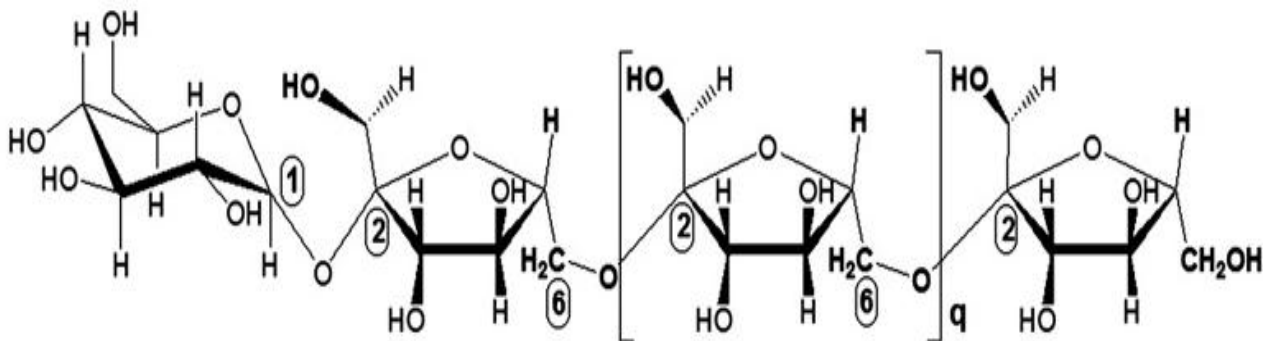


Figura 1.4. Estructura de los levanos.

Neoseries de levanos: constituidas de dos cadenas de fructosa unidas con enlaces β (2-6), una de las cadenas está unida a una molécula de sacarosa, por el extremo de glucosa con un enlace β (2-6), y la otra cadena está unida con un enlace β (2-6) al extremo de fructosa. La estructura de las neoseries de levanos se muestra en la **figura 1.5**.

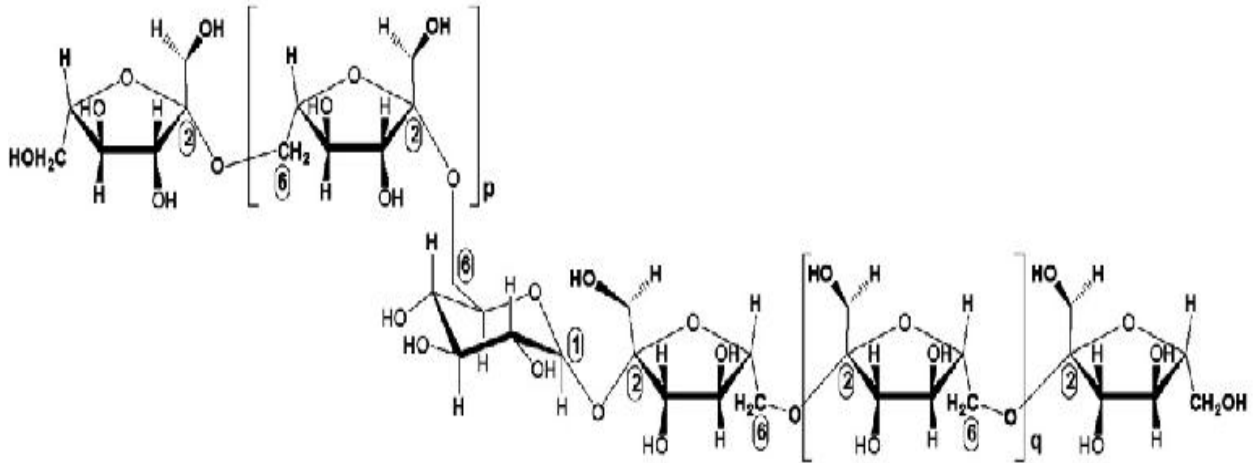


Figura 1.5. Estructura de las neoseris de levanos.

Mezcla de grupos fructanos: Los enlaces que unen a las moléculas de fructosa pueden ser β (2-1) o β (2-6). Por lo que los fructanos de este grupo pueden estar ramificados, la glucosa presente en la molécula puede ser o no igual a las presentes en las neo series (unida a dos cadenas de fructosa). La estructura de las mezclas de grupos fructanos se muestra en la **figura 1.6**.

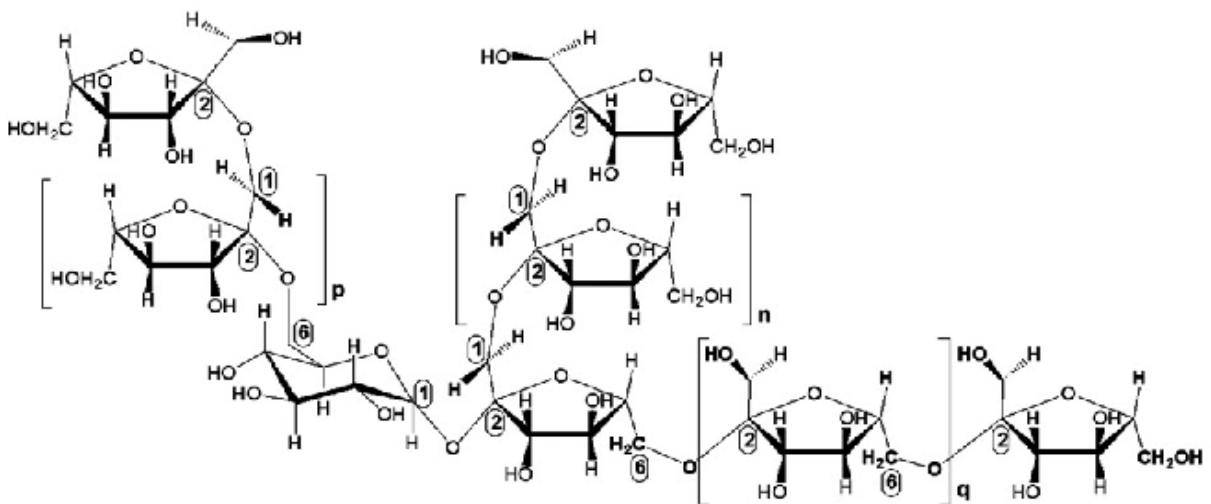


Figura 1.6. Estructura de las mezclas de grupos fructanos.

De acuerdo a estudios recientes, se ha observado que los fructanos presentes en la planta de *A. tequilana* Weber variedad azul consisten en una mezcla compleja, misma que contiene cadenas de fructosa altamente ramificados y neo series de fructanos.

1.3 Análisis por inyección en flujo FIA (Flow injection analysis). [6, 7, 8, 9]

La necesidad de ampliar el campo de aplicación de los métodos analíticos y adaptarlos a las crecientes demandas de la sociedad, han provocado la automatización de los mismos. El incremento en la automatización ha dado como resultado una notable mejora en las características analíticas básicas, tales como la sensibilidad, selectividad, precisión y rapidez, así como una mayor diversidad en el campo de aplicación y una notable disminución de costos. Los métodos automáticos pueden ser discretos o continuos. Entre los métodos de análisis en continuo se encuentran el análisis por flujo segmentado (SFA por sus siglas en inglés), y el análisis por inyección en flujo (FIA por sus siglas en inglés).

1.3.1. Fundamentos del análisis por inyección en flujo.

El análisis por inyección en flujo se basa en la inyección de una muestra líquida dentro de un flujo continuo de una solución portadora. La muestra inyectada es transportada a través del sistema donde se puede o no llevar a cabo una reacción, hasta llegar al detector que registra continuamente la señal producida por la muestra, mientras pasa a través de una celda de flujo.

Por tratarse de un sistema de flujo continuo, cada inyección genera una señal transiente en un gráfico de señal contra tiempo conocida como fiagrama. La señal observada por el detector durante el paso de la muestra dispersada tiene la forma de un pico. Las características de un fiagrama se representan en la **figura 1.7:**

- a) **La altura de pico (h)**, que se relaciona con la concentración del analito a determinar.
- b) **El tiempo de residencia (T)**, está definido como el tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza una señal máxima. El tiempo de aparición (t_a) es el tiempo que pasa desde la inyección hasta que inicia la señal (aumento de 1-2 % de la línea base). La diferencia entre ambos es t' ($t' = T - t_a$), que normalmente es muy pequeño.
- c) **El tiempo de retorno (T')**, es el tiempo comprendido entre el momento que se alcanza el máximo en la señal hasta que regresa a la línea base.

- d) **El ancho del pico o tiempo durante el cual aparece la señal (Δt)**, se define como el intervalo de tiempo en el cual la señal empieza a salir hasta que vuelve a la línea base. El ancho del pico es una medida de la dispersión del analito.

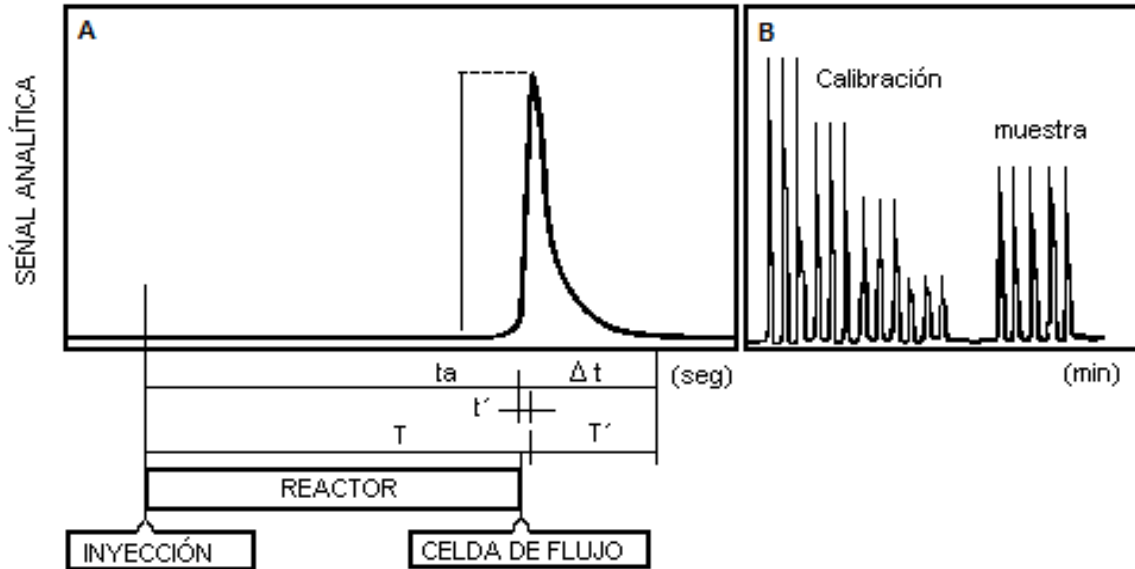


Figura 1.7. Características del fiagrama. A) Se observa la forma de la señal obtenida por el detector y los parámetros más importantes de esta señal. **B)** Se observa el gráfico de señal contra tiempo, mejor conocido como “fiagrama”, un registro típico de un equipo FIA con cuatro puntos de una curva de calibración inyectados por triplicado y una muestra inyectada por quintuplicado.

1.3.2. Principios del FIA.

La técnica FIA está sustentado en la combinación de los siguientes principios:

- Flujo continuo no segmentado.
- La muestra se inserta o inyecta directamente en el flujo.
- El bolo inyectado es acarreado a través del sistema. Durante este transporte puede ocurrir un proceso fisicoquímico, una reacción, diálisis, extracción líquido-líquido, etcétera.
- La dispersión del analito es controlada a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema de transporte.
- Reproducibilidad en el tiempo, desde la inyección hasta el detector.
- No es necesario que las reacciones lleguen al equilibrio cuando se registra la señal.
- Análisis secuencial de las muestras.

1.3.3. Configuración FIA

La configuración FIA más simple consiste de:

- Sistema de bombeo.
- Sistema de inyección.
- Sistema de transporte y reacción.
- Sistema de detección.

En la **figura 1.8** se muestra un esquema general de configuración FIA.

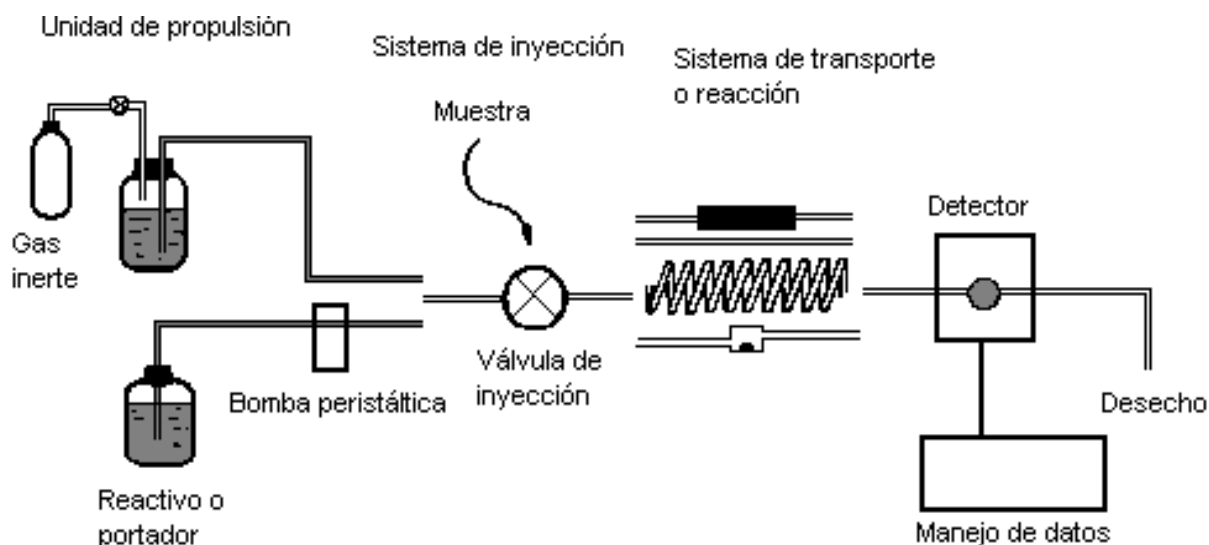


Figura 1.8. Esquema de los componentes que constituyen un sistema FIA.

1.3.3.1. Sistema de bombeo.

Se trata de bombas peristálticas o de jeringa para transportar las disoluciones a través de los tubos estrechos que constituyen la configuración FIA. El flujo que proporcione al sistema debe ser constante, con objeto de que el tiempo de residencia de la muestra en el reactor y la dispersión sean reproducibles.

1.3.3.2. Sistema de Inyección.

La válvula de inyección es el dispositivo utilizado para introducir un volumen definido de muestra dentro del flujo de manera reproducible y sin producir una perturbación dentro del mismo. El sistema de inyección más comúnmente utilizado es la válvula de inyección, como se observa en la **figura 1.9**, consta de

6 puertos y 3 canales que están unidos concéntricamente para tener 3 entradas y 3 salidas, pudiendo tomar 2 posiciones: una de llenado y otra de inyección. El volumen de la muestra es controlado con “loops” o bucles, cuyo volumen puede variar dentro de un amplio intervalo. El intervalo de volumen frecuentemente utilizado en FIA es de 50 -200 μL .

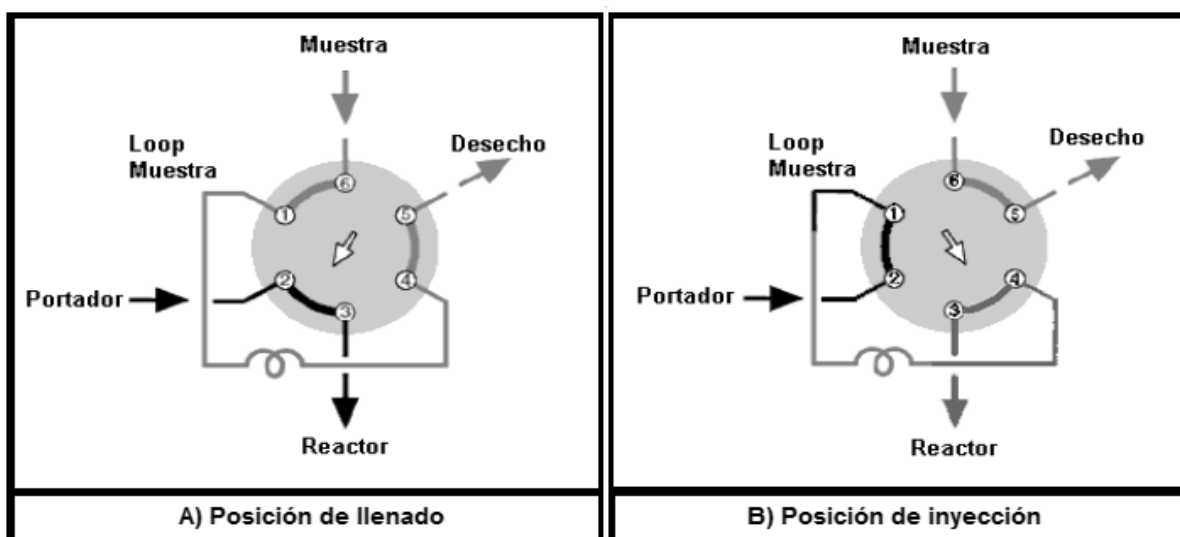


Figura 1.9. Esquema general de la válvula de inyección de seis puertos. **A)** Posición de llenado. **B)** Posición de inyección.

1.3.3.3. Sistema de transporte y reacción.

La principal función del sistema de transporte y reacción es trasladar la corriente del fluido o muestra a lo largo de todo el sistema hasta llegar al detector, permitiendo que la reacción en caso de haberla, ocurra en su interior en la porción adecuada. Está constituido por una serie de tubos, conectores y reactores, de diferentes formas según sea requerido. Los tubos están fabricados a partir de materiales químicamente inertes, capaces de soportar cambios bruscos de temperatura, comúnmente se utiliza teflón, polietileno y polipropileno. La unión de los tubos entre sí y con diversas partes del sistema se realiza mediante conectores. La distancia entre los extremos de ambos tubos con el conector debe ser lo más pequeña posible, con el propósito de no producir volúmenes muertos.

Los reactores son unidades en el sistema de transporte que actúan sobre el tiempo de residencia y el perfil del bolo de la muestra de tal manera que a su

paso por la unidad de detección éste posea las características adecuadas para la detección. Existen distintos tipos de reactores:

- **Tubos abiertos:** son tubos rectos de diámetro y longitud variable, que se encuentran situados entre el sistema de inyección y el de detección.
- **Tubos enrollados “serpentes”:** Estos tubos están enrollados helicoidalmente al diámetro deseado. La longitud del tubo está en función del tiempo de residencia requerido para promover el mezclado más adecuado entre el portador, reactivo y muestra. El diámetro del serpentín modifica la dispersión de la muestra, “entre mayor es el diámetro del serpentín mayor será la dispersión”.
- **Reactores empacados:** Están constituidos por un tubo relleno por un material inerte, como los empacados con pequeñas esferas de vidrio ó con material químicamente activo, tales como resinas de intercambio iónico, enzimas inmovilizadas, entre otros.
- **Cámaras de mezclado:** Son utilizadas cuando se requiere una mayor homogenización de la muestra y reactivo. Por lo general se utiliza cuando el detector es de tipo electroquímico y/o cuando la diferencia de viscosidad, gravedad específica o temperatura, entre el portador y la muestra es muy grande.

El sistema de transporte y reacción, también puede ser utilizado con otros propósitos como llevar a cabo un pre tratamiento en la muestra: concentración del analito, diálisis, extracción, reacciones enzimáticas, eliminación de interferentes entre otros.

1.3.3.4. Sistema de detección.

Permite que las señales producidas por el analito sean registradas y traducidas mientras éste pasa a través del sistema de detección. Existen sistemas de detección no destructivos de la muestra como son los espectroscópicos (fotométricos y fluorimétricos), detectores electroquímicos (potencio-métricos y amperométricos), y destructivos como ejemplo encontramos a los de espectroscopia atómica.

Es importante mencionar que dependiendo la geometría y las características del sistema FIA la intensidad de cada señal debida al analito de interés, se verá afectada por un fenómeno físico denominado el factor de dispersión.

1.3.4. Factor de dispersión. [10, 11, 12]

Cuando se inyecta una muestra homogénea de concentración (C^0) en un sistema FIA, se forma una zona de dispersión. La dispersión depende del tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra, misma que al ser transportada se va diluyendo en la fase portadora, hasta su lectura en el detector. La señal se deforma y se registra como un gradiente de concentraciones con una concentración máxima (C_{max}). Como se muestra en la **figura 1.10**

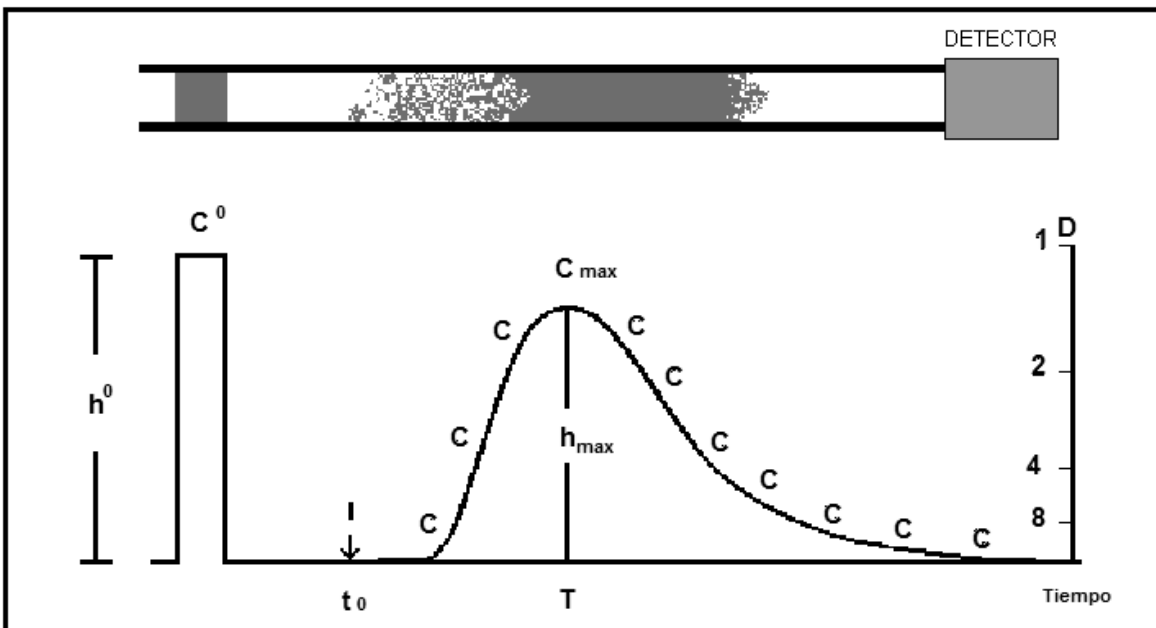


Figura 1.10. Gradiente de concentración provocado por la difusión de la muestra en la disolución portadora.

El primer parámetro utilizado para caracterizar el paso de la muestra por el sistema fue el coeficiente de dispersión **D**, definido como la relación entre la concentración de la muestra antes y después de la dispersión, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$D_{max} = \frac{C^0}{C_{max}}$$

El coeficiente D depende de la geometría del sistema de transporte, flujo y volumen inyectado. El coeficiente de dispersión considera sólo la dispersión física y no está relacionado con la reactividad química. Si la lectura analítica está basada en la medición de la altura máxima del pico, la concentración que le corresponde es h_{max} , por tanto la dispersión máxima está dada por:

$$D_{max} = \frac{h^o}{h_{max}}$$

Si el valor de $1 \leq D < 3$ la dispersión es limitada, media si $3 \leq D < 10$ y alta si $D \geq 10$.

La dispersión total dentro del sistema FIA se considera una suma de las dispersiones originadas en tres partes principales del sistema.

$$D = D_{inyección} + D_{transporte} + D_{detector}$$

Donde:

$D_{inyección}$: Es la dispersión debida al volumen de muestra inyectado y a los aspectos geométricos del sistema de inyección.

$D_{transporte}$: Es la contribución más importante a la dispersión total, ya que considera la dispersión debida a la geometría del reactor y a la velocidad de flujo.

$D_{detector}$: Es la dispersión debida a la geometría de la celda de flujo.

1.3.4.1. Dispersión debida al volumen de Inyección, ($D_{inyección}$).

La dispersión es inversamente proporcional al volumen de muestra inyectado, cuando el volumen inyectado es muy grande la señal obtenida es máxima y corresponde a la concentración original de la muestra, por lo tanto, la dispersión disminuye y puede alcanzar el valor de $D=1$, como se muestra en la **figura 1.11**. De igual manera se puede observar que el tiempo de arranque (t_a) no varía en función del volumen inyectado, el tiempo de residencia (T) y el ancho de la señal (Δt) aumentan conforme aumenta el volumen inyectado.

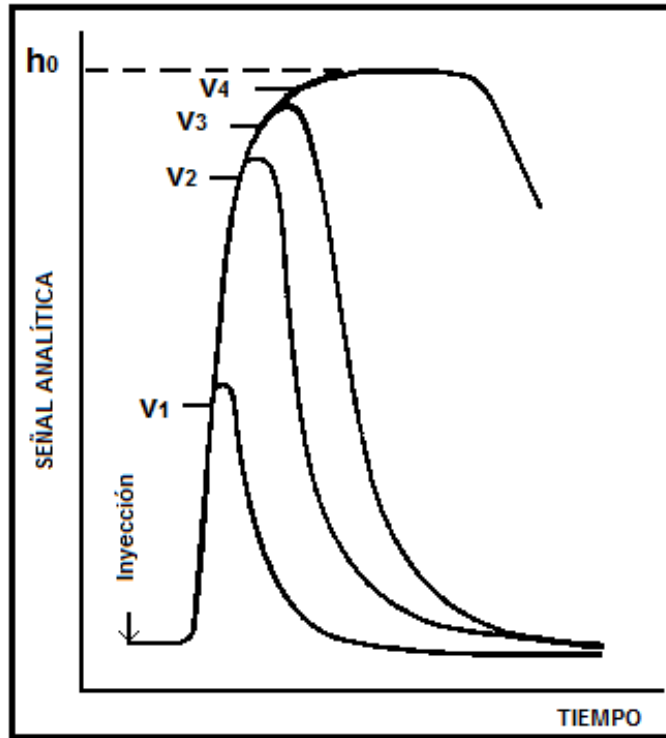


Figura 1.11. Influencia del volumen de inyección sobre la dispersión en FIA. ($V1 < V2 < V3 < V4$).

Es importante hacer notar que T y Δt afectan directamente a la frecuencia de muestreo, ya que a mayores valores de T y Δt , es menor el número de inyecciones que se pueden realizar por unidad de tiempo.

1.3.4.2. Dispersión debida al transporte, ($D_{\text{transporte}}$).

Variación del flujo: El flujo de un bolo inyectado está relacionado directamente con el tiempo de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$q = \frac{V}{t}$$

Donde q es el flujo (mL/min), V el volumen (cm^3 , mL, etcétera.) y t el tiempo (minutos, segundos, etcétera).

De la ecuación anterior se deduce que si aumenta el flujo, el tiempo de arranque (t_a), el tiempo de residencia (T) y el ancho de la señal (Δt) disminuyen. Cuando se mantiene constante el volumen inyectado, la altura

de la señal (h_{\max}) aumenta si el flujo es mayor, por lo tanto, el coeficiente de dispersión disminuye, como se muestra en la **figura 1.12**.

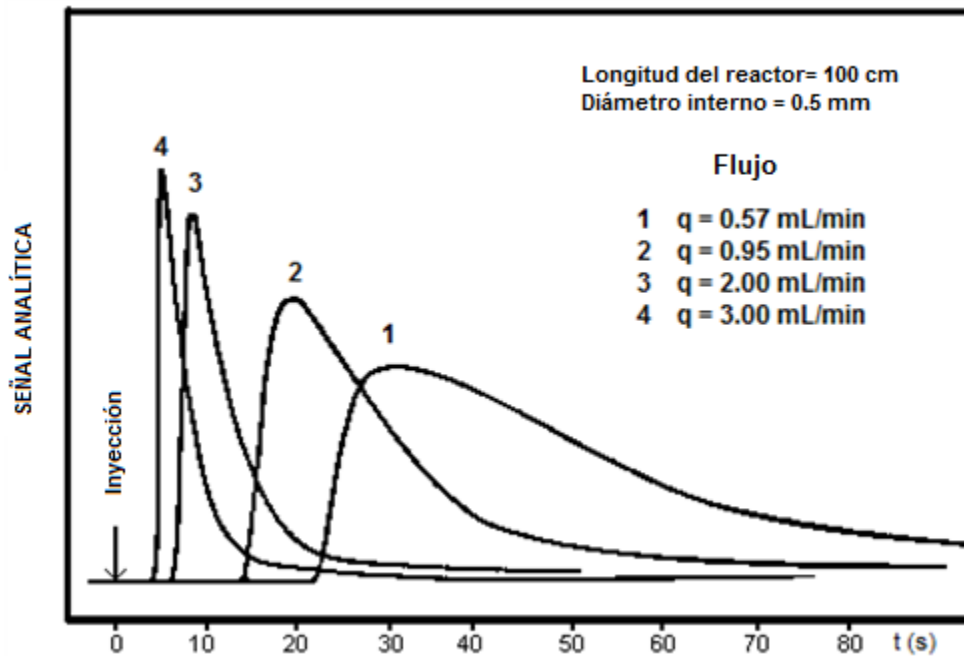


Figura 1.12. Influencia del flujo sobre la dispersión en FIA. ($q_1 < q_2 < q_3 < q_4$).

Factores geométricos: La gran diversidad de reactores y sus características individuales como son la longitud, el diámetro del tubo y el diámetro del serpentín influyen de manera diferente a la dispersión de la muestras.

Como se observar en la **figura 1.13.A**, al mantener el flujo y el diámetro del tubo constantes, a medida que aumenta la longitud del reactor, aumenta t_a y Δt , pero disminuye la altura de la señal, por lo tanto, la dispersión aumenta. Cuando el flujo y la longitud del reactor se mantienen constantes, a medida que aumenta el diámetro del tubo, aumenta la dispersión, el tiempo de arranque y el ancho del pico, como se muestra en la **figura 1.13.B**.

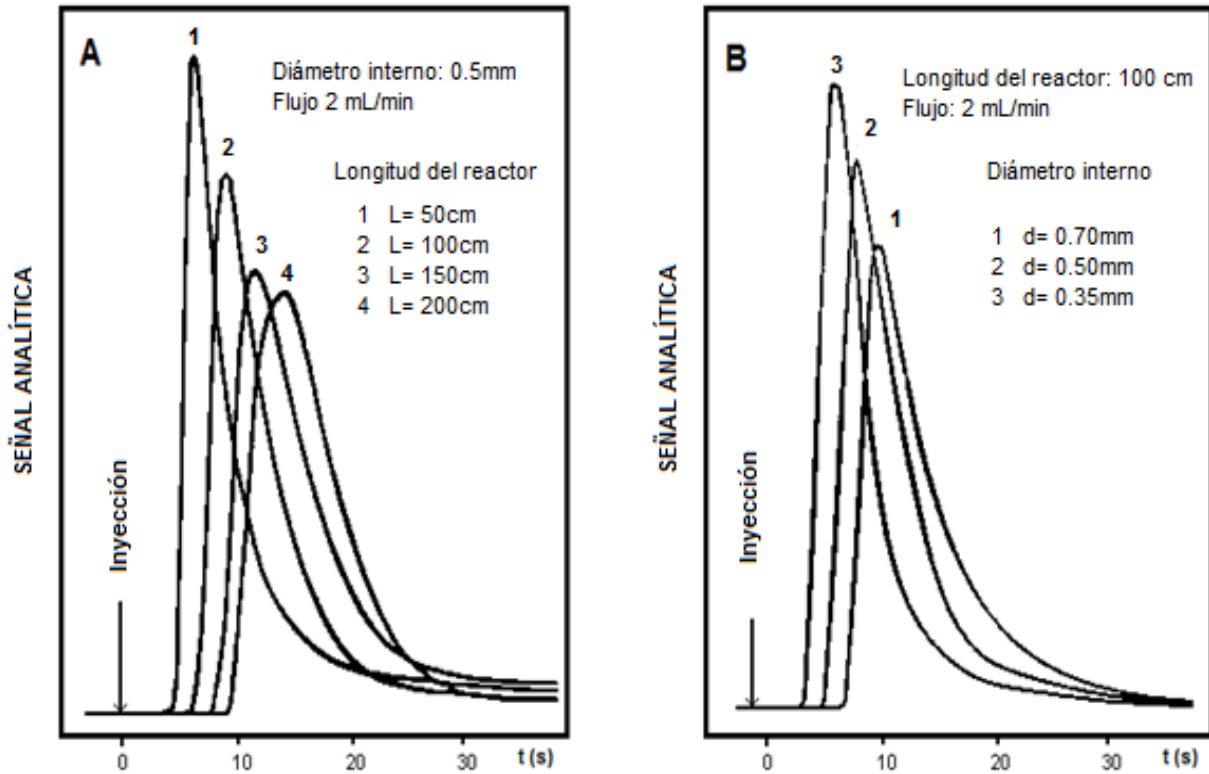


Figura 1.13. Influencia de la geometría del reactor sobre la dispersión en FIA. **A)** Longitud del reactor. **B)** Diámetro interno del reactor.

1.3.4.3. Dispersión debida al sistema de detección, (D_{detector}).

Es la contribución de la dispersión provocada por la geometría del detector. Para que el bolo de muestra inyectado sufra la menor dispersión en el momento de la detección, se buscará que la celda de flujo del detector tenga un volumen interno pequeño.

1.4. Enzimas. [13]

Las enzimas son catalizadores biológicos que llevan a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad. Todas las enzimas son proteínas con estructura tridimensional globular y sólo logran ser activas cuando los polipéptidos desarrollan una conformación que permite establecer su centro activo. Debido a su naturaleza química, a las enzimas les afectan los mismos factores que alteran a las proteínas; por esta razón, para poderlas utilizar en forma óptima requieren ciertas condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, etcétera. La acción de temperaturas extremas (altas o bajas), de disolventes y agentes químicos, condiciones drásticas de pH y fuerza iónica, producen la desnaturalización de la enzima, lo que origina que ésta pierda su actividad.

De acuerdo al tipo de reacción que catalizan las enzimas se clasifican en seis grandes grupos:

1. **Oxidorreductasas:** Catalizan reacciones de óxido reducción.
2. **Transferasas:** promueven transferencias de distintos grupos químicos.
3. **Hidrolasas:** llevan a cabo la ruptura de enlaces químicos con la introducción de una molécula de agua.
4. **Liasas:** rompen los enlaces sin la participación de agua.
5. **Isomerarsas:** catalizan las isomerizaciones de distintos compuestos.
6. **Ligasas:** promueven la unión de dos moléculas por mediación de ATP o de un compuesto similar.

1.4.1. Uso de las enzimas en la química analítica.

La utilización de enzimas como reactivos analíticos ha representado en el campo de la química analítica una herramienta valiosa para la determinación cuantitativa de analitos. Debido a su gran actividad catalítica y alta especificidad hacia un sustrato, las reacciones catalizadas por enzimas presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores no biológicos convencionales.

Para que las enzimas sean utilizadas en métodos analíticos, deben cumplir con dos características fundamentales:

- **Selectividad:** Es la capacidad de la enzima para reaccionar únicamente con el analito a determinar, aún en presencia de otros compuestos.
- **Sensibilidad:** Es la capacidad de la enzima para reconocer al analito en concentraciones muy bajas.

Cuando se utiliza a una enzima (E) como un reactivo químico sobre un sustrato (S), la concentración de éste puede ser determinada por la formación de un producto (P) o por la derivatización de éste y la formación de una especie química con las propiedades necesarias dependiendo el tipo de detector utilizado. La concentración del sustrato también puede determinarse por cambios en el pH, concentración de O₂ o la disminución de la concentración de un cofactor necesario para llevar a cabo la reacción, entre otras.

1.4.1.1. Utilización de enzimas en sistemas FIA. [14]

La combinación de la técnica de inyección en flujo con los métodos enzimáticos de análisis, ha producido soluciones útiles a un gran número de problemas pues resulta muy ventajoso aprovechar la velocidad y simplicidad del FIA con la selectividad de métodos enzimáticos. Las enzimas dentro de un sistema FIA pueden ser utilizadas con distintos fines como:

- Catalizadores: en una gran variedad de sustratos y diversidad de muestras.
- Para la determinación de actividad enzimática.
- Para eliminar interferencias.

Existen dos maneras de introducir enzimas dentro de un sistema FIA:

- **Enzimas en disolución:** ya sea por aspiración como disolución portadora o por administración continua en la celda de flujo a través de una membrana permeable.
- **Enzimas inmovilizadas:** generalmente se utilizan en reactores (columnas empacadas, o enzimas inmovilizadas dentro de las paredes del reactor) a través de los cuales pasa el sustrato. Estos

reactores pueden localizarse dentro del sistema FIA, en el bucle de la válvula de inyección o en el sistema de transporte. Las enzimas también pueden ser inmovilizadas en la celda de flujo colocada en el detector.

Los altos costos de obtención (debidos principalmente a los procesos de purificación), su inestabilidad en disoluciones acuosas, y la nula posibilidad de recuperar la enzima después de ser utilizada, representan obstáculos para su utilización sistemática. Una de las alternativas para abatir estas desventajas es la utilización de enzimas inmovilizadas.

1.4.2. Inmovilización de enzimas. [15, 16, 17]

La inmovilización enzimática puede ser definida como el atrapamiento de una molécula de enzima en una fase insoluble en agua, generalmente de alto peso molecular, que permite un intercambio entre ambas fases. El proceso de inmovilización enzimática generalmente se acompaña de un aumento en la estabilidad de la enzima, y la posible reutilización de la misma; permitiendo el desarrollo de reactores en continuo, que funcionan durante largos periodos de tiempo, sin necesidad de renovar el catalizador.

1.4.2.1. Clasificación de las técnicas de inmovilización de enzimas.

En general, los métodos de inmovilización se clasifican en dos grandes categorías, métodos físicos y métodos químicos:

Tabla 1.1. Clasificación de métodos de inmovilización enzimática.

Clasificación	Ejemplos
Métodos físicos	Adsorción física. Atrapamiento y oclusión. Microencapsulación.
Métodos químicos	Enlace covalente. Co-reticulado. Reticulado puro.

1.4.2.1.1. Métodos físicos.

Son los métodos más antiguos de inmovilización enzimática. Consisten en la adsorción o el atrapamiento de una enzima en una matriz o soporte insoluble en agua, que no involucra uniones covalentes enzima-matriz.

Adsorción física: Consiste en adsorber a la enzima dentro de una matriz polimérica sin formar enlaces covalentes. Es muy fácil de llevar a cabo, ya que el adsorbente se pone en contacto con la enzima y se agitan juntos por algún tiempo. El rendimiento (enzima unida al adsorbente) es bajo, y la enzima, a menudo es parcial o totalmente inactivada. Las interacciones entre el adsorbente y la enzima pueden ser: fuerzas iónicas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waal's. Puesto que este tipo de inmovilización es de naturaleza reversible, la enzima se puede desorber de la matriz después de un tiempo. Algunos factores que pueden provocar la desorción de la enzima son: el pH, la temperatura y la fuerza iónica; pero todos ellos son controlables.

Atrapamiento y oclusión: Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, comúnmente está constituida por pre-polímeros foto entrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato, poliuretano. El atrapamiento de una molécula de enzima puede llevarse a cabo de las siguientes maneras:

- Inclusión dentro de la matriz de un polímero altamente entrecruzado.
- Separándolo del medio por una micro cápsula semipermeable
- Disolviéndolo en una fase no acuosa distinta.

Los dos primeros métodos, se caracterizan por no tener a la enzima unida a la matriz, por lo tanto no existen problemas estéricos debidos a enlaces covalentes o interacciones electrostáticas, de tal forma que el sitio activo de la enzima no se encuentra obstruido por una porción de la

matriz. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una disolución del monómero, posteriormente se inicia la polimerización por un cambio de condiciones en el medio o por la adición de reactivos químicos.

Microencapsulación: Consiste en rodear a las enzimas con una membrana semipermeable que permita el paso del sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser sintetizadas por polimerización interfacial (permanentes) o generadas por surfactantes (también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, su tamaño oscila entre 1 y 100 μm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, permitiendo que se lleven a cabo reacciones que suceden en múltiples pasos.

1.4.2.1.2. Métodos químicos.

Probablemente son los métodos de inmovilización enzimática más utilizados. Involucran la formación de al menos un enlace covalente (irreversible) entre la enzima y los grupos reactivos del soporte. Los grupos funcionales de la enzima que intervienen en este tipo de enlaces pueden ser de tipo amino, carboxilo, tiol, hidroxilo. Dentro de los métodos químicos para inmovilizar enzimas podemos encontrar: formación de enlace covalente, co-reticulado y reticulado puro entre otros.

Enlace covalente: Consiste en la activación de grupos funcionales del soporte, mismos que se hacen reaccionar con los nucleófilos de las proteínas, preferentemente de aminoácidos distintos a los presentes en el sitio activo de la enzima. De los 20 aminoácidos diferentes presentes en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son: lisina, cisteína, histidina y tirosina. En menor medida son utilizados la metionina, triptófano, arginina, ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica debido a su carácter

hidrófobo. En la **tabla 1.2** se resumen las ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas por enlace covalente.

Tabla1.2: Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas por enlace covalente.

Ventajas	Desventajas
<ol style="list-style-type: none"> 1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla. 2. Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empacados, de lecho fluidizado o en un tanques con agitación. 3. Presentan mayor resistencia a la desnaturalización de la enzima debidas a cambios de temperatura o de pH, y presencia disolventes orgánicos, ya que su estructura terciaria es más estable. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos. 2. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo de la enzima. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.

El proceso para unir una enzima a un soporte por enlace covalente generalmente consta de tres pasos:

- Activación del soporte.
- Acoplamiento de la enzima.
- Lavado del exceso de enzima.

Reticulado puro o entrecruzamiento: Consiste en la formación de uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima y reactivos bifuncionales. Como reactivos bi o multifuncionales encontramos: el glutaraldehído (base de Schiff), derivados de isocianato (enlace peptídico), entre otros. Como resultado del reticulado se tienen enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

1.4.2.3. Efecto de la inmovilización en la actividad enzimática. [18]

La estabilidad de una enzima en disolución está determinada por su estructura intrínseca, mientras que la estabilidad de una enzima inmovilizada depende en gran manera de diversos factores como:

- La interacción de la enzima con la matriz en que va a ser inmovilizada.
- La posición en la que queda unida la enzima a la matriz.
- El número de enlaces entre la enzima y la matriz.
- La facilidad de la enzima para realizar cambios conformacionales unida en la matriz.
- El microambiente que rodea a la enzima.
- Las propiedades físicas y químicas de la matriz.
- Las propiedades del espaciador (por ejemplo, cargado o neutro, hidrofílico o hidrofóbico, tamaño y largo) que une a las moléculas de enzima con la matriz.
- Las condiciones en que se inmovilizó la enzima.

Las enzimas se pueden ver modificadas al momento de la inmovilización en propiedades como la actividad enzimática, el pH óptimo y la constante de Michaelis Menten. La estabilidad de la enzima inmovilizada puede aumentar o disminuir con respecto a la enzima en disolución dependiendo del material del soporte, la enzima misma y el tipo de interacción enzima-soporte.

1.5. Métodos para la determinación de azúcares.

El análisis de azúcares es un aspecto crucial en la química de los carbohidratos, no solo por la importancia económica de algunos azúcares como son la glucosa, fructosa y sacarosa en la industria de los alimentos, sino por su gran variedad y complejidad. Para llevar a cabo estas determinaciones, se han desarrollado un gran número de métodos utilizando diversas técnicas analíticas (espectrofotométricas, cromatográficas, volumétricas, entre otras).

1.5.1. Métodos Espectroscópicos. [19 - 27]

Los azúcares no exhiben características de absorción en el espectro de ultravioleta ni en el visible, a pesar de esto, la espectrofotometría ultra violeta-visible (UV-vis) constituye una de las técnicas más utilizadas en la determinación de éstos. Para que los azúcares adquieran las características necesarias y puedan ser detectados, deben de pasar por un tratamiento de derivatización, el cual consiste en introducir un grupo que genere una señal capaz de ser traducida por el detector.

Entre las reacciones más utilizadas para la determinación de azúcares por la formación de un complejo colorido, destaca el método conocido como fenol sulfúrico. Este método es útil para el análisis de monosacáridos y polisacáridos, debido a que estos últimos son hidrolizados por acción del ácido concentrado y la liberación de calor al disolverse en agua el ácido sulfúrico, obtenido los monosacáridos correspondientes, mismos que se degradan por acción del medio y producen furfural, que a su vez reacciona con un compuesto fenólico y forma un derivado colorido, de esta manera los azúcares pueden ser cuantificados y en algunas ocasiones hasta identificados. A partir del método del fenol sulfúrico, se han desarrollado una gran diversidad de métodos basados en éste. En la **tabla 1.3** se muestran algunos ejemplos y sus características.

Tabla 1.3 Formación de compuestos coloridos a partir del furfural en medio ácido.

Reacción	Reactivo	Características
Mollish	α -naftol, H ₂ SO ₄	Muy sensible. Positiva para todos los azúcares.
Selivanoff	Resorcinol, HCl	Positiva para cetosas
Tollens	Floroglucinol, HCl	Positiva en galactosa, pentosas y ácidos glucorónicos.
Antrona	Antrona, H ₂ SO ₄	Muy sensible y cuantitativa. Positiva para todos los azúcares.

En gran medida los métodos espectrofotométricos han sido desarrollados con el fin de llevar a cabo una derivatización de los azúcares y posteriormente ser analizados por cromatografía de líquidos. En la **tabla 1.4** se muestran algunos ejemplos de reacciones para la derivatización de azúcares.

Tabla 1.4. Métodos de derivatización para el análisis de azúcares por cromatografía de líquidos

Método	Especificidad	Referencia
Benzoilación	Todos los azúcares.	[22,,23]
Reacción con etilendimina	Azúcares reductores.	[21]
Formación de dansil-hidrazonas	Azúcares reductores.	[24,25]
Reacción con 2-ciano acetamida	Todas las aldosas reductoras.	[26, 27]

1.5.2. Métodos cromatográficos.

Tanto la cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés), como la cromatografía de líquidos (LC por sus siglas en inglés), han sido ampliamente utilizadas en el análisis de carbohidratos, pero durante los últimos años se ha preferido utilizar LC, ya que dependiendo el tipo de detector acoplado es o no necesario realizar una derivatización en las muestras.

1.5.2.1. Cromatografía de Líquidos.[28, 29, 30]

La técnica cromatográfica más utilizada para la separación de carbohidratos y polioles hoy en día es la cromatografía de alta eficiencia de intercambio aniónico (HPAEC por sus siglas en inglés). Esta técnica se fundamenta en el comportamiento de los carbohidratos como ácidos débiles en medio básico, que forman aniones capaces de interactuar con la resina intercambiadora de aniones. Debido a que el fenómeno de mutarrotación ocurre de manera rápida en medio básico, las formas anoméricas de cada azúcar no son resueltas y cada carbohidrato genera un solo pico. Para llevar a cabo la detección el sistema cromatográfico debe estar acoplado a detectores tales el de pulso amperométrico (PAD por sus siglas en inglés), índice de refracción (RID por sus siglas en inglés), y dispersión de luz tras evaporación (ELCD por sus siglas en inglés). Se aplica en la determinación de monosacáridos (glucosa, fructosa, xilosa etcétera), disacáridos (maltosa, sacarosa, etcétera.) y azúcares más complejos tales como inulinas y otros polisacáridos.

1.5.2.2. Cromatografía de Gases [31, 32, 33]

En el caso de la cromatografía de gases es indispensable realizar un pretratamiento de derivatización debido a que los azúcares no son compuestos volátiles, y para realizar un análisis por GC es necesario volatilizar las muestras. Una de las técnicas de derivatización más ampliamente utilizada es la aminación reductiva que consiste en la formación de una base de Schiff y su reducción a la amina secundaria correspondiente. Para llevarla a cabo los azúcares son disueltos en una mezcla de dimetilsulfóxido y ácido acético para promover la apertura del anillo, la muestra se trata con la amina y un agente reductor, tales como dimetil aminaborano, entre otros, La mezcla es calentada a temperaturas superiores a los 100 °C por varias horas. Las condiciones óptimas de trabajo dependen de la amina utilizada. Los derivados obtenidos por esta técnica pueden ser analizados por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Estos

derivados también pueden ser analizados por HPLC acoplado a detectores de fluorescencia, Ultra violeta, PAD, entre otros.

1.5.3. Determinación de azúcares reductores, según la NMX-V-006- 2005.

[34, 35]

En México la determinación oficial de azúcares en bebidas alcohólicas, se lleva a cabo como indica la Norma Mexicana **NMX-V-006- 2005**. De acuerdo a ésta, la determinación de azúcares reductores se lleva a cabo con el método volumétrico Lane-Eynon. Se fundamenta, en la reducción de una disolución de tartrato de cobre (II) en medio alcalino a óxido cuproso (precipitado color rojo), por acción de una disolución de azúcares reductores (su poder reductor es debido al grupo carbonilo libre que tienen en su molécula).

Experimentalmente para que la determinación se lleve a cabo es indispensable:

- Tener la disolución de tartrato de cobre (II) a temperatura de ebullición.
- Para distinguir el punto de equivalencia es necesario utilizar azul de metileno como indicador redox, mismo que debe ser adicionado cerca del punto de equivalencia, de no ser así reaccionará primero que el cobre con los azúcares antes de llegar al punto final de la titulación.

Para llevar a cabo una titulación exitosa, también es importante tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- El tiempo total para hacer la titulación no debe exceder 3 minutos, de los cuales 2 minutos son para agregar casi la totalidad de la disolución de azúcar y 1 minuto más para agregar el indicador y concluir dicha titulación.
- La titulación de los azúcares se debe realizar un mínimo de dos veces tomando en cuenta, que si la diferencia en el volumen gastado es mayor de $\pm 0,1$ mL en la misma muestra, es necesario confirmar el volumen gastado con una tercera titulación.
- Cuando se titulan azúcares reductores, la presencia de sacarosa interfiere en el título obtenido según su concentración.

La reacción que se produce entre el cobre y los azúcares reductores, no es estequiométrica, por lo que es necesario el cálculo del factor Fehling para los diferentes azúcares. Como ejemplo se muestra en la **tabla 1.5** los gramos de distintos azúcares necesarios para reducir 100 mL de disolución de tartrato de cobre (II) 0.14 M.

Tabla 1.5. Método Lane-Eynon. Comparación de azúcares.

Azúcar	Gramos de azúcar utilizados
Dextrosa	0.4753
Sacarosa	0.4941
Fructosa	0.5144
Lactosa	0.6757
Maltosa	0.7788

La reacción entre el cobre y los azúcares puede tener variaciones debidas al tiempo de calentamiento, temperatura de ebullición, concentración y tipo del azúcar, tipo de tartrato (L, D, o meso), tiempo de contacto con el aire. Sin embargo, en condiciones estandarizadas el cobre reducido es proporcional a la concentración del azúcar en las muestras.

1.5.4 Determinación de azúcares reductores con la reacción del ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS). [36, 37, 38]

En el presente trabajo se determinó el contenido de azúcares reductores en tequilas y mostos integrando la reacción de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico a una configuración FIA. A continuación se realiza una breve descripción de este método.

En 1924 Summer y Noback determinaron azúcares reductores utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico. La reacción se fundamenta en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico por acción de azúcares reductores en un medio alcalino y alta temperatura, para formar el ácido 3,5-diaminosalicílico, que absorbe a una longitud de onda $\lambda=540$ nm. Para llevar a cabo la reacción se requieren los reactivos enlistados en la **tabla 1.6**.

Tabla 1.6. Reactivos necesarios para la cuantificación de azúcares reductores con el DNS.

Reactivos	Cantidad	Justificación
NaOH	1 – 0.1 M	Proporciona el medio alcalino para que se lleve a cabo la reacción.
DNS	1 % m/v	Se reduce para formar el cromóforo
Bisulfito de sodio	0.7 %m/v	Evita la inestabilidad del producto después de calentarlo.
Tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle)	30 % m/v	Reduce la concentración de O ₂ en la disolución debido al desplazamiento por efecto salino, previniendo la degradación de los azúcares por acción del oxígeno en medio alcalino. Aumenta el coeficiente de absortividad durante la determinación.
Fenol	0.7 %m/v	No tiene efecto reductor sobre el DNS, pero sirve para incrementar el color debido a la reducción del compuesto
La longitud de onda a la que se llevan a cabo las mediciones es de $\lambda=540$ nm		

En un trabajo previo, se realizó una revisión del método, donde se encontró que para llevar a cabo la reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico por acción de un azúcar reductor únicamente es necesario contar con un medio alcalino (NaOH). Por lo tanto, el fenol, la sal de Rochelle y el bisulfito de sodio no tienen un efecto significativo sobre la reacción.

En la **figura 1.14** se muestra el espectro de absorción del ácido 3,5-diaminosalicílico. Se puede observar que la absorbancia máxima está en 480nm.

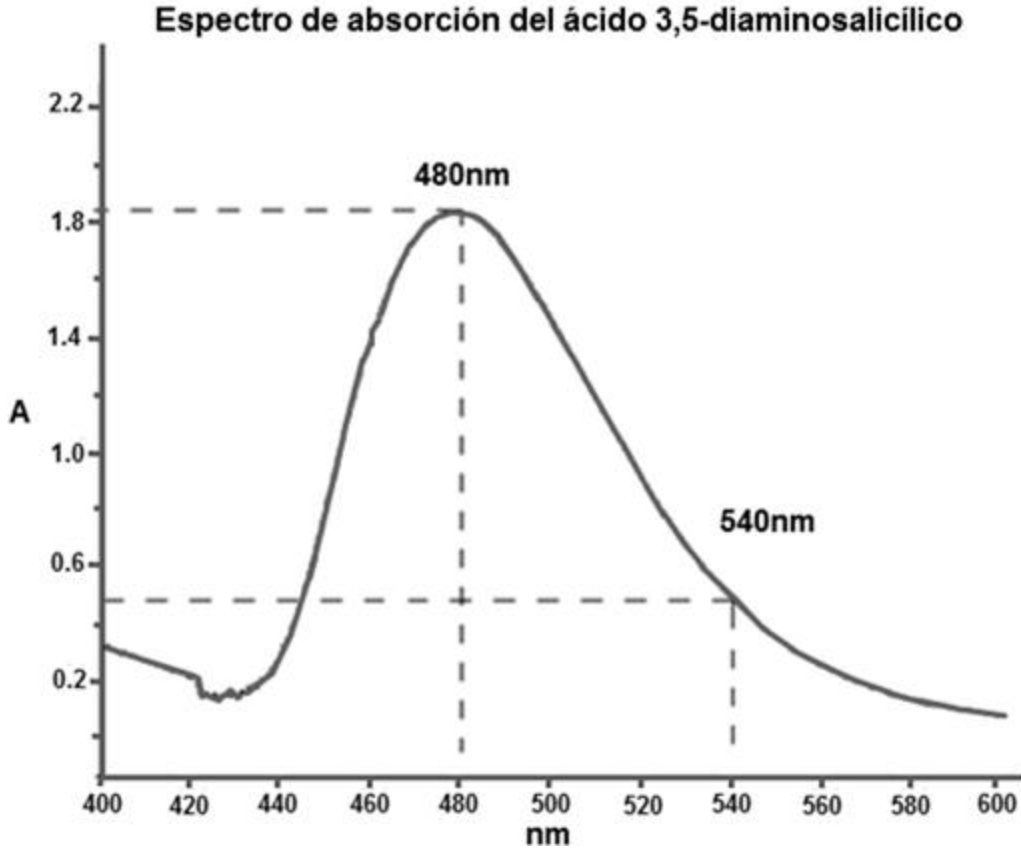


Figura 1.14. Se muestra el espectro de absorción del ácido 3,5-diaminosalicílico. Como se observa el máximo de absorción de este compuesto se encuentra a una longitud de onda de 480 nm.[37]

La reacción entre la glucosa y el DNS involucra a doce electrones intercambiados, donde dos grupos nitro del DNS se reducen hasta aminas, por lo tanto cada grupo nitro intercambia 6 electrones. Como se puede apreciar en la **figura 1.15**, la relación estequiométrica entre el DNS y la glucosa es 1 a 6 y no de 1 a 3.

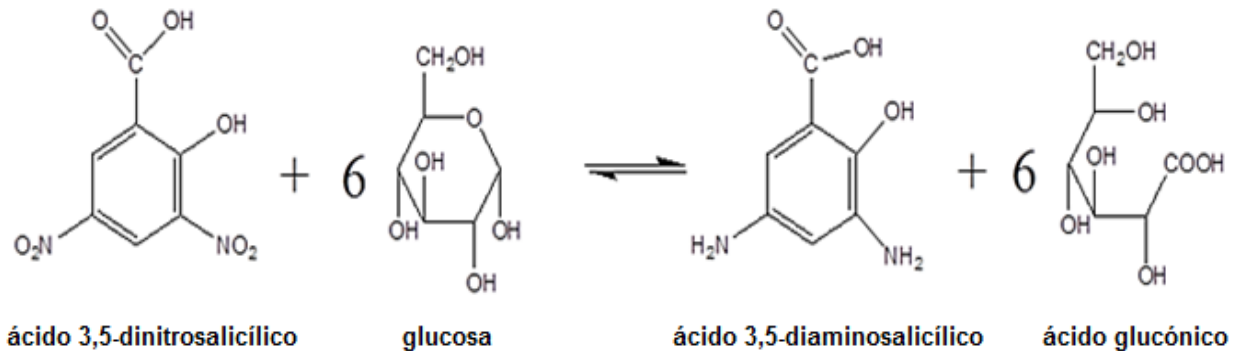


Figura 1.15. Reacción entre el ácido 3,5- dinitrosalicílico y la glucosa.

1.5.5. Determinación de glucosa utilizando la enzima glucosa oxidasa. [39]

El método consiste en la oxidación de la glucosa por vía enzimática utilizando a la enzima glucosa oxidasa para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, éste último reacciona con el ion yoduro para formar I_2 . Debido a que en el medio de reacción el ion yoduro se encuentra en exceso, éste reacciona con el yodo para dar lugar al ión triyoduro, cuya señal a 353 nm es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y ésta a su vez es proporcional a la concentración de glucosa. Las reacciones que se llevan a cabo para la determinación de glucosa se muestran en la **figura 1.16**.

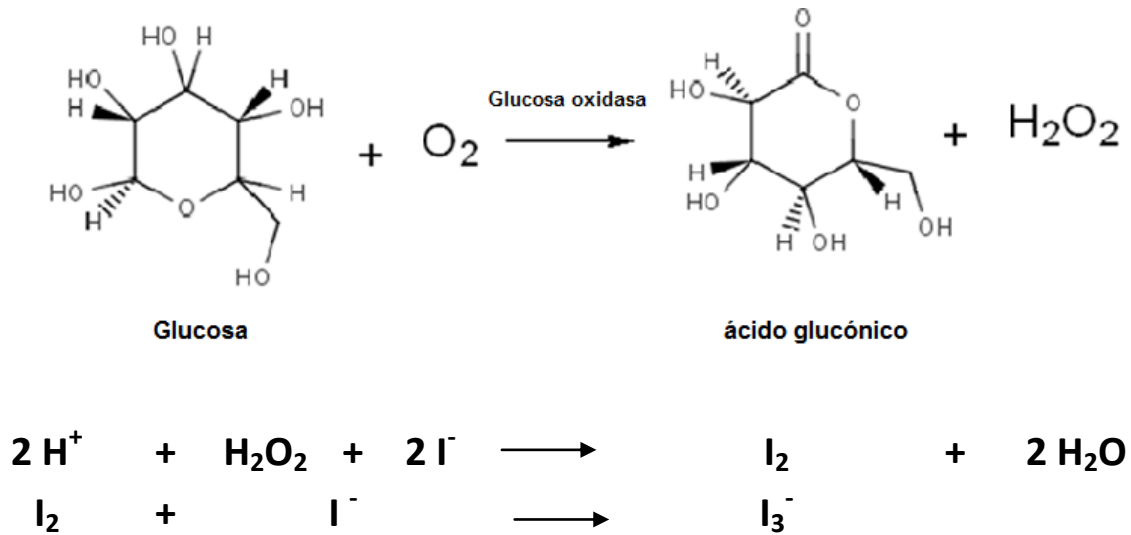


Figura 1.16. Reacciones que se llevan a cabo en la determinación enzimática de glucosa.

Capítulo 2. Desarrollo experimental.

El desarrollo experimental de esta tesis se encuentra dividido en tres partes:

I. Determinación de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

- Influencia de la temperatura en la reacción.
- Sensibilidad del método en la determinación de glucosa y fructosa.
 - Homologación de la señal.
 - Longitud de onda de detección.
 - Adición de la sal de Rochelle al reactivo del DNS.
- Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.

II. Determinación enzimática de glucosa.

- Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa.
- Optimización del flujo.
- Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.

III. Aplicación de la metodología propuesta al análisis de muestras de tequilas y mostos de agave.

- Evaluación del etanol como interferente en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.
- Determinación de fructosa y glucosa en mostos de agave.
 - Determinación de fructosa con el DNS por FIA en mostos de agave.
 - Evaluación de la interferencia debida al color de los mostos.
 - Hidrólisis ácida. Determinación de fructosa directa y total.
 - Determinación enzimática de glucosa en mostos de agave.
 - Hidrólisis ácida. Determinación de glucosa directa y total.
- Determinación de fructosa y glucosa en muestras de tequila.
 - Determinación de fructosa con el DNS por FIA en tequilas.
 - Evaluación del efecto matriz en muestras de tequila
 - Determinación de fructosa directa en tequilas
 - Determinación enzimática de glucosa en mostos de agave.
 - Determinación de glucosa directa en tequilas.

Equipo y material.

- Balanza analítica Ohaus.
- Balanza granataria Ohaus.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible. Lambda 25 Perkin-Elmer Instruments, software UV WINLAB versión 2.85.04 Molecular Spectroscopy.
- Celda de Flujo de cuarzo 5Q, con paso óptico de 1 cm y 80 μ L de volumen interno.
- Horno para columna Hot-pocket 5-85 °C Thermo Scientific.
- Baño de agua marca Colora.
- Baño de agua Lab-line.
- Válvula de inyección manual Rheodyne con loop de 200 μ L.
- Bomba peristáltica de 4 canales Gilson, Minipuls 2.
- pH-metro Digital Benchtop. Cole-Parmer® Modelo 05669-20.
- Electrodo combinado-pH Thermo – Orion 915600.
- Agitador automático de velocidad ajustable spin-master modelo 4803.
- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mL.
- Vasos de precipitados.
- Naves de vidrio para pesar.
- Micropipetas:

Marca	Finnpipette Digital Labsystems		
Volumen	200 - 1000 μ L	1 – 5 mL	2 – 10 mL
No. Serie	B-23625	A-4380	J-84598
Punta	Finntip 60	Finntip 61	Finntip 62

Para la configuración FIA se utilizó:

- Tubo de bomba Tygon color negro-negro (0.030") 0.76 mm de diámetro interno.
- Tubo de bomba Tygon color gris-gris (0.035") 0.89 mm de diámetro interno.
- Tubo de teflón 1/16" diámetro interno.
- Tubo de teflón de 0.7 mm de diámetro interno.
- Conectores.

Reactivos y disolventes.

Todos los reactivos utilizados son grado analítico.

Nombre	Fórmula	Marca	PM (g/mol)	Lote
Dextrosa anhidra	$C_6H_{12}O_6$	J.T.Baker	180.16	40139
Fructosa	$C_6H_{12}O_6$	Sigma	180.16	125H0567
Ácido 3,5dinitro salicílico (DNS)	$C_7H_4N_2O_7$	Sigma	228.12	94H5007
Tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle)	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	Técnica Química	282.23	S/N
Hidróxido de sodio	NaOH	Sigma	40	67H15601
Etanol	CH_3CH_2OH	J.T.Baker	46	Y23C37
Ácido nítrico	HNO_3	Merck	63.01	011519
Ácido clorhídrico	HCl	J.T.Baker	36.46	H17C35
3-aminopropil trietoxisilano 98%	$H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	Aldrich Chemical	221.37	04414JZ
Glutaraldehído 25% (p/v)	$C_5H_8O_2$	Aldrich	100.12	02913PZ
Biftalato de potasio	1-KOCOC ₆ H ₄ -2-COOH	Químicos Monterrey	204.22	005188
Fosfato dibásico de potasio	K_2HPO_4	Mallinckrodt	174.18	7080
Yoduro de potasio	KI	Químicos Monterrey	166	R231
Heptamolibdato de aminio. Tetrahidratado	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	J.T.Baker	1235.86	0716-50

- **Enzima Glucosa oxidasa (EC.1.1.3.4).** De *Aspergillus niger*, 6000 U/g sólido. Sigma lote 105H3920.
- **Vidrio de poro controlado (CPG).** Malla 120-200, diámetro de poro promedio 242 Å. Sigma lote 11H0735.

2.1. Determinación de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

[38]

2.1.1. Disoluciones.

Disolución de DNS 4×10^{-3} M en NaOH 0.5 M. Se pesaron 10 g de NaOH y se disolvieron en 300 mL de agua desionizada. Se pesaron aproximadamente y con precisión 0.4562 g de DNS, se disolvieron en la disolución previamente preparada de NaOH, se trasvasó a un matraz volumétrico de 500 mL y se llevó al aforo con agua desionizada.

Disolución de DNS 4×10^{-3} M en NaOH 0.5 M con sal de Rochelle 3 %. Se pesaron 2 g de NaOH y se disolvieron en 50 mL de agua desionizada. Se pesaron aproximadamente y con precisión 0.0972 g de DNS y 3 g de sal de Rochelle, se disolvieron en la disolución previamente preparada de NaOH, se trasvaso a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al aforo con agua desionizada.

Disoluciones de glucosa. Se preparó una disolución madre de glucosa a una concentración de 50 mg/mL en un volumen de 25 mL. A partir de la disolución madre se tomaron alícuotas de 1, 2, 4, 5 y 7.5 mL y se llevaron a 25 mL en matraces volumétricos con agua desionizada, obteniéndose un intervalo de concentración de glucosa de 2-15 mg/mL.

Disoluciones de fructosa. Se preparó una disolución madre de fructosa a una concentración de 50 mg/mL en un volumen de 25mL. A partir de la disolución madre se tomaron alícuotas de 0.5, 1, 1.5, 2.0, 3.0 y 4 mL y se llevaron a 25 mL en matraces volumétricos con agua desionizada, obteniéndose un intervalo de concentración de fructosa de 1-8 mg/mL.

Disoluciones de etanol. A partir de etanol absoluto se tomaron alícuotas de 3.5, 4, 4.5, 5 y 5.5 mL y se llevaron a 10 mL en matraces volumétricos con agua desionizada, obteniéndose un intervalo de concentración de etanol de 35-55 % v/v.

2.1.2. Configuración.

La **figura 2.1** muestra la configuración utilizada para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se inyectan 200 μL de disolución sobre el portador (agua desionizada). La disolución confluye con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, que por acción de los azúcares reductores en medio alcalino (NaOH) se reduce a ácido 3,5-diaminosalicílico en el reactor (**R**) a una temperatura de 85 °C (**T**). El cromóforo absorbe a 480 nm. La altura de la señal (en unidades de absorbancia) es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en la disolución inyectada.

El caudal del portador y del reactivo es de 0.35 mL/min. La longitud del **R** es de 200 cm.

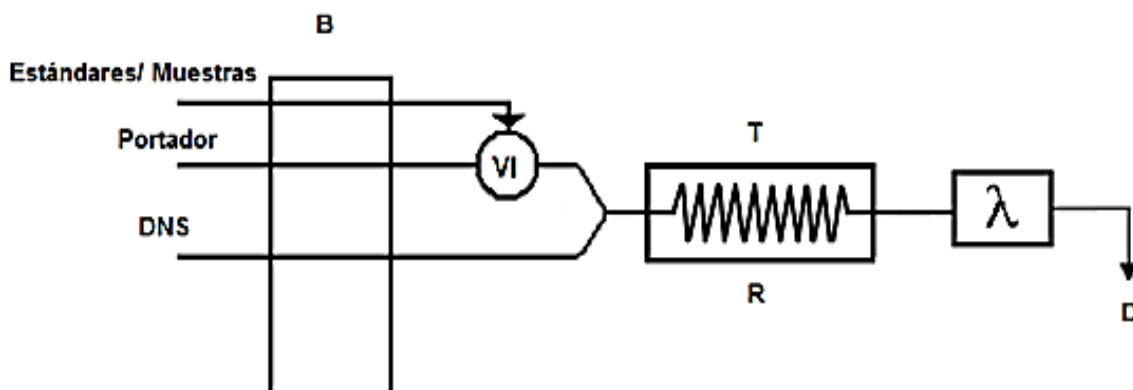


Figura 2.1. Configuración FIA para la determinación de azúcares reductores: **B:** bomba peristáltica (0.35 mL/min); **VI:** válvula de inyección (200 μL); **Portador:** agua desionizada; **DNS:** ácido 3,5-dinitro salicílico; **R:** reactor (200 cm); **T:** Temperatura (85°C); Detector a $\lambda = 480\text{nm}$; **D:** desecho.

2.1.2.1. Influencia de la temperatura en la reacción.

La reacción entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es dependiente de la temperatura. Cuando la determinación se realiza en discreto, el DNS se adiciona a la disolución de azúcares reductores y se coloca en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 15 minutos, a fin de alcanzar el equilibrio.

Una de las características del FIA es que la determinación se realiza en condiciones de no equilibrio, por lo que el control de la temperatura es un factor determinante en la repetibilidad del método, para ello, se realizaron inyecciones de glucosa en las siguientes condiciones:

- El reactor R sumergido en un baño de agua a temperatura termostataada de 85 °C.
- El reactor R sumergido en un baño de agua en ebullición a 92 °C.
- El reactor R en el horno para columna Hot-pocket a 85 °C.

2.1.3. Sensibilidad del método en la determinación de glucosa y fructosa.

Se inyectaron disoluciones de glucosa y fructosa en la configuración descrita en la **sección 2.1.2**, observándose que la señal de fructosa es significativamente mayor a la señal de la glucosa. A fin de homologar la señal para ambos azúcares, se experimentaron las siguientes modificaciones al método, basadas en el método original:

- Detección a 480 y 540 nm.
- Preparación del reactivo DNS con sal de Rochelle al 3 % (p/v).

2.1.4. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se inyectaron disoluciones estándar de fructosa en la configuración descrita en la **sección 2.1.2**. Se construyeron las curvas de calibración de cada azúcar ($A=f(\text{concentración})$), tomando como valor de absorbancia la altura de cada pico en el fiagrama obtenido.

A partir de las curvas de calibración se estableció el intervalo lineal de concentraciones de cada azúcar y se evaluaron los límites de detección y cuantificación de acuerdo al método descrito en el **apéndice B**.

2.2. Determinación enzimática de glucosa. [39]

2.2.1. Disoluciones.

2.2.1.1. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa.

Disolución de ácido nítrico al 5 %. A partir del ácido nítrico concentrado, se tomó una alícuota de 7.7 mL y se adicionó cuidadosamente a una

probeta con 80 mL de agua desionizada, se llevó a un volumen final de 100 mL.

Disolución silanizante. 3-aminopropil trietoxisilano 98 %.

Disolución entrecruzante. Glutaraldehído 25 % p/v.

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6. Se pesaron aproximadamente y con precisión 0.6800 g de fosfato monobásico de potasio, se disolvió y trasvaso cuantitativamente con agua desionizada a un matraz aforado de 50 mL, se llevó al aforo. El pH de la disolución se ajustó con NaOH.

2.2.1.2. Determinación enzimática de glucosa.

Disolución de yoduro de potasio 0.1 M con heptamolibdato de amonio 0.005 %. Se pesaron aproximadamente y con precisión 2.0751 g de yoduro de potasio y 0.0155 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado, se disolvieron con agua desionizada; la disolución se trasvasó cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevó al aforo con agua desionizada.

Disolución amortiguadora de ftalatos 0.05 M pH 4.6. Se pesaron aproximadamente y con precisión 2.5 g de biftalato de potasio y se disolvieron con agua desionizada; la disolución se trasvasó cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevó al aforo con agua desionizada. El pH de la disolución se ajustó con NaOH.

Disoluciones de glucosa. Se preparó una disolución madre de glucosa a una concentración de 1.26 mg/mL en un volumen de 25 mL. A partir de la disolución madre se tomaron alícuotas de 1, 2, 4, 5 y 7.5 mL y se llevaron a 25 mL en matraces volumétricos con agua desionizada, obteniéndose un intervalo de concentración de glucosa de 50–250 mg/L.

2.2.2. Inmovilización de glucosa oxidasa. [40, 41]

La inmovilización consta de 4 pasos fundamentales:

- Limpieza de vidrio.
- Silanización.
- Acoplamiento del glutaraldehído.
- Unión de la enzima.

2.2.2.1. Limpieza del vidrio.

Se pesaron aproximadamente 0.2 g de vidrio de poro controlado (CPG por sus siglas en inglés). El vidrio se hirvió con HNO₃ al 5 % durante 30 minutos en la campana de extracción. Se enfrió, filtró y lavó abundantemente con agua destilada, sobre un filtro de vidrio sinterizado en equipo Millipore para eliminar el ácido nítrico. El CPG limpio se transfirió a un vidrio de reloj y se secó a 95 °C en horno durante el tiempo necesario. La coloración del vidrio no debe de cambiar, en caso contrario repetir el procedimiento.

2.2.2.2. Silanización.

Se añadió el vidrio seco a 5 mL de 3-aminopropiltriethoxisilano y se calentó en baño de agua durante 2 horas (90-100 °C), con agitación constante. Se dejó enfriar y posteriormente se filtró sobre un filtro de vidrio sinterizado, se lavó abundantemente con agua destilada. Se secó en estufa a 95 °C por el tiempo necesario para secar totalmente. La **figura 2.2** muestra la reacción que se lleva a cabo en este paso.

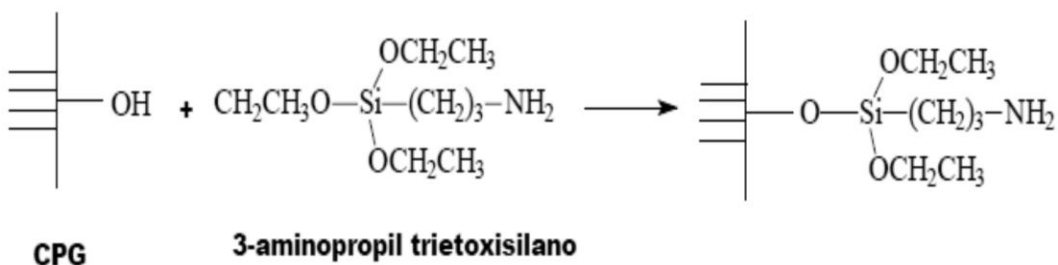


Figura 2.2. Silanización. Reacción del vidrio de poro controlado con el 3-aminopropil trietoxisilano.

2.2.2.3. Acoplamiento con glutaraldehído.

El CPG silanizado y seco se añadió a la disolución de glutaraldehído y se mantuvo en agitación suave por 1 hora a temperatura ambiente. En este paso se observa un cambio en la coloración del vidrio, a una tonalidad rojo-ladrillo, indicativo de que se está llevando a cabo la reacción entre los grupos amino del silanizante y los grupos carbonilo del glutaraldehído. La reacción que se llevó a cabo se muestra en la **figura 2.3**.

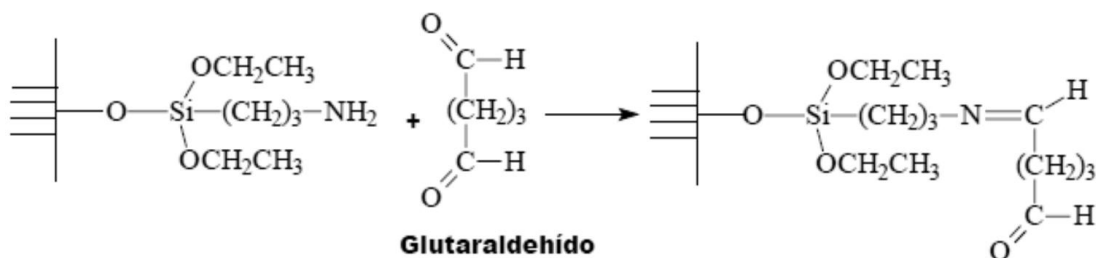


Figura 2.3. Acoplamiento del grupo bifuncional al vidrio silanizado. Reacción entre el grupo amino del vidrio silanizado y uno de los carbonilos del glutaraldehído.

Transcurrido el tiempo, se filtró en un filtro de vidrio sinterizado y se lavó con agua destilada, ahí mismo se dejó secar al vacío durante el tiempo necesario. Una vez seco se guardó en un vial ámbar bien cerrado, cubierto con papel aluminio y se mantuvo a temperatura ambiente.

2.2.2.4 Unión de la enzima

Se pesaron 0.0693 g de enzima glucosa oxidasa dentro de un vial de vidrio y se disolvieron en 2 mL de buffer fosfatos (0.1 M, pH 6). Se pesaron 0.2431 g del CPG activado, se adicionó a la disolución de la enzima. El vial se guardó cubierto con papel aluminio a una temperatura de 4 °C, por un mínimo de 24 horas.

El CPG activado reacciona con cualquier grupo amino presente en la enzima glucosa oxidasa, como se muestra a continuación en la **figura 2.4**.

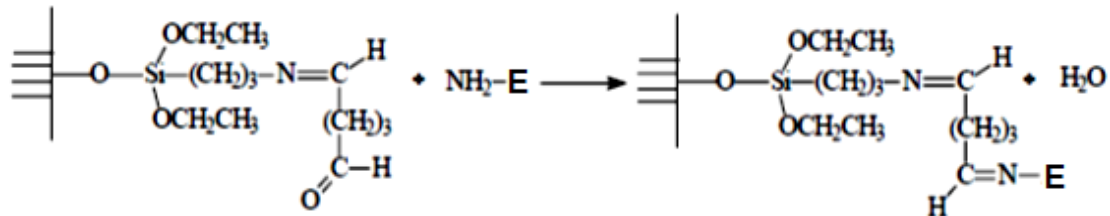


Figura 2.4. Unión de la glucosa oxidasa. Los grupos amino libres de la enzima glucosa oxidasa reaccionan con el grupo carbonilo del glutaraldehído unido al vidrio silanizado.

La enzima inmovilizada en el CPG, se lavó con buffer de fosfatos y se empaco en tubo de teflón de DI 1/16'' y 6 cm de longitud.

2.2.3. Configuración.

En la **figura 2.5** se muestra la configuración FIA utilizada para la determinación enzimática de glucosa. Se inyectan 200 μL de disolución sobre el portador (buffer ftalatos). La disolución pasa a través del reactor enzimático empacado con enzima glucosa oxidasa inmovilizada en CPG (**R1**), en donde se lleva a cabo la reacción de oxidación de la glucosa a una temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$ (**T1**). El peróxido de hidrógeno, producto de la oxidación enzimática, confluye con el reactivo de yoduro de potasio / heptamolibdato de amonio (éste último es utilizado como catalizador) formándose el ion triyoduro en el segundo reactor (**R2**), que absorbe a 353 nm. La altura de la señal (en unidades de absorbancia) es proporcional a la concentración de glucosa en la disolución inyectada.

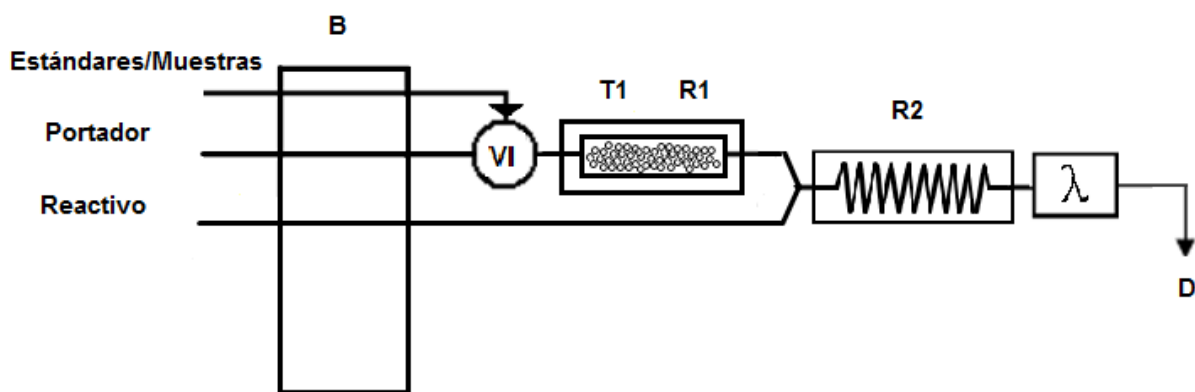


Figura 2.5. Configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa: **B:** bomba peristáltica (0.35 mL/min); **VI:** válvula de inyección (200 μL); **Portador:** buffer de ftalatos 0.05M, pH 4.6; **Reactivo:** disolución de yoduro de potasio con heptamolibdato de amonio; **T1:** Temperatura (40 $^{\circ}\text{C}$); **R1:** reactor enzimático; **R2:** reactor (200 cm); Detector a $\lambda = 353\text{nm}$; **D:** desecho.

2.2.3.1. Optimización del flujo.

El método utilizado para la determinación de glucosa se basó en lo reportado por A. Angeles Cañas y P. Cañizares-Macías, sin embargo, debido a que las características del reactor enzimático, tales como cantidad de enzima inmovilizada, longitud y diámetro del reactor, varían, se optimizó el caudal realizando inyecciones a 0.35, 0.50 y 0.90 mL/min.

2.2.4. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se inyectaron disoluciones estándar de glucosa en la configuración descrita en la **sección 2.2.3**. Se construyó la curva de calibración ($A=f(\text{concentración})$), tomando como valor de absorbancia la altura de cada pico en el fiagrama obtenido.

A partir de la curva de calibración se estableció el intervalo lineal de concentraciones y se evaluaron los límites de detección y cuantificación de acuerdo al método descrito en el **apéndice B**.

2.3. Aplicación de la metodología propuesta al análisis de muestras de tequilas y mostos de agave.

La metodología propuesta para la determinación de azúcares reductores con el DNS para la cuantificación de fructosa y la determinación enzimática de glucosa se aplicaron para el análisis de las muestras de tequilas y mostos de agave.

2.3.1. Evaluación del etanol como interferente en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.

La reducción del DNS puede llevarse a cabo por los azúcares reductores o cualquier otro componente de la muestra que sea susceptible de ser oxidado, como es el caso del etanol presente en los tequilas. Según la NOM-006-SCFI-2005, el contenido de etanol en el tequila puede variar de 35-55 % (v/v), por lo que para evaluar la contribución del contenido alcohólico, se inyectaron disoluciones de etanol en este intervalo (**sección 2.1.1.**).

2.3.2. Hidrólisis ácida.

Debido a que en las muestras de mostos, los azúcares presentes se pueden encontrar como mono sacáridos o bien formando moléculas más complejas como di o poli sacáridos, se vio la necesidad de llevar a cabo una hidrólisis ácida de acuerdo a la metodología descrita en la norma NMX-V-006-2005, con el objeto de poder comparar los resultados. Las muestras de tequila se inyectaron si realizar hidrólisis ácida. La hidrolisis ácida se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se tomaron 10 mL de mosto previamente filtrado, el mosto se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL con 10 mL de agua desionizada, se adicionaron 2 mL de HCl concentrado y se calentó en una temperatura entre 65 a 70 ° C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, el vaso se sacó del baño de agua, se colocó en un baño de hielo para llevarlo a temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH (C≈6 M). La disolución neutra se trasvasó cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó con agua desionizada.

2.3.3. Determinación de fructosa y glucosa en mostos de agave.

Las muestras de mostos se homogeneizaron y filtraron, en el filtrado se determinaron azúcares reductores directos y reductores totales. Para estos últimos se realizó una hidrólisis ácida como se describió en la **sección 2.3.2.**

Se analizaron 9 muestras de mostos (2 muestras de mosto muerto, 3 mostos en fermentación, 4 mostos) y 2 jugos de agave crudo, las muestras fueron proporcionadas por el consejo regulador del tequila. Es importante mencionar que a las muestras de mostos se les adicionó metabisulfito de sodio con la finalidad de evitar o en su defecto detener la fermentación de algunas durante su transporte desde Jalisco al Distrito Federal.

2.3.3.1. Determinación de fructosa en mostos de agave.

Las disoluciones estándar de fructosa y las muestras de mostos se inyectaron en la configuración FIA optimizada que se muestra en la **figura 2.1.** Se determinó fructosa directa y total.

2.3.3.1.1. Evaluación del color de las muestras como interferente.

Para conocer la contribución del color de las muestras sobre la determinación, en la configuración FIA que se muestra en la **figura 2.1**, se reemplazó el DNS por agua desionizada y se inyectaron las disoluciones de mostos realizando la misma dilución utilizada en la determinación de fructosa.

2.3.3.2. Determinación de glucosa en mostos de agave.

El método propuesto para la determinación de glucosa es específico, por lo que no es necesario llevar a cabo la evaluación de interferentes en las muestras de mostos.

Las muestras de mostos se inyectaron en la configuración FIA optimizada que se muestra en la **figura 2.5**. Se utilizaron las mismas diluciones preparadas para la determinación directa y total de fructosa. Por lo tanto se determinó glucosa directa y total.

2.3.4. Determinación de fructosa y glucosa en muestras de tequila.

Se analizaron 25 muestras de tequila (7 muestras de tequila blanco 100 %, 1 de tequila blanco, 2 de tequila joven, 4 de tequila reposado, 7 de tequila reposado 100 %, 2 de tequila añejo 100 % y 2 de tequila extra añejo 100 %,) cuyo contenido en alcohol reportado va del 35-55 % (v/v).

2.3.4.1. Cuantificación de fructosa en muestras de tequila.

Las disoluciones estándar de fructosa, etanol y las muestras de tequilas se inyectaron en la configuración FIA optimizada que se muestra en la **figura 2.1**. Se determinó fructosa directa.

2.3.4.1.1. Determinación del efecto de la matriz sobre la cuantificación de fructosa.

Se llevó a cabo el estudio del efecto de la matriz sobre la cuantificación de fructosa en las muestras de tequila de la siguiente manera.

Se seleccionaron aleatoriamente 4 muestras de tequila:

- Tequila extra añejo 100 % agave, muestra A, 36.2 % v/v etanol.
- Tequila reposado 100 % agave, muestra B, 35 % v/v etanol.
- Tequila joven 100 % agave, muestra I, 40.1 % v/v etanol.
- Tequila blanco 100 % agave, muestra 5B, 40 % v/v etanol.

Las muestras fortificadas de tequila se prepararon de la siguiente manera: En un matraz aforado de 10 mL, se adicionaron 0.2 mL de la disolución fortificante de glucosa de fructosa ($C=119.6$ mg/mL) y se aforó con una de las muestras de tequila, se realizó el mismo procedimiento para las otras muestras. La concentración de fructosa adicionada en cada muestra es de 2.39 mg/mL.

En la configuración FIA para la determinación de fructosa se inyectaron las disolución estándar de fructosa y etanol, posteriormente las muestras seleccionadas de tequila con y sin fortificar.

2.3.4.2. Determinación de glucosa en muestras de tequila.

El método propuesto para la determinación de glucosa es específico, por lo que no es necesario evaluar interferencias. Las muestras de tequilas se inyectaron en la configuración FIA optimizada que se muestra en la **figura 2.5**, se realizaron las diluciones correspondientes.

Capítulo 3. Resultados y análisis.

3.1. Determinación de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

3.1.1. Influencia de la temperatura en la reacción.

Se inyectaron por triplicado las disoluciones de glucosa en la configuración FIA descrita en la **sección 2.1.2**, variando las condiciones de temperatura:

- ✓ El reactor R sumergido en un baño de agua a 85 °C.
- ✓ El reactor R sumergido en un baño de agua en ebullición a 92 °C.
- ✓ El reactor R en el horno para columna Hot-pocket a 85 °C.

3.1.1.1. El reactor sumergido en un baño de agua a 85 °C.

Se utilizó un baño de agua Lab-line y se ajustaron los controles del mismo a obtener una temperatura de 85 °C. El reactor se sumergió en el baño y se realizaron las inyecciones de las disoluciones estándar de glucosa. En la **figura 3.1** se muestra el diagrama obtenido.

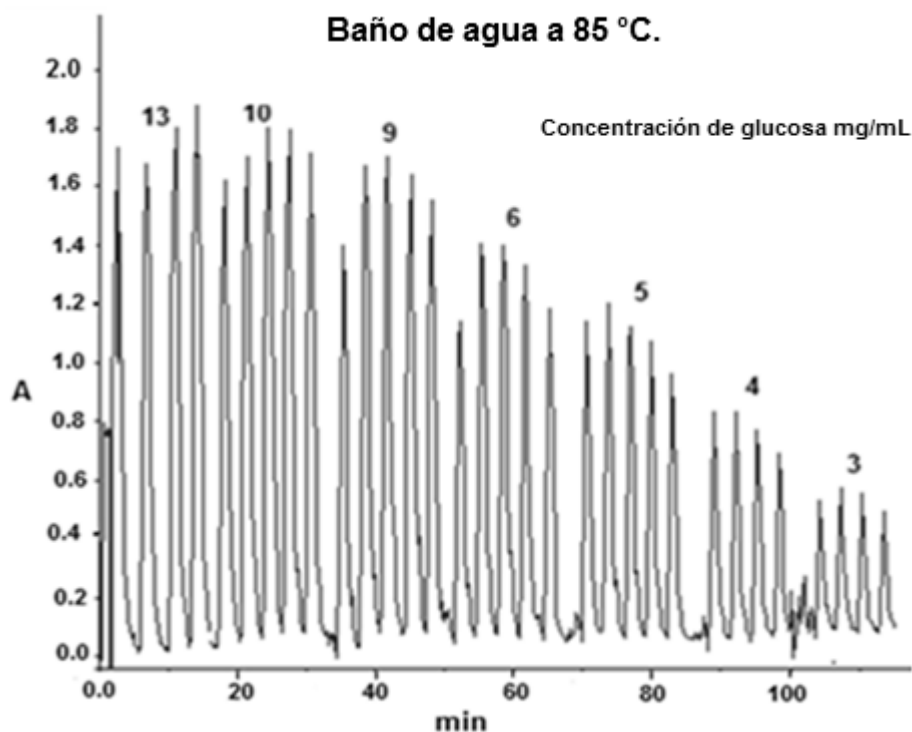


Figura 3.1. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 3, 4, 5, 6, 9, 10 y 13 mg/mL, en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, utilizando el baño de agua (lab-line) a 85 °C. $\lambda = 480$ nm.

Durante el desarrollo del experimento se observó que hubo una variación en la temperatura entre los 83 y 86 °C, por lo que las alturas de los picos correspondientes a una disolución no son reproducibles; en consecuencia se tuvieron que realizar un mayor número de inyecciones de cada disolución para obtener valores de altura de pico similares.

Por esta razón y a fin de mantener la temperatura del baño constante, se utilizó un baño de agua a ebullición en lugar del baño de agua Lab-line.

3.1.1.2. El reactor sumergido en un baño de agua en ebullición a 92 °C.

Se utilizó un recipiente de 1 L de capacidad lleno con agua, se calentó a temperatura de ebullición utilizando una parrilla eléctrica. El reactor se sumergió dentro del recipiente y se realizaron las inyecciones de glucosa.

En las **figuras 3.2 A y B.** se muestran los diagramas obtenidos.

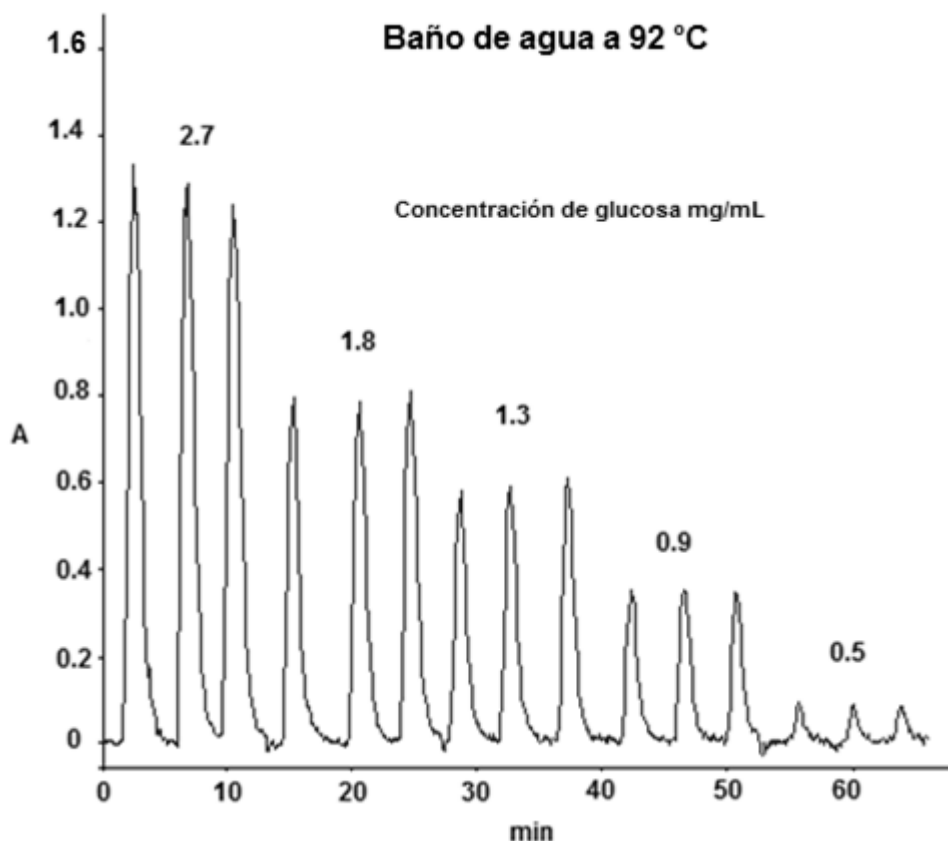


Figura 3.2.A. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 0.5, 0.9, 1.3, 1.8 y 2.7 mg/mL, en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, utilizando un baño de agua en ebullición a 92 °C. $\lambda = 480$ nm.

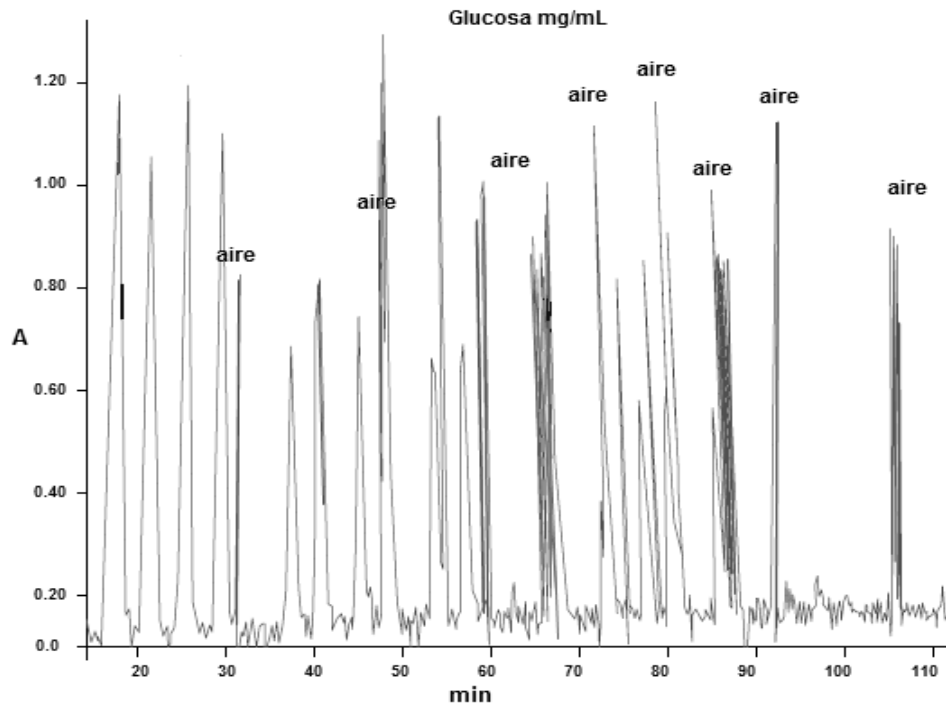


Figura 3.2.B. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, utilizando un baño de agua en ebullición a 92 °C, después de utilizar esta fuente de calor varias veces.

Como se observa en la **figura 3.2.A**, las alturas de pico son mayores que a 85 °C por lo que el intervalo de concentración de la glucosa inyectada fue de 0.5 – 2.8 mg/mL, sin embargo, el uso del baño de agua a ebullición presenta los siguientes inconvenientes:

- ✓ El agua del recipiente se debe renovar constantemente ya que se evapora por las condiciones de temperatura. Al adicionar agua para reponer la pérdida por evaporación es necesario esperar a que la temperatura alcance nuevamente los 92 °C.
- ✓ La temperatura del baño favorece la producción de un gran número de burbujas dentro del sistema de reacción. Estas burbujas al llegar al detector interfieren con la determinación de azúcares como se puede observar en la forma de las señales del diagrama de la **figura 3.2.B**, éstas tienen forma de picos angostos, muy pegados entre sí y de distintas alturas. A pesar de la incorporación de un deareador en la

configuración FIA a la salida del reactor, no se pudo controlar la eliminación de burbujas a través de éste.

Por lo tanto, se vio la necesidad de utilizar un dispositivo capaz mantener una temperatura menor a la de ebullición del agua con el mínimo de fluctuaciones. Se decidió utilizar un horno para columna a una temperatura de 85 °C.

3.1.1.3. El reactor en el horno para columna Hot-pocket a 85 °C.

Se utilizó el horno para columna Hot pocket a una temperatura de 85 °C (temperatura máxima de operación). El reactor se colocó en el interior del horno y se realizaron las inyecciones de glucosa. En la **figura 3.3** se muestra el fiagrama obtenido.

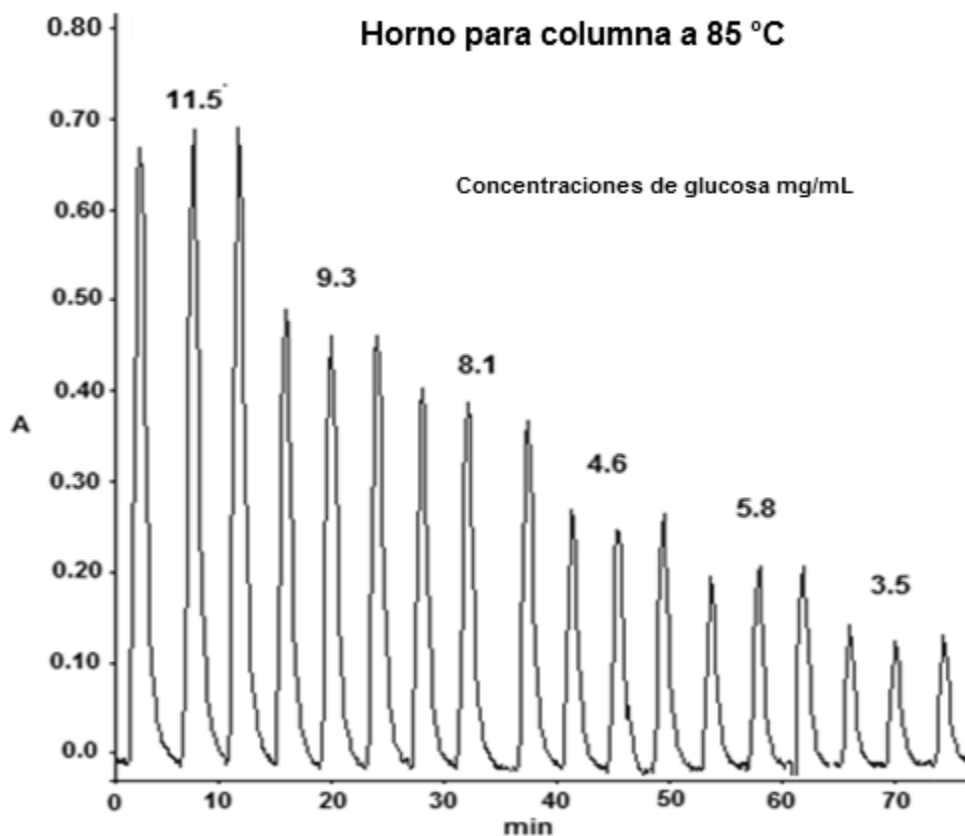
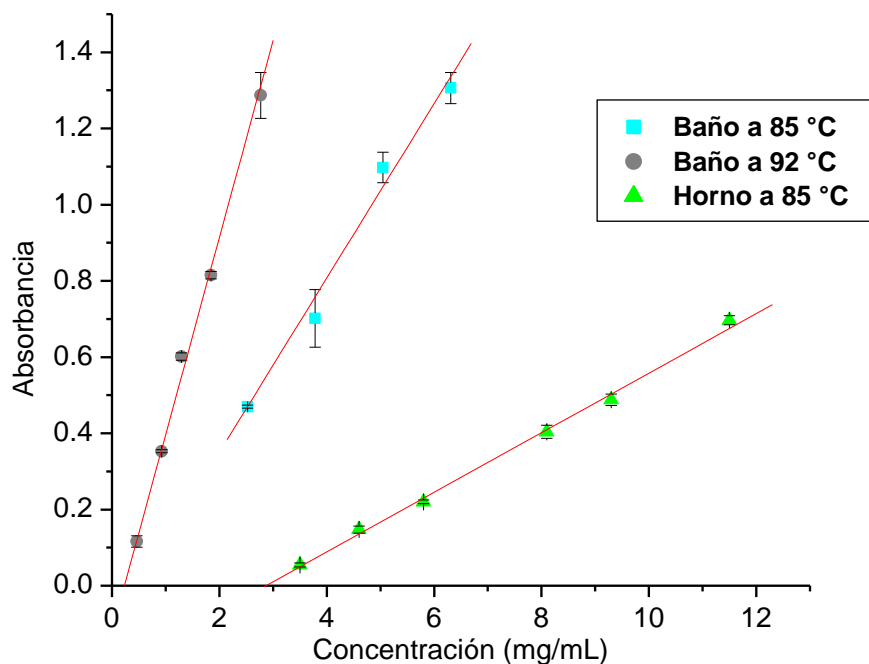


Figura 3.3. Fiagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 11.5, 9.3, 8.1, 4.6, 5.8 y 3.5 mg/mL, en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, utilizando un horno para columna Hot pocket a 85 °C. $\lambda = 480$ nm.

Durante el desarrollo del experimento se observó que la temperatura permaneció constante y por lo tanto las señales son reproducibles. Los datos obtenidos a partir de los diagramas se encuentran en las **tablas A1, A2 y A3**. Se construyó la **gráfica 3.1** con las curvas de calibración correspondientes. Cabe mencionar que en esta gráfica se muestran solamente los puntos que se encuentran dentro del intervalo lineal.

Reacción del DNS con la glucosa a distintas temperaturas



Gráfica 3.1. Curvas de calibración de glucosa, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA, modificando las condiciones del reactor: (■) baño de agua a 85 °C, (●) baño de agua a 92 °C y (▲) horno de columna a 85 °C.

El resumen de los parámetros obtenidos de cada curva se encuentra en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Parámetros correspondientes a las curvas de calibración de glucosa a diferentes condiciones de temperatura.

Parámetro	85 °C baño de Agua	85 °C Hotpocket	92 °C baño de Agua
Intervalo Lineal (mg/mL)	2 - 7	3 - 12	0.5 - 2.8
Pendiente (m)	0.1847	0.0785	0.5029
Ordenada (b)	0.0575	-0.2244	-0.0994
R	0.9769	0.9974	0.9963

Como se observa a 92 °C se obtiene una pendiente mayor, lo que indica que existe un incremento en la formación del cromóforo, por lo tanto, el intervalo de concentraciones inyectadas de glucosa es menor con respecto a las otras condiciones evaluadas. Haciendo una comparación de las pendientes se puede afirmar que la sensibilidad del método a las distintas condiciones de temperatura lleva el siguiente orden:

Hotpocket a 85 °C < baño de agua a 85 °C < baño de agua a 92 °C

A pesar de que el Hotpocket y el baño de agua se encuentran a 85 °C, se observa que la pendiente obtenida con éste último es mayor, esto se debe a que la transferencia de calor del agua hacia el reactor es más eficiente, lo que genera un aumento en la cinética de la reacción y por ende mayor reducción de DNS.

En el caso del baño de agua a 85 °C los datos no tienen una buena correlación, lo que se atribuye a la variación en la temperatura durante la experimentación, por lo que es indispensable contar con las condiciones que proporcionen una temperatura constante.

A pesar de que a 92 °C la sensibilidad del método es mayor, se decidió trabajar con el hotpocket a 85 °C, debido a que este horno proporciona las condiciones de temperatura constante necesaria para llevar a cabo la experimentación y la formación de burbujas es mínima. Por otra parte, en el caso de los mostos se esperan concentraciones altas de azúcares, por lo que resulta conveniente utilizar el horno para columna a 85 °C, ya que el intervalo lineal es mayor, y por ende las diluciones necesarias para llevar a cabo la determinación de fructosa serán menores al igual que el error experimental.

Como se observa en la **tabla 3.1**, para las condiciones de 85 °C con el horno de columna y a 92 °C con el baño de agua, el valor de las ordenadas al origen en las ecuaciones de la recta son negativas, esto se debe a la adecuación de la recta calculada por mínimos cuadrados debida a la dispersión de los datos. Otra explicación para la obtención de una ordenada negativa es un posible error de blanco ya que el DNS absorbe a 480nm.

3.1.2. Sensibilidad del método en la determinación de glucosa y fructosa.

Como se indicó en el capítulo 1, en la hidrólisis de los azúcares presentes en el *agave tequilana Weber variedad azul* se obtiene como producto principal a la fructosa y en una menor proporción a la glucosa, debido a esto se evaluó la sensibilidad que tienen estos azúcares utilizando el método del DNS en FIA.

Establecidas las condiciones de temperatura (85°C con el horno de columna Hot pocket), se realizaron las inyecciones de glucosa y fructosa en la configuración FIA descrita en la **sección 2.1.2**. En la **figura 3.4** se muestra el diagrama obtenido.

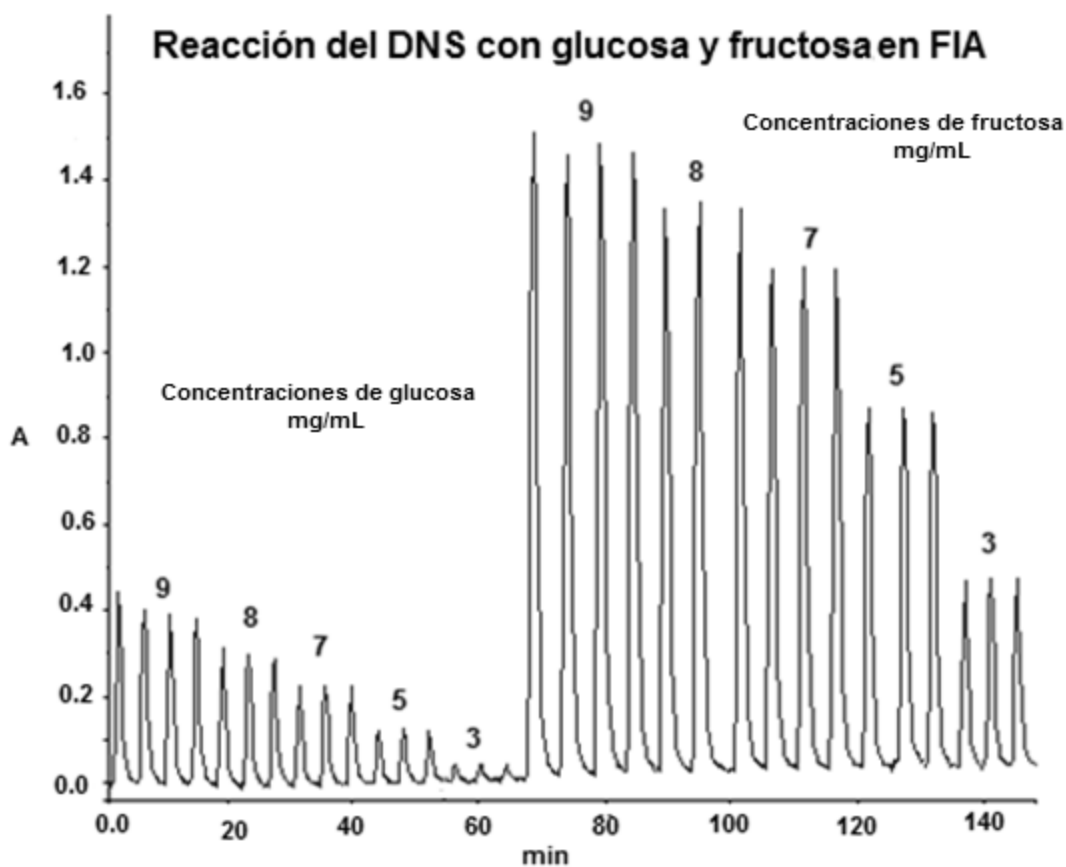
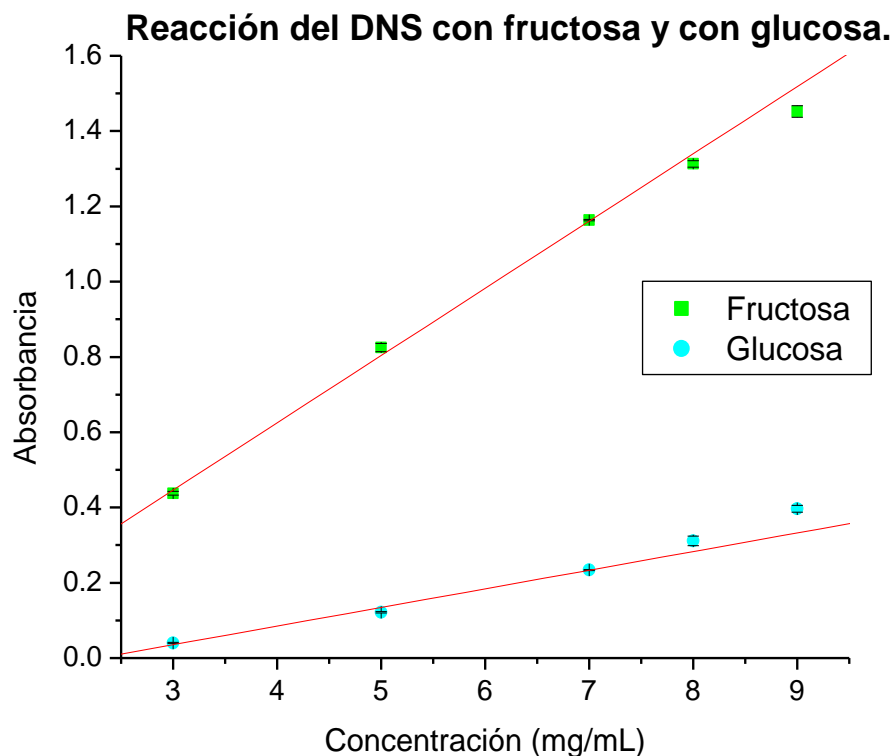


Figura 3.4. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa (9, 8, 7, 5 y 3 mg/mL) y fructosa (9, 8, 7, 5 y 3 mg/mL), en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS.

Los datos obtenidos a partir del diagrama se encuentran en las **tablas A4 y A5**. Se construyó la **gráfica 3.2** con las curvas de calibración correspondientes.



Gráfica 3.2. Curvas de calibración de (■) fructosa y (●) glucosa, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA.

En la **tabla 3.2** se muestra el resumen de los parámetros obtenidos de las curvas de calibración de glucosa y fructosa.

Tabla 3.2. Parámetros correspondientes a las curvas de calibración de glucosa y fructosa.

Azúcar	Intervalo	Pendiente (m)	Ordenada (b)	R
Glucosa	9-3 mg/mL	0.0536	-0.1317	0.9925
Fructosa	9-3 mg/mL	0.1695	-0.0464	0.9980

Como se puede observar en la **figura 3.4** y en las pendientes que se muestran en la **tabla 3.2**, las alturas de pico obtenidas por las disoluciones estándar de fructosa son mayores que las obtenidas cuando se inyecta glucosa. Al calcular el cociente de la pendiente de fructosa sobre la de glucosa, se obtiene que la relación es aproximadamente 3:1.

Debido a esta diferencia en la sensibilidad del método y con la finalidad de intentar homologar la señal de fructosa y glucosa, se realizaron las modificaciones descritas en la **sección 2.1.3**:

1. Longitud de onda de detección.
2. Adición de sal de Rochelle al reactivo del DNS.

3.1.2.1. Longitud de onda de detección.

Se prepararon disoluciones estándar de glucosa y fructosa, se inyectaron en la configuración FIA descrita en la **sección 2.1.2**, realizando la detección a 480 y 540 nm. En las **figuras 3.5 A y B** se muestran los fiagramas obtenidos.

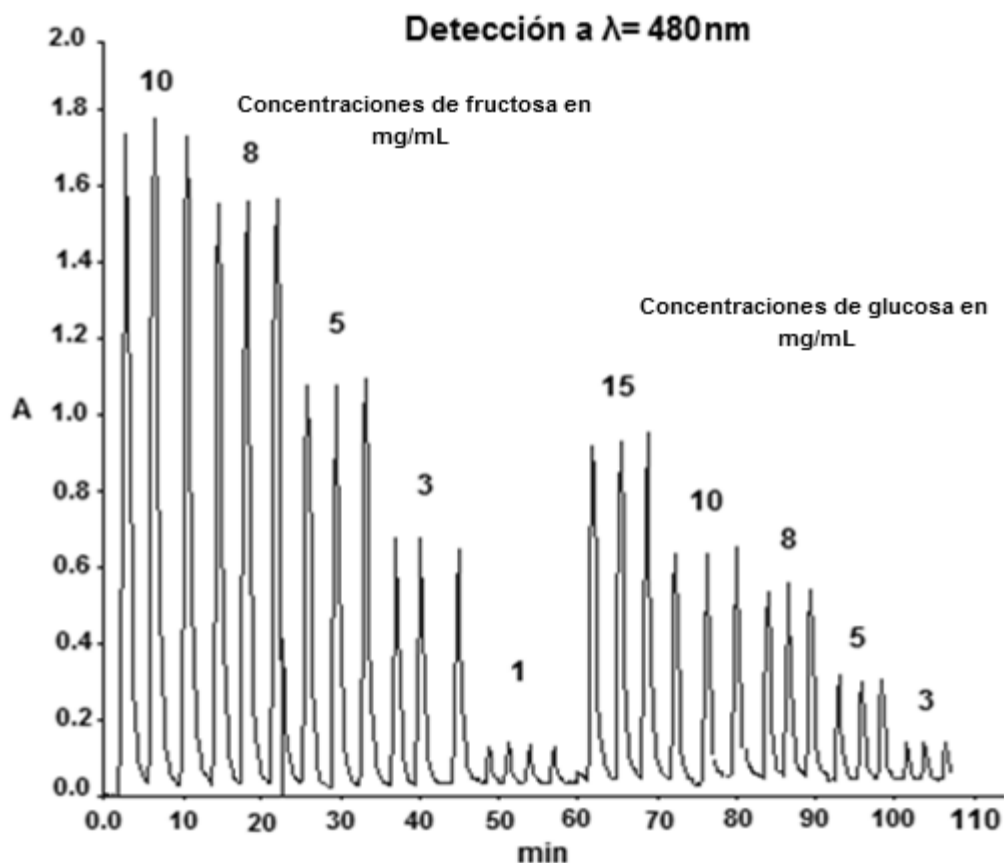


Figura 3.5. A. Fiagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de fructosa (10, 8, 5, 3 y 1 mg/mL) y glucosa (15, 10, 8, 5 y 3 mg/mL), en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, a $\lambda = 480 \text{ nm}$.

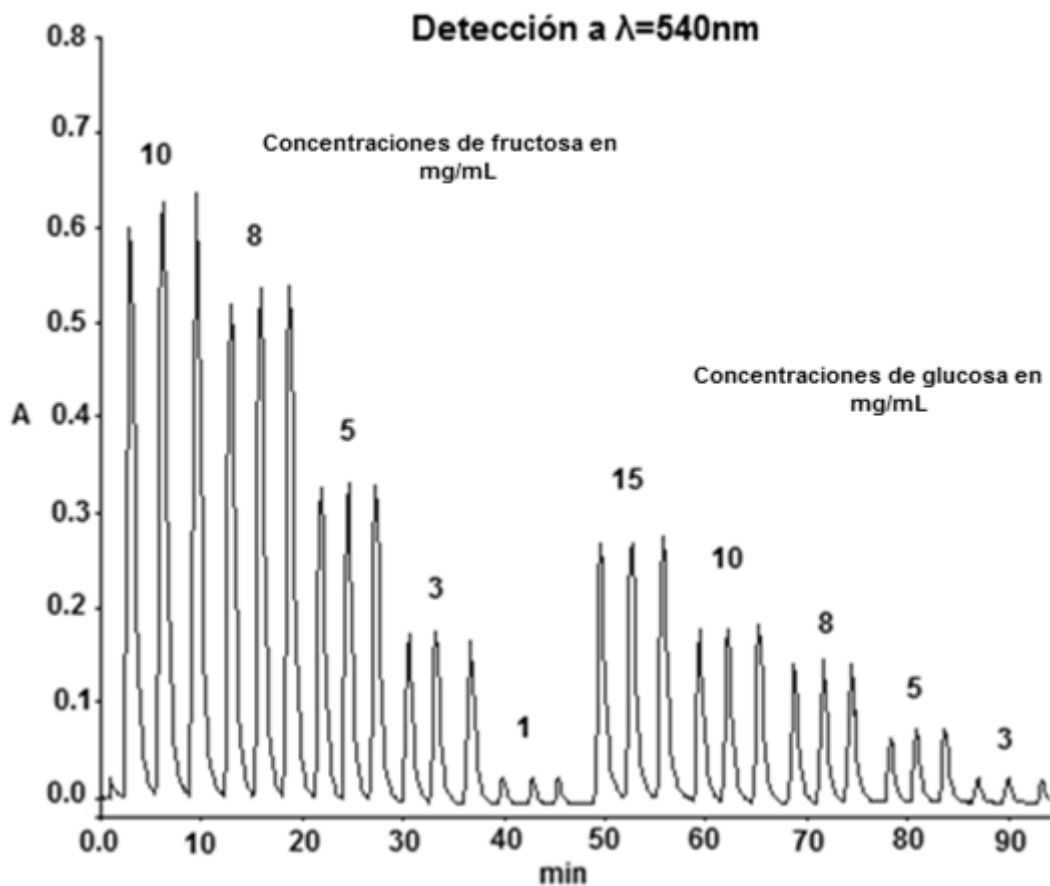
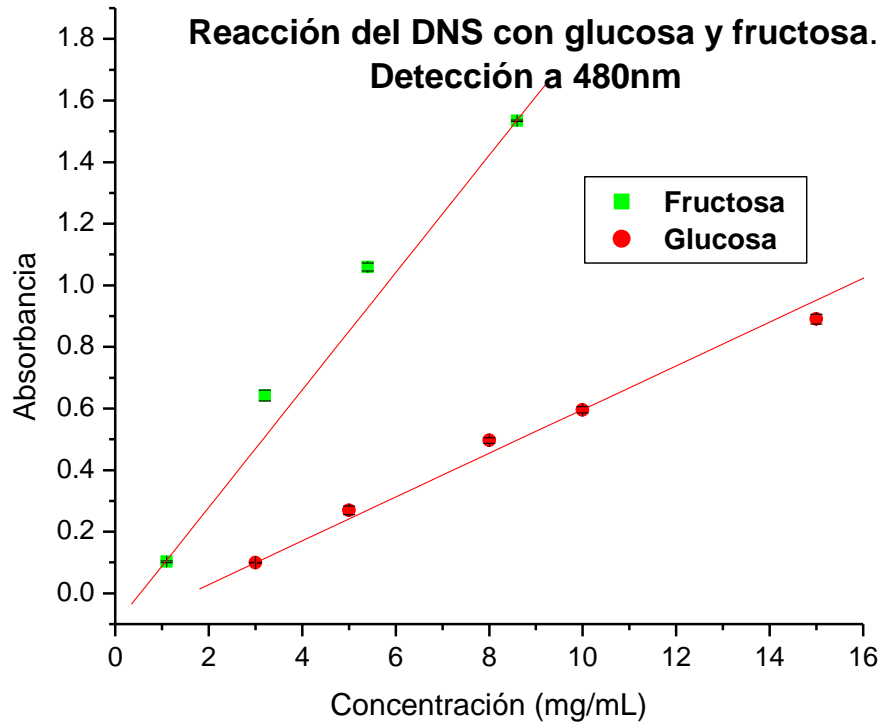
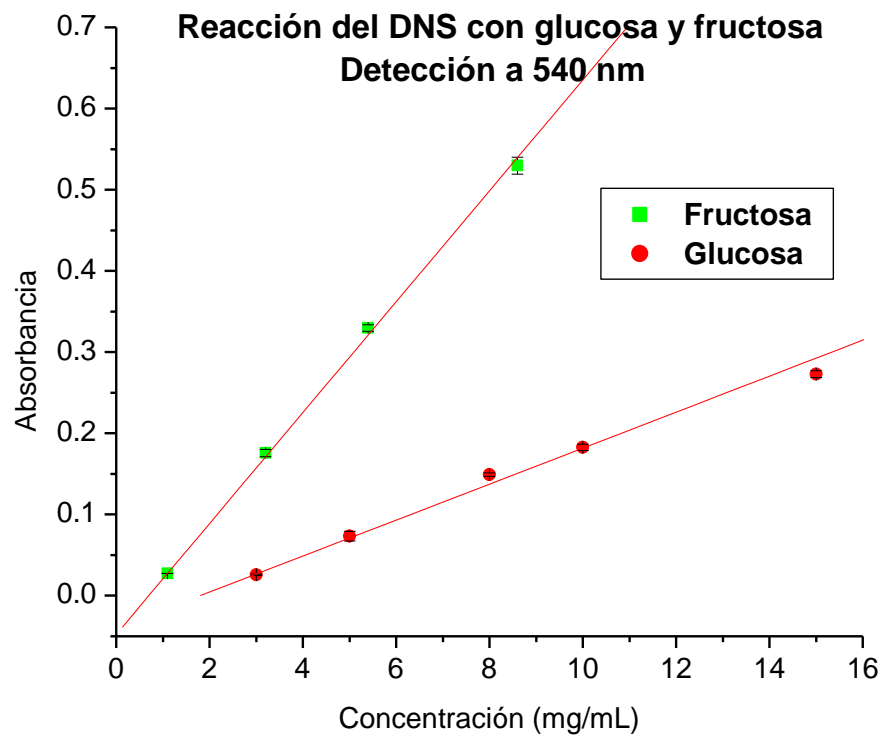


Figura 3.5. B. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de fructosa (10, 8, 5, 3 y 1 mg/mL) y glucosa (15, 10, 8, 5 y 3 mg/mL), en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, a $\lambda=540\text{ nm}$.

Los datos obtenidos de los diagramas se encuentran en las **tablas A6, A7, A8 y A9**. A partir de éstos se construyó un gráfico con las curvas de calibración correspondientes que se muestra en las **gráficas 3.3 y 3.4**.



Gráfica 3.3. Curvas de calibración de (■) fructosa y (●) glucosa, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA, a $\lambda=480$ nm.



Gráfica 3.4. Curvas de calibración de (■) fructosa y (●) glucosa, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA., a $\lambda=540$ nm.

El resumen de los parámetros obtenidos de cada curva se muestra en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Parámetros correspondientes a las curvas de calibración de glucosa y fructosa, registradas en el detector a 480 y 540 nm.

Azúcar	λ (nm)	Pendiente	Ordenada	R
Fructosa	540	0.0618	-0.0237	0.9955
Glucosa		0.0206	-0.0290	0.9960
Fructosa	480	0.1883	-0.0270	0.9914
Glucosa		0.0650	-0.0637	0.9950

Como se puede observar en la **tabla 3.3**, la sensibilidad del método disminuye cuando las absorbancias se miden a 540 nm. Tanto a 540 como a 480 nm se encontró que el método para la fructosa es más sensible que para la glucosa, ya que al calcular el cociente de la pendiente de fructosa sobre la de glucosa a cada longitud de onda se obtiene que la relación es aproximadamente de 3:1 en ambas longitudes de onda.

El cambio en la longitud de onda no resultó ser un parámetro que disminuya la diferencia de sensibilidad entre la glucosa y fructosa, por lo que se decidió seguir utilizando la longitud de onda de 480 nm.

Se observa que a pesar del cambio en la longitud de onda las ordenas al origen obtenidas siguen siendo negativas, esto se atribuye a la dispersión de los datos que se utilizaron para el cálculo de la mejor recta de calibración por medio del método del mínimos cuadrados.

3.1.2.2. Adición de la sal de Rochelle al reactivo del DNS.

Como se mencionó en la introducción la aplicación de la sal de Rochelle, tiene como función incrementar el coeficiente de absorptividad en la determinación; es por ello que se decidió determinar este efecto y ver si se logra incrementar la señal obtenida de glucosa. Para determinar el efecto de la sal de Rochelle, se inyectaron las disoluciones de glucosa y fructosa en la misma configuración, modificando la preparación del reactivo DNS como se describe en la **sección 2.1.1**. En las **figuras 3.6. A y B** se muestran los diagramas obtenidos.

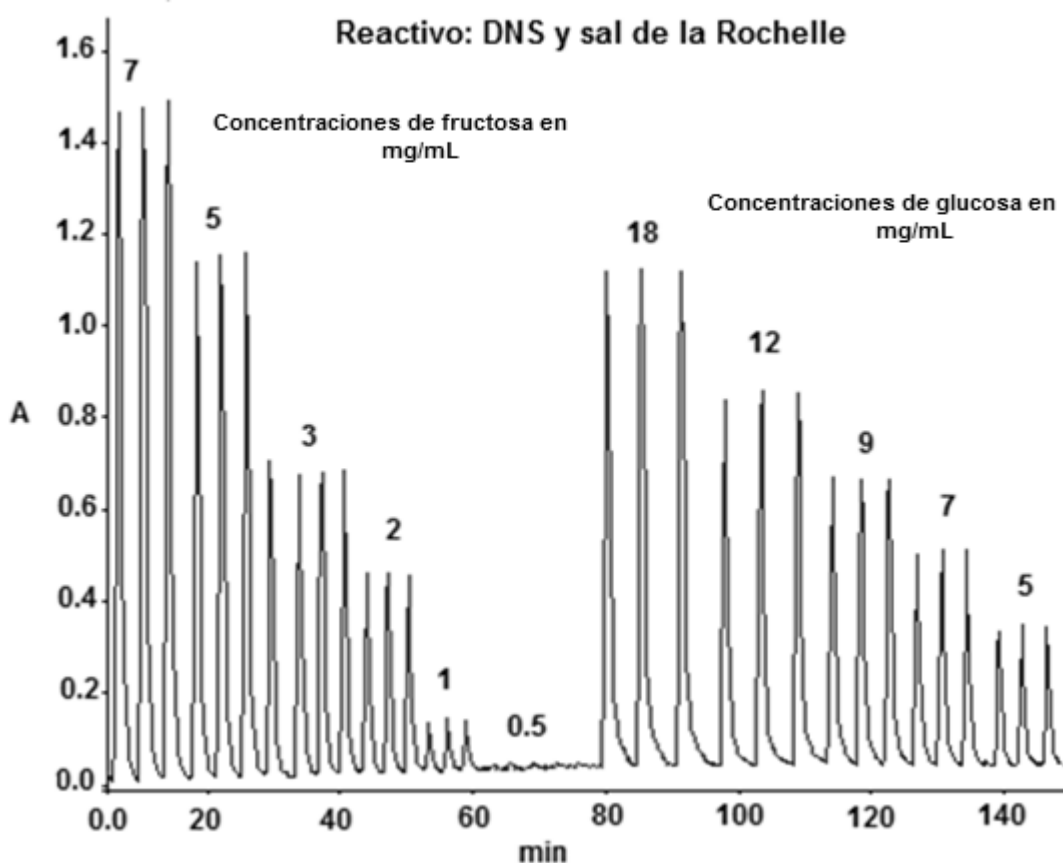


Figura 3.6. A) Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa (18, 12, 9, 7 y 5 mg/mL) y fructosa (7, 5, 3, 2 y 1 mg/mL), en la configuración FIA. Se utilizó como reactivo al DNS con sal de Rochelle en medio alcalino. Se registró la señal en el detector a $\lambda=480$ nm.

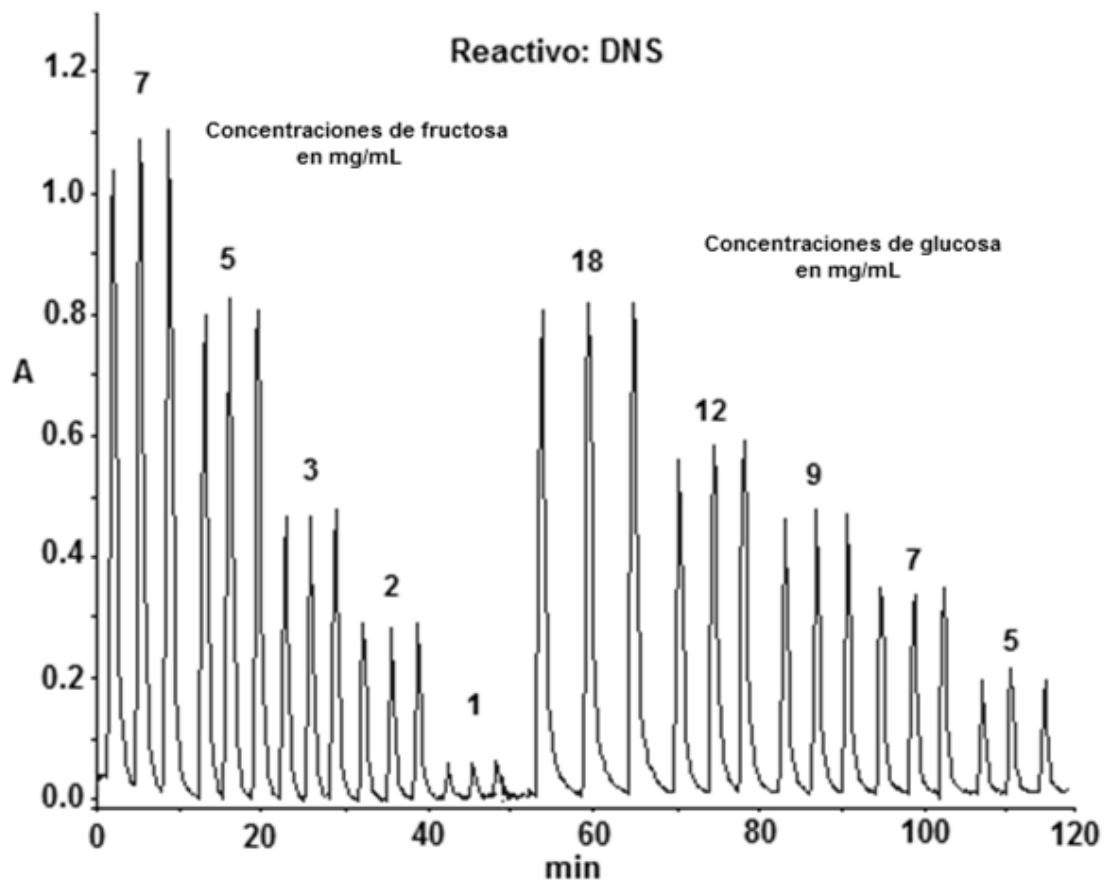
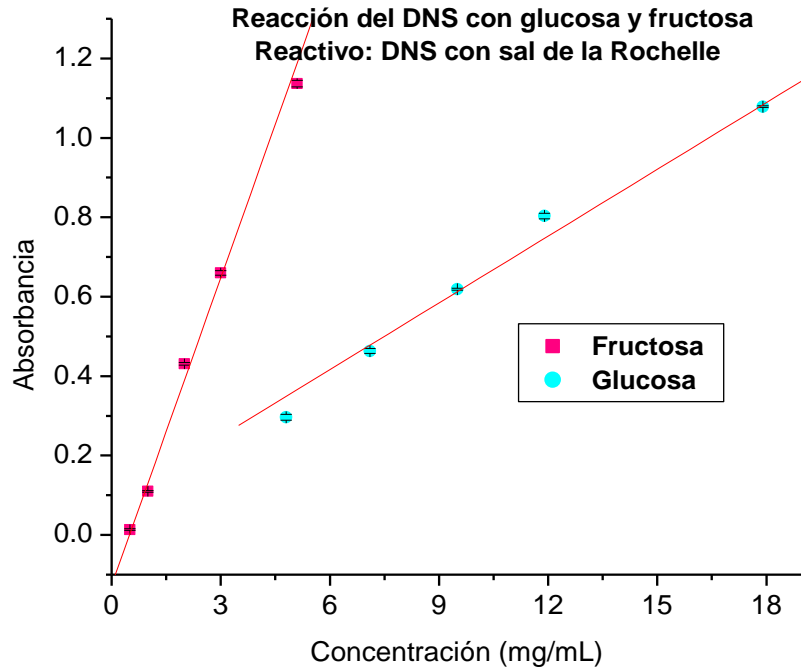
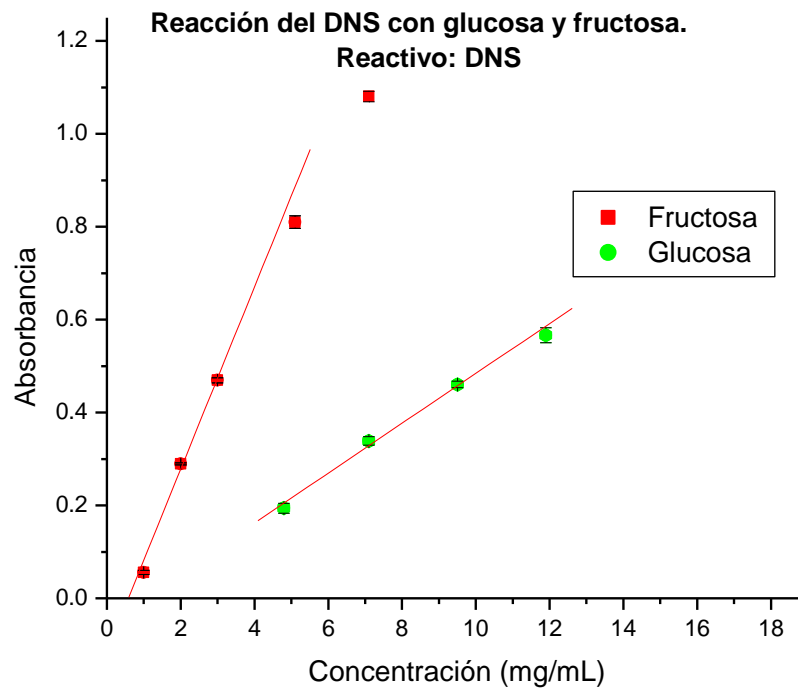


Figura 3.6. B) Fiagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa (18, 12, 9, 7 y 5 mg/mL) y fructosa (7, 5, 3, 2 y 1 mg/mL) en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino. Se registró la señal en el detector a $\lambda=480$ nm.

Los datos de los fiagramas obtenidos se encuentran en las **tablas A10, A11, A12 y A13**. A partir de éstos se construyeron dos gráficos con las curvas de calibración correspondientes que se muestran en las **gráficas 3.5. y 3.6.**



Gráfica 3.5. Curvas de calibración de (■) fructosa y (●) glucosa, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA. Se utilizó como reactivo al DNS con sal de Rochelle en medio alcalino. $\lambda=480$.



Gráfica 3.6. Curvas de calibración de (■) fructosa y (●) glucosa, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino. $\lambda=480$.

Los datos resumidos de las **gráficas 3.5** y **3.6** se muestran en la **tabla 3.4**.

Tabla 3.4. Parámetros correspondientes a las curvas de calibración de glucosa y fructosa, utilizando como reactivos al DNS en medio alcalino, con y sin sal de Rochelle.

Azúcar	Reactivo	Pendiente	Ordenada	R
Fructosa	DNS+SR	0.2493	-0.1109	0.9982
Glucosa		0.0704	-0.0448	0.9991
Fructosa	DNS	0.1666	-0.0959	0.9956
Glucosa		0.0462	-0.0412	0.9952

Nuevamente se observa, que la fructosa es el azúcar que tiene una mayor respuesta en la determinación de azúcares reductores con y sin sal de Rochelle, ya que al calcular el cociente de la pendiente de fructosa sobre la de glucosa, se obtiene que utilizando el reactivo DNS en medio alcalino la relación es de 3.5:1 y con el reactivo de DNS + sal de Rochelle la relación es de 3.6:1, se observa que la relación entre ambos azúcares se mantiene con respecto al cambio de reactivos.

Se observa que a pesar de la modificación en el reactivo, las ordenas al origen obtenidas siguen siendo negativas, esto se atribuye a la dispersión de los datos que se utilizaron para el cálculo de la mejor recta de calibración por medio del método del mínimos cuadrados. La ordenada negativa obtenida, también se puede explicar por un posible error en el blanco.

La adición de la sal de Rochelle tampoco es un factor que influya en homologar la respuesta de fructosa y glucosa. Se decidió no adicionarla, porque solo genera un gasto de reactivo.

Las modificaciones realizadas no tuvieron efecto sobre la sensibilidad de la glucosa y fructosa utilizando el método descrito en la **sección 2.1**, esto indica que la diferencia de pendientes entre estos azúcares se debe a una mayor reducción del DNS por el efecto de la fructosa, al momento de que el bolo inyectado llega al detector. Como se sabe, una de las principales características del FIA es que la detección se lleva a cabo sin que la reacción alcance el equilibrio, por lo que en este caso la diferencia en la cinética de reacción para cada azúcar es determinante.

Debido a esta diferencia, se decidió cuantificar azúcares reductores como fructosa, ya que al ser el componente mayoritario de las muestras y presentar una mayor sensibilidad en el método, se espera que el contenido de glucosa sea muy bajo, inclusive despreciable comparado con el de fructosa.

Las condiciones de trabajo que se utilizaron para llevar a cabo la determinación de fructosa en las muestras, son las siguientes:

- Reactivo: DNS 1×10^{-3} M en NaOH (0.5 M).
- Para llevar a cabo la reacción, el reactor R, se calentó con el horno para columna "Hot-pocket" a 85 °C.
- La señal se registró en el detector a una longitud de onda de 480 nm.

3.1.3. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.

Para la determinación del intervalo lineal (IL) y los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de la fructosa, se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración de 20 a 1 mg/mL. Las disoluciones se inyectaron por triplicado en la configuración FIA. En la **figura 3.7** se muestra el fiagrama obtenido.

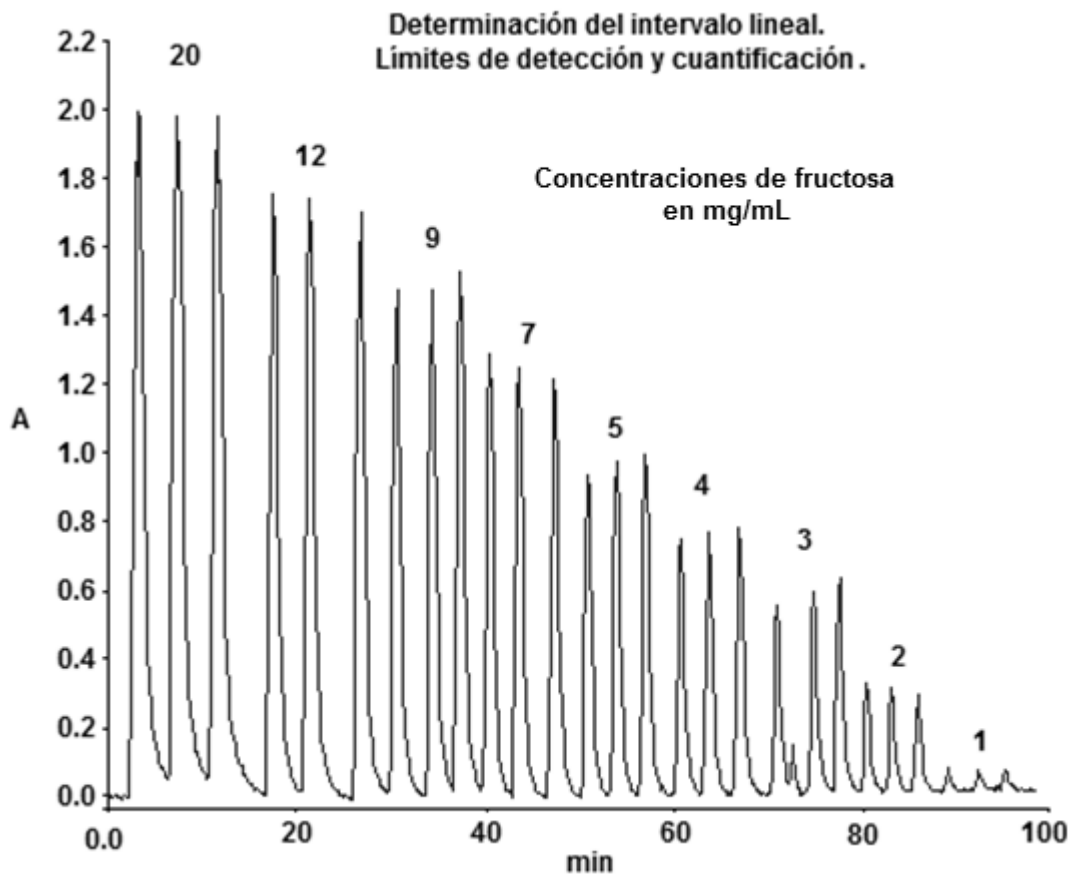
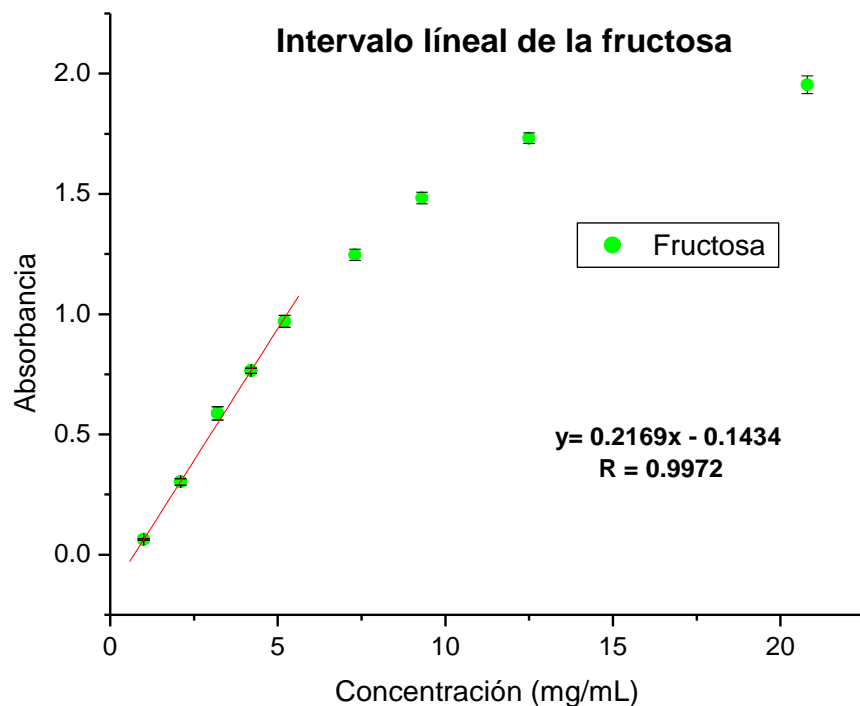


Figura 3.7. Fiagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de fructosa de 20, 12, 9, 7, 5, 4, 3, 2 y 1 mg/mL, en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS, con la finalidad de determinar el intervalo lineal, los límites de detección y cuantificación.

Los datos del fiagrama obtenido se encuentran en la **tabla A14**. A partir de éstos se construyó un gráfico con la curva de calibración correspondiente que se muestra en la **gráfica 3.7**.



Gráfica 3.7. Curva de calibración de (●) fructosa para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino, a $\lambda=480$.

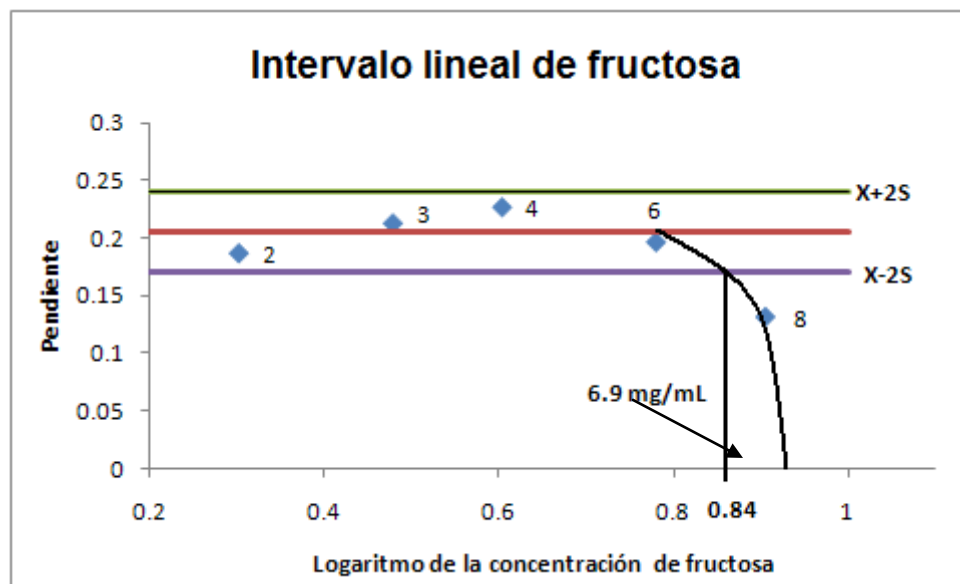
Con los datos obtenidos de la curva de calibración se calcula el LD y el LC como se describe al inicio del **apéndice B**, los cálculos correspondientes se encuentran en la **tabla B1**. Se obtuvieron los siguientes resultados:

LD: 0.58 mg/mL

LC: 1.14 mg/mL

En la **gráfica 3.7** se puede observar que a una concentración aproximada a 7 mg/L la respuesta deja de ser lineal; por lo que el límite superior del intervalo lineal se estimó de acuerdo a Ettre y Hinshaw [42], que definen el intervalo lineal, como el intervalo de concentración del analito, en el cual la sensibilidad es constante dentro de una variación específica (en este caso, se tomó como ± 2 veces la desviación estándar). El intervalo lineal se presenta como la gráfica de sensibilidad (calculada como la pendiente entre dos puntos consecutivos), contra el logaritmo de la concentración (**gráfica 3.8**). El valor límite en donde la desviación excede el valor establecido se determina gráficamente. Los datos

que se utilizaron para éste análisis se encuentran en la **tabla A15**. El valor del límite alto del intervalo lineal se estimó en 6.9 mg/L aproximadamente. Los datos con los que se construyó la **gráfica 3.8** se encuentran en la **tabla B2**.



Gráfica 3.8. Estimación gráfica del intervalo lineal de fructosa.

3.2. Determinación enzimática de glucosa.

Para la determinación de glucosa es necesaria la elaboración de un reactor empacado con la enzima inmovilizada.

3.2.1. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa.

Se inmovilizó la enzima glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4.) como se describe en la **sección 2.2.2.**

La enzima inmovilizada se empacó en un tubo de teflón de 1/16", se colocó en uno de los extremos del tubo un poco de algodón para evitar que la enzima inmovilizada saliera de éste por acción del flujo. En el otro extremo se colocó una válvula check, con el fin de evitar que las disoluciones que pasan a través de éste regresen por un incremento en la presión interna del reactor, debida al compactamiento de la matriz donde se inmovilizó la enzima. En la **figura 3.8** se muestra el reactor enzimático.



Figura 3.8. En la parte inferior de la figura se muestra el reactor empacado con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada. En la parte superior de la imagen se colocó una pluma con el fin de mostrar las dimensiones del reactor enzimático.

3.2.2. Optimización del flujo.

Se inyectaron por triplicado disoluciones de glucosa en una concentración de 50-250 mg/L en la configuración FIA descrita en la **sección 2.2.3** a tres diferentes flujos:

- 0.9 mL/min.
- 0.5 mL/min.
- 0.35 mL/min (flujo reportado).

Los diagramas obtenidos de las inyecciones de glucosa a los distintos flujos se muestran en las **figuras 3.9, 3.10 y 3.11**.

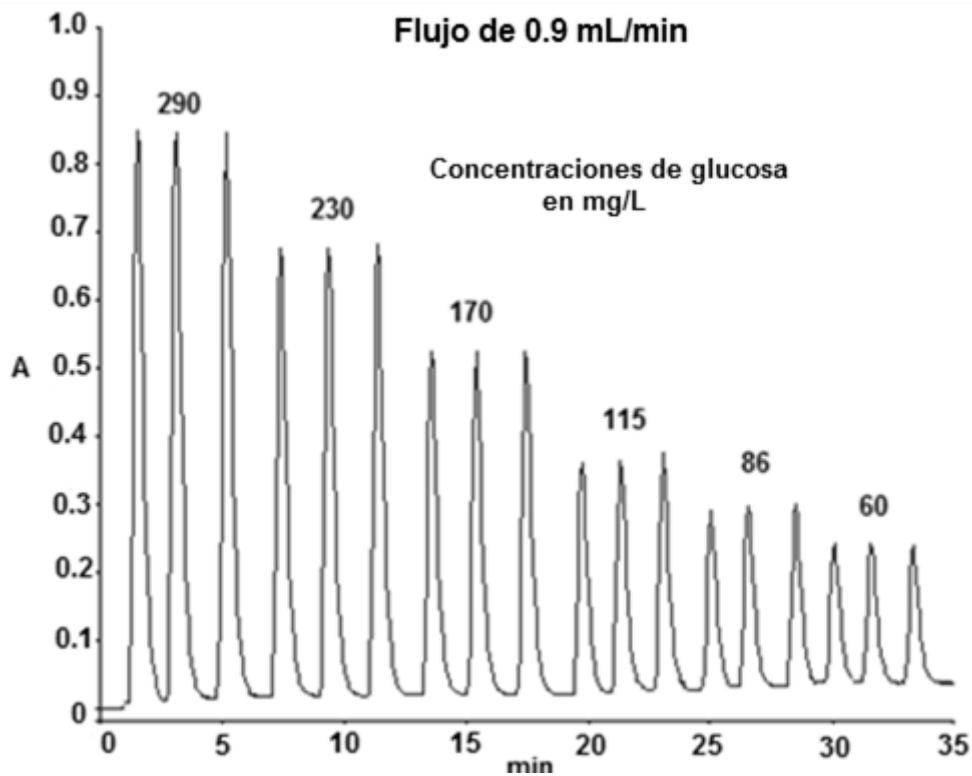


Figura 3.9. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 290, 230, 170, 115, 86 y 60 mg/L, en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Utilizando un flujo de 0.9 mL/min.

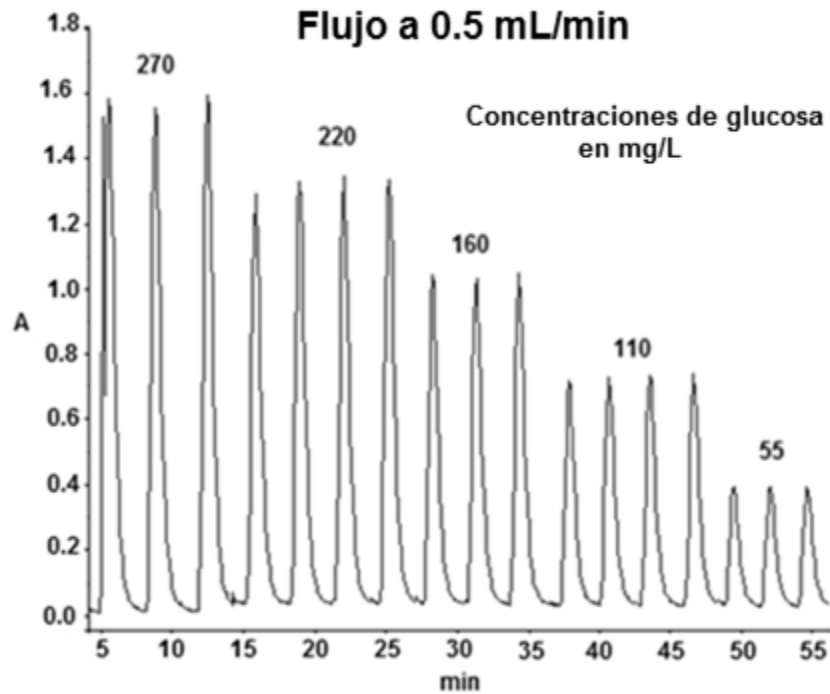


Figura 3.10. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 270, 220, 160, 110 y 55 mg/L, en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Utilizando un flujo de 0.5 mL/min.

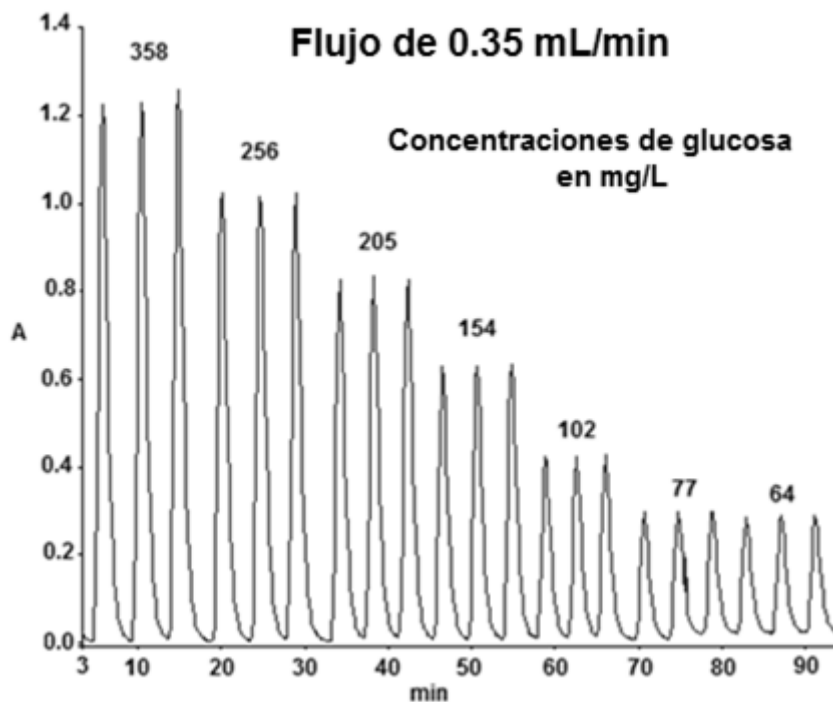
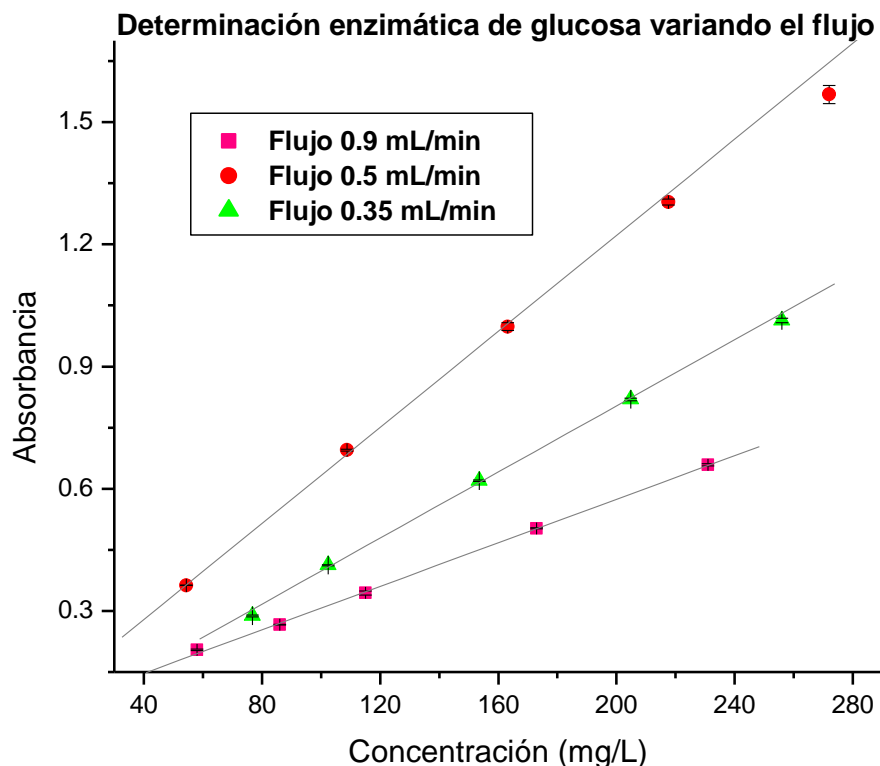


Figura 3.11. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 358, 256, 205, 154, 102, 77 y 64 mg/L, en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Utilizando un flujo de 0.35 mL/min.

Los datos de los diagramas obtenidos se encuentran en las **tablas A16, A17 y A18**. A partir de éstos se construyó un gráfico con las curvas de calibración correspondientes que se muestra en la **gráfica 3.9**.



Gráfica 3.9. Curvas de calibración de glucosa, para la determinación enzimática de glucosa en FIA, modificando las condiciones de flujo: (■) flujo 0.9 mL/min, (●) flujo 0.5 mL/min y (▲) flujo de 0.35 mL/min.

En la **tabla 3.5** se muestran los parámetros obtenidos de las curvas obtenidas en la **gráfica 3.9**.

Tabla 3.5. Parámetros correspondientes a las curvas de calibración de glucosa a diferentes flujos.

Flujo	Pendiente	Ordenada	R	Inyecciones por hora
0.90mL/min	0.00274	0.0335	0.9992	31
0.50mL/min	0.00555	0.0800	0.9990	20
0.35mL/min	0.00398	0.0005	0.9994	14

A un flujo de 0.9 mL/min el tiempo de análisis es menor, mientras la sensibilidad obtenida es la más baja de las tres condiciones, esto se debe a que durante el

tiempo de contacto de la disolución estándar con el reactor enzimático, la cantidad de glucosa oxidada a ácido glucónico y la formación de peróxido de hidrógeno son menores, al igual que la concentración de triyoduro y por consiguiente la señal analítica registrada.

Como se observa en la **tabla 3.5**, el flujo al que se obtiene una mejor sensibilidad de la determinación de glucosa es a 0.5 mL/min, debido a que aumenta el tiempo de residencia de la disolución de glucosa en el reactor enzimático, esto permite que una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno y por consiguiente de triyoduro sea formada, incrementando así la señal analítica obtenida.

A pesar de que a un flujo de 0.35 mL/min, se esperaría que la señal analítica fuera mayor que a 0.5 mL/min, debido al incremento en el tiempo de residencia de la disolución de glucosa en el reactor enzimático, no es así, ya que la señal obtenida es menor a este flujo. Esto se atribuye a que existe una mayor dispersión en la muestra, debida al incremento del tiempo de residencia del bolo inyectado en el sistema FIA.

Se eligió trabajar con el flujo de 0.5 mL/min debido ya que se obtiene un mayor avance la reacción y la menor dispersión física. La capacidad de muestreo es de 20 inyecciones por hora.

3.2.3. Determinación de los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal.

Para llevar a cabo la determinación del límite de detección y cuantificación y el intervalo lineal, se prepararon e inyectaron disoluciones de glucosa en un intervalo de concentración de 8-280 mg/L, en la configuración para la determinación enzimática de glucosa con el flujo optimizado (0.5 mL/min). En la **figura 3.12** se muestra el fiagrama obtenido.

Los datos del fiagrama obtenido se encuentran en la **tabla A19**. A partir de éstos se construyó un gráfico con la curva de calibración correspondiente que se muestra en la **gráfica 3.10**.

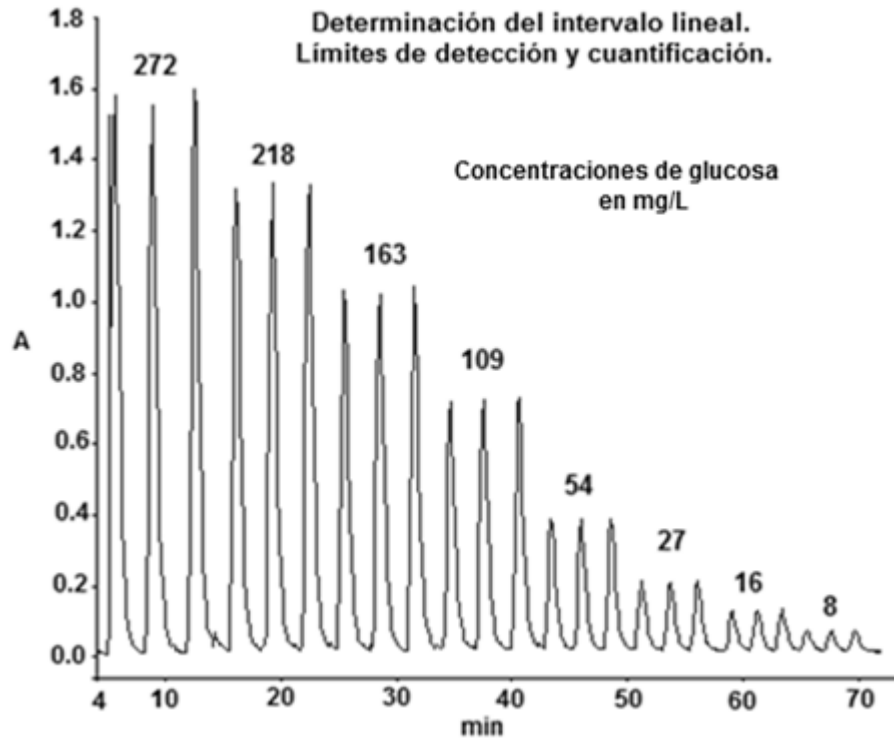
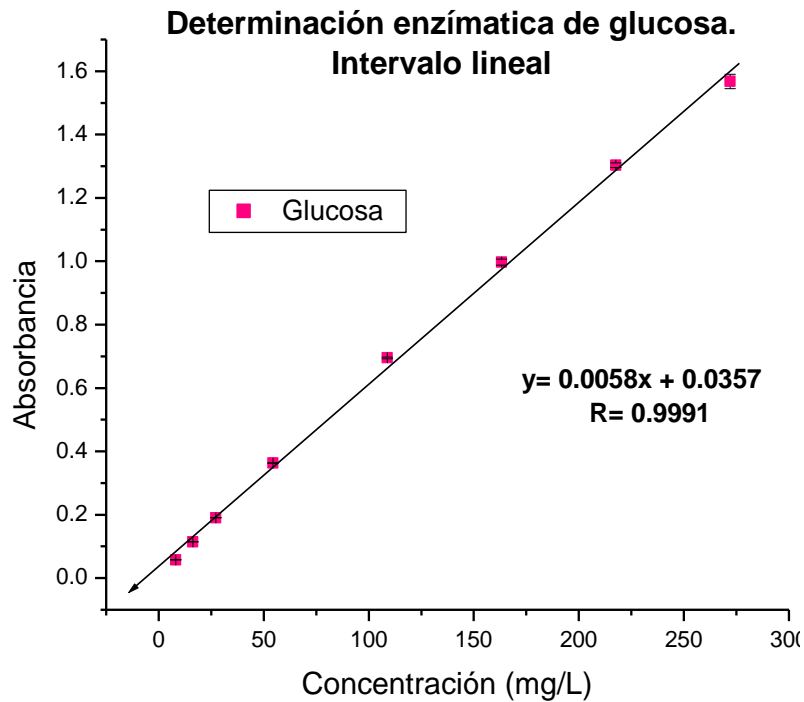
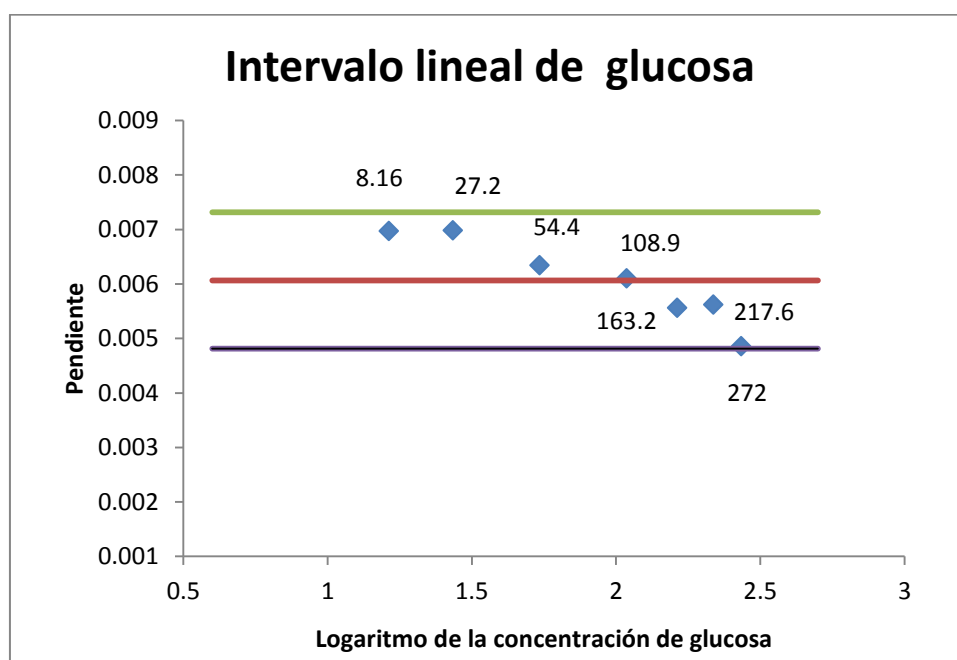


Figura 3.12. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa de 272, 218, 163, 109, 54, 27, 16 y 8 mg/L, en la configuración FIA para la determinación enzimática de ésta. Con la finalidad de determinar el intervalo lineal, los límites de detección y cuantificación.



Gráfica 3.10. Curvas de calibración de (■) glucosa, para la determinación enzimática de glucosa en FIA, las concentraciones inyectadas se encuentran dentro del intervalo lineal.

En la **gráfica 3.10**, se observa que la respuesta es lineal dentro del intervalo de 270-8 mg/L. Esto se puede corroborar graficando la sensibilidad (calculada como la pendiente entre dos puntos consecutivos), contra el logaritmo de la concentración, fijando un intervalo de tolerancia, definido como el promedio de la sensibilidad ± 2 veces la desviación estándar. A partir de esto se construyó la **gráfica 3.11**, como se observa en ésta ningún valor excede el intervalo de variación, por lo que la señal es lineal en todo el intervalo. Los datos con los que se construyó la gráfica se encuentran en la **tabla B4**.



Gráfica 3.11. Se presenta la gráfica de pendiente contra el logaritmo de la concentración, con la finalidad de demostrar que la respuesta es lineal en el intervalo de 270-8 mg/L de glucosa.

Siendo este intervalo de concentraciones muy amplio (2 órdenes de magnitud) no hay la necesidad de preparar disoluciones de mayor concentración, ya que se esperan concentraciones de glucosa dentro de este intervalo.

Con los datos obtenidos de la curva de calibración se calcula el LD y el LC como se describe al inicio del **apéndice B**, los cálculos correspondientes se encuentran en la **tabla B3**. Se obtuvieron los siguientes resultados:

LD: 4.34 mg/L

LC: 8.65 mg/L

3.3. Aplicación de la metodología propuesta al análisis de muestras de tequilas y mostos de agave.

El método propuesto para la determinación de fructosa por medio de la reacción del DNS en un sistema FIA y la determinación enzimática de glucosa se aplicó al análisis de 25 muestras de tequila, 9 mostos y 2 jugos de agave.

En la **tabla 3.6** se comparan los límites de detección y cuantificación e intervalo lineal de cada uno de los azúcares.

Tabla 3.6. Características de las metodologías FIA, para la determinación de fructosa y glucosa.

Azúcar	Límite de detección	Límite de cuantificación	Intervalo lineal
Fructosa	0.58 mg/mL	1.14 mg/mL	1 – 6.9 mg/mL
Glucosa	4.34 mg/L	8.65 mg/L	8 – 270 mg/L

Las concentraciones utilizadas para la determinación de fructosa son 3 órdenes de magnitud más altas que las de la glucosa, este hecho resulta conveniente por la naturaleza de las muestras de mostos, en donde se espera que el contenido de fructosa sea mucho mayor que el de glucosa y así poder utilizar las mismas diluciones de las muestras para ambas determinaciones.

En cuanto a las muestras de tequila, no se espera un contenido alto de fructosa, por lo que las muestras se inyectaron sin diluir. Para la determinación de glucosa en tequilas, en el caso necesario se llevaron a cabo las diluciones pertinentes.

Las muestras de tequila que se utilizaron en el presente trabajo se enlistan en la **tabla 3.7**.

En cuanto a las muestras de mostos, se recibieron en una primera fecha 2 muestras de jugo de agave y 5 de mostos. A estas muestras se les determinó únicamente el contenido de fructosa. Posteriormente se recibieron 4 muestras más de mostos a los cuales se les determinó el contenido de fructosa y de glucosa.

Tabla 3.7. Lista de las muestras de tequila utilizadas para las determinaciones de fructosa y glucosa.

Clase	Categoría	Muestra	Etanol (% v/v)
Extra Añejo	100 %	A	36.2
		F	40.2
Añejo	100 %	E	40.0
		J	38.2
Reposado	Tequila	1	38.0
		2	35.3
		3	40.0
		4	43.0
Reposado	100 %	6	38.1
		7	35.0
		8	40.0
		B	35.0
		C	55.1
		D	48.0
Joven	100 %	H	35.5
		G	40.2
Blanco	Tequila	I	40.1
		5	35.0
Blanco	100 %	5A	40.0
		5B	40.0
		5C	40.0
		5D	55.0
		5E	50.5
		5F	41.4
		5G	40.1

Una vez optimizadas las condiciones para la determinación enzimática de glucosa y del DNS para fructosa, se procedió a la cuantificación de estos azúcares en las muestras de mostos y tequilas.

3.3.1. Evaluación del etanol como interferente en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.

Debido a que el etanol es uno de los principales constituyentes en las muestras de tequila y es susceptible a ser oxidado, se determinó la contribución éste sobre la altura de pico. Se prepararon disoluciones de etanol en un intervalo de concentraciones de 30-60 % v/v, que se inyectaron en la configuración FIA descrita en la **sección 2.1.2**. De las inyecciones realizadas se obtuvo el diagrama que se muestra en la **figura 3.13**.

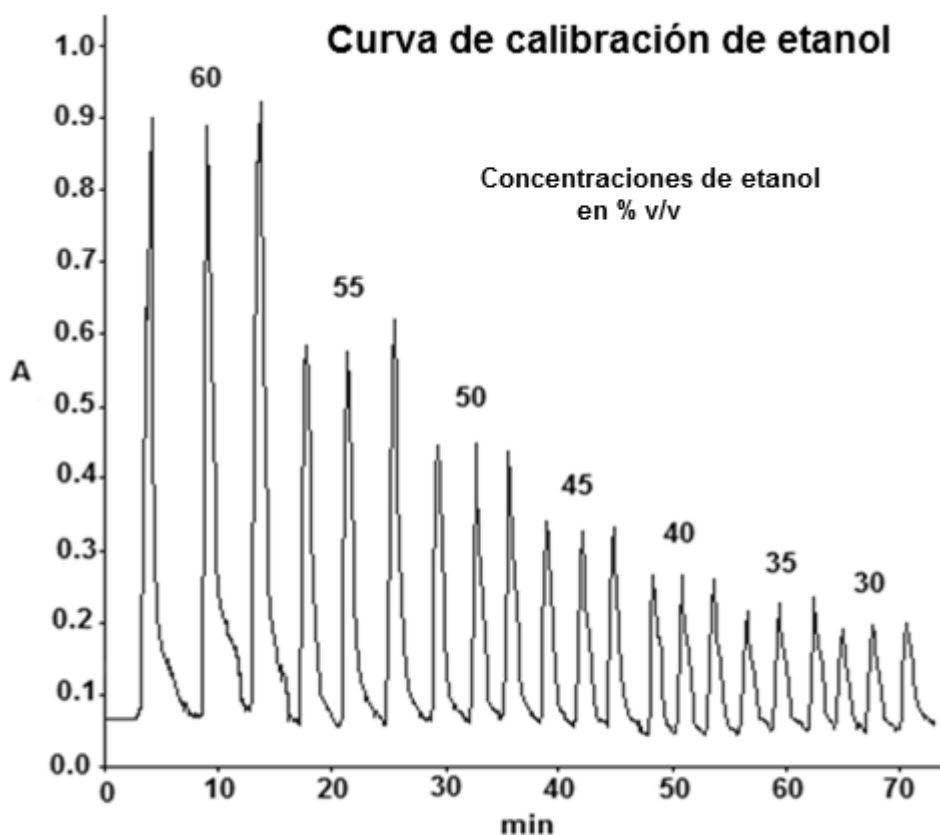
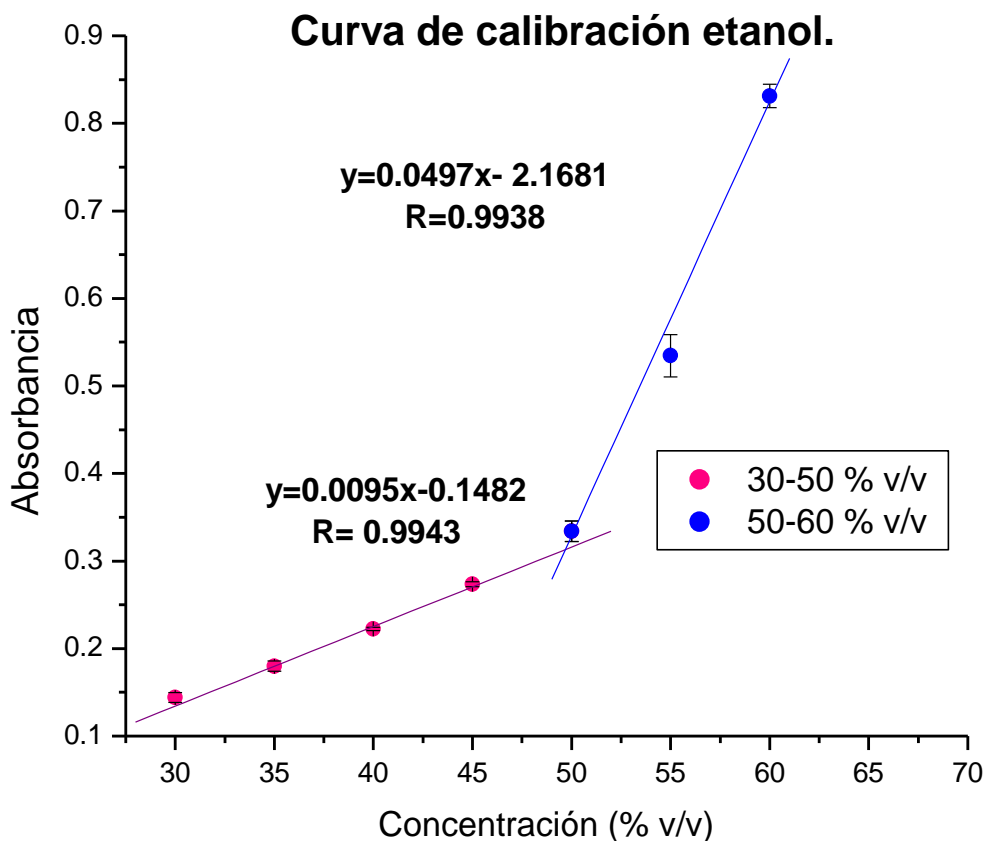


Figura 3.13. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de etanol de 60, 55, 50, 45, 40, 35 y 30 % v/v, en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino. Se registró la señal en el detector a $\lambda=480$ nm.

Los datos obtenidos del diagrama se encuentran en la **tabla A20**, a partir de estos se construyó la **gráfica 3.12**, donde se muestra la curva de calibración del etanol.



Gráfica 3.12. Curva de calibración de etanol, para la determinación de azúcares reductores empleando DNS en FIA, como se observa, existen dos intervalos lineales, uno que va de 30-50 % v/v que tiene una ecuación de la recta $y=0.0095x-0.1482$, y el otro que va de 50-60 % v/v, con una ecuación de la recta $y=0.0497x-2.1681$.

Como se observa en la **figura 3.13** y en la **gráfica 3.12**, el etanol reacciona con el DNS dando una señal en un intervalo de absorbancias entre 0.15 y 0.35, por lo que si en la determinación de fructosa en tequilas no se considera la contribución debida al etanol, se estará reportando un contenido de fructosa mayor. Por lo tanto para el análisis de fructosa en muestras de tequila es necesario elaborar una curva de calibración del etanol y corregir el valor de absorbancia de acuerdo al contenido de alcohol reportado.

3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en muestras de mostos de agave.

3.3.2.1. Evaluación del color de los mostos como interferente sobre la señal en la reacción de los azúcares reductores con el DNS.

Para determinar si el color de las muestras es un interferente en la cuantificación de fructosa en muestras de mostos, se inyectaron las muestras utilizadas para el análisis en la configuración FIA reemplazando el reactivo del DNS por agua desionizada. El contenido de fructosa esperado en las muestras de mostos es muy alto, por lo que es necesario diluirlas en una relación 1:50 – 1:25. Con estas diluciones, y considerando la dispersión controlada del bolo inyectado dentro de la configuración FIA, la contribución del color de las muestras a la absorbancia es despreciable, por lo que no es necesario realizar alguna corrección en la determinación.

3.3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en las muestras de tequila.

Para llevar a cabo la determinación de fructosa en las muestras de mostos, se inyectaron las disoluciones estándar de fructosa (1-8 mg/mL) y las muestras de mostos diluidos en la FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se determinó el contenido de fructosa directa y total, para esta última, se realizó un pre tratamiento de hidrolisis ácida sobre la muestra cómo se describe en la **sección 2.3.1**. Se obtuvieron los fiagramas correspondientes como el que se muestra a continuación en la **figura 3.14**. Como se observa en esta figura, fue necesario realizar distintas diluciones de las muestras para que la concentración de éstas quede dentro del intervalo de la curva de calibración.



Figura 3.14. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar fructosa (8, 6, 4, 3, 2 y 1 mg/mL) y las muestras de mostos (1, 2, 3 y 4), en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino. Se registró la señal en el detector a $\lambda=480$ nm.

Es importante mencionar que las muestras de mostos en fermentación y mostos muertos contienen etanol. A pesar de esto, no se realizó una corrección por el contenido de etanol en estas muestras, en principio porque no se conoce la concentración de éste en cada una y por otra parte el contenido máximo de etanol que puede tener un mosto muerto (ya terminada la fermentación) es de 13 a 15%, por ende el contenido alcohólico de un mosto en fermentación será aún menor; tomando en cuenta que las muestras se diluyeron para ser analizadas, el contenido de etanol en los mostos muertos sería igual o menor que 3 % v/v y para las mostos en fermentación menor que 0.6 % v/v.

Los resultados obtenidos de la determinación de fructosa en mostos se encuentran en las **tablas A21 y A22**.

El cálculo de la concentración de fructosa en mostos se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se calculó la concentración de fructosa en cada dilución de las muestras a partir de la curva de calibración.
- Se realizó la corrección de la misma por el efecto de la dilución de la muestra.

En la **tabla 3.8** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.8. Contenido de fructosa directa y total en mostos de agave.

	Identificación	Muestra	Fructosa directa* (mg/mL)	Fructosa total* (mg/mL)
FECHA 1	M1	Jugo de agave crudo	Presente	13.7 ± 1.0
	M2	Jugo de agave crudo	1.2 ± 0.2	14.8 ± 2.5
	M3	Mosto enriquecido en fermentación	179.6 ± 10.9	166.2 ± 21.9
	M5	Mosto en fermentación	168.8 ± 7.3	134.7 ± 19.1
	M6	Mosto inoculado en fermentación	104.6 ± 4.3	83.2 ± 6.5
	M7	Mosto muerto	16.0 ± 2.8	15.6 ± 4.0
	M4	Mosto muerto	36.6 ± 4.4	36.2 ± 1.7
FECHA 2	1	Mosto	293.6 ± 6.8	299.8 ± 20.7
	2	Mosto	207.1 ± 24.2	213.2 ± 10.3
	3	Mosto	180.1 ± 9.8	181.1 ± 16.9
	4	Mosto	124.1 ± 5.0	127.2 ± 11.7

*Se reporta la concentración de fructosa directa y total, como el promedio de fructosa en mg/mL ± el intervalo de confianza de cada muestra al 95 % de significancia, como se muestra en la siguiente fórmula: $\bar{x} \pm \frac{(t_{\alpha_{0.05}})S}{\sqrt{n}}$.

La diferencia de concentraciones de fructosa en las muestras de mostos 1, 2, 3 y 4, se debe principalmente al proceso de cocción que se llevó a cabo para obtenerlas; ya que si las cabezas de agave fueron cocidas en un horno de mampostería [43] el rendimiento, tanto del volumen de mosto como de la concentración de azúcares presente en éste, es menor debido a distintos factores como son:

- Dentro del horno de mampostería no hay una distribución uniforme del calor, lo que provoca que la hidrólisis de fructanos no sea uniforme.
- Existen pérdidas del mosto por escurrimiento de éste al interior del horno.
- Las cabezas de agave que están en contacto con las paredes del horno se carbonizan parcial o totalmente.
- No existe un control de la temperatura dentro del horno.

Cuando se utiliza una autoclave para llevar a cabo la hidrólisis térmica de los fructanos, la temperatura y la presión son controladas, permitiendo obtener mejores rendimientos tanto de volumen como de concentración de azúcares en mostos.

A partir de la concentración de fructosa cuantificada, podemos decir que muy probablemente las muestras 1, 2 y 3, con concentraciones mayores de fructosa fueron obtenidas cociendo las piñas en autoclaves, mientras la muestra 4 en horno de mampostería. Cabe mencionar que no se conoce el proceso de cocción por el cual se obtuvo cada mosto. Por otra parte se observa que en general la concentración de fructosa en estas muestras es mayor a las obtenidas en las muestras de mostos en fermentación.

Se encontró que en los mostos muertos la fructosa constituye alrededor del 1-3 % de éstos, siendo lógico, ya que una vez finalizada la fermentación existe una pequeña concentración de azúcares en los mostos que no se consume durante esta etapa. Al comparar las concentraciones de fructosa obtenidas, se puede decir que la fermentación en el caso de la muestra M7, es más eficiente que en M4, ya que el contenido de fructosa encontrado es menor, esto se puede deber a varios factores [44, 45], tales como:

- La procedencia de las muestras, ya que son de distintos productores de tequila.
- La concentración de azúcares inicial en los mostos.
- Los microorganismos utilizados para llevar a cabo el proceso de fermentación.

Este último es un factor crítico en la producción de tequila, ya que dependiendo del tipo de microorganismos presente será la cantidad de etanol producida. En muchas tequileras utilizan cepas de *S. cerevisiae* para llevar a cabo una fermentación controlada, mientras que otros productores dejan que sus fermentaciones se lleven en tinajas abiertas, de esta manera los mostos tienen contacto con distintos microorganismos presentes en el ambiente, que pueden producir más o menos etanol durante este proceso; tal es el caso de *Kluyveromyces marxianus UMPe-1*, esta levadura es capaz de fermentar los mostos de agave y producir una concentración mayor de etanol y de compuestos volátiles que algunas cepas de *S. cerevisiae*. [45]

Se calculó el intervalo de confianza de las concentraciones de fructosa al 95% en los mostos, y se encontró que en las muestras 1, 2, 3, 4, M4 y M7, no existe diferencia estadística entre la fructosa directa y total. Por lo tanto no es necesario llevar a cabo una hidrólisis ácida en las muestras de mostos y mostos muertos.

El decremento generalizado entre la concentración de fructosa directa y total en las muestras de mostos en fermentación (M3, M5 y M6), se puede explicar por las condiciones de medio ácido y temperatura de 70 °C durante la hidrólisis ácida, ya que, los azúcares libres comienzan a reaccionar formando productos de descomposición tales como el hidroximetilfurfural (HMF), alcoholes, aldehídos y otros productos propios de la reacción de Maillard [3, 46]. En estos mostos los valores no son comparables entre sí, ya que no se conoce el avance de la fermentación de cada uno, sólo se puede afirmar que son congruentes, ya que, el contenido de azúcares es mayor que en los mostos muertos. A pesar esta diferencia entre fructosa directa y total, se puede afirmar que no es necesario llevar a cabo un pre tratamiento de hidrólisis ácida, ya que, se observó un decremento en la concentración de fructosa total.

En los jugos de agave crudo se encontró que el contenido de fructosa total aumenta con relación al de fructosa directa. Este resultado era de

esperarse, ya que los jugos de agave se extraen de las piñas sin haber sido sometidas al proceso de cocción.

La fructosa en los jugos de agave presente antes de la hidrólisis ácida, se puede explicar por 3 razones:

- Los fructanos del agave fueron hidrolizados por acción de microorganismos presentes en la planta o en los instrumentos con que se jiman las piñas del agave.
- La planta de agave se encontraba llevando a cabo una parte específica del metabolismo de fructanos. [47]
- Por las condiciones del sistema FIA (temperatura de 85°C y medio alcalino), se pudo haber hidrolizado una mínima cantidad de fructanos, dando lugar a moléculas menos complejas con extremos reductores capaces de reaccionar con el DNS.

Para llevar a cabo la determinación de glucosa en las muestras de mostos, se inyectaron por triplicado las disoluciones estándar de glucosa y las muestras de mostos 1, 2, 3 y 4 con la misma dilución que se utilizaron para cuantificar fructosa con el DNS en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Se obtuvo el diagrama que se muestra en la **figura 3.15**. Es importante mencionar que se determinó glucosa directa y total, para determinar esta última se llevó a cabo un pre tratamiento de hidrólisis ácida en las muestras, como se indica en la **sección 2.3.1**.

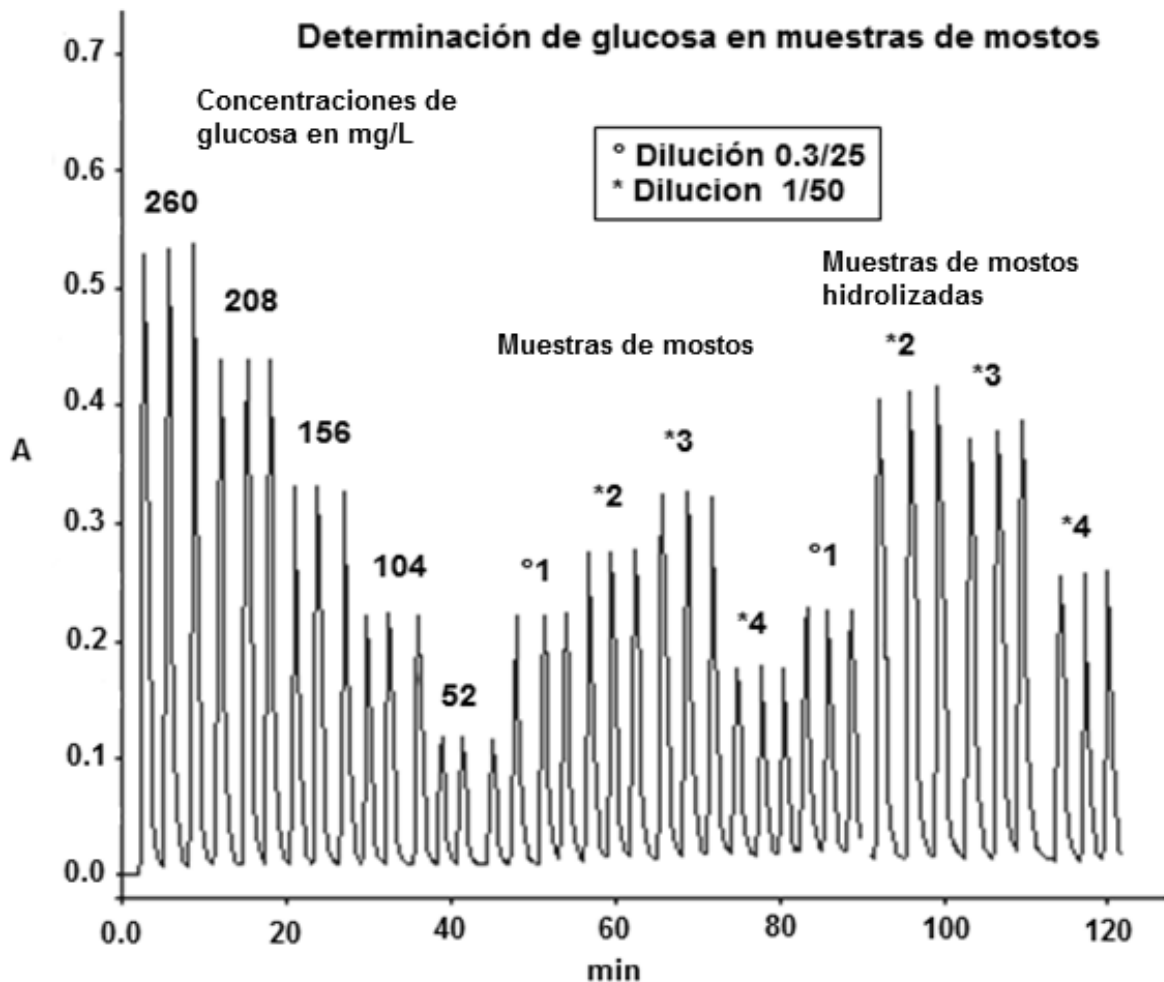


Figura 3.15. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa (260, 208, 156, 104 y 52 mg/L) y las muestras de mostos 1, 2, 3 y 4 diluidas, en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Se utilizó un flujo de 0.9 mL/min.

Los datos obtenidos de la determinación de glucosa en mostos se encuentran en la **tabla A23**.

La concentración de glucosa en muestras de mostos se calculó de la siguiente manera.

- A partir de la curva de calibración, se sustituyó el valor de absorbancia para cada muestra en la curva y se calculó la concentración de glucosa.
- Se realizó la corrección por la dilución realizada en la muestra.

Los resultados obtenidos se resumen en la **tabla 3.9**.

Tabla 3.9. Contenido de glucosa en muestras de mostos de agave.

Muestra	Glucosa directa mg/mL	Glucosa total mg/mL*
1	8.6 ± 0.2	8.4 ± 0.2
2	6.4 ± 0.1	9.7 ± 0.3
3	7.6 ± 0.2	8.8 ± 0.3
4	3.9 ± 0.2	6.0 ± 0.1

*Se reportó la concentración de glucosa directa y total, como el promedio de glucosa en mg/mL ± el intervalo de confianza de cada muestra al 95 % de significancia, como se muestra en la siguiente fórmula: $\bar{x} \pm \frac{(t_{\alpha_{0.05}})S}{\sqrt{n}}$.

En las muestras de mostos 2, 3 y 4, se observa un incremento en la concentración de glucosa después de la hidrólisis ácida, esto se puede atribuir a que existe una pequeña cantidad de fructanos que no fue hidrolizada durante el proceso de cocción de las piñas de agave. Esta información se corrobora con los datos obtenidos en la **tabla 3.10**, ya que ahí se reportó un ligero incremento en el contenido de fructosa total en relación con la directa.

En cuanto a la muestra 1, a pesar de que se observa un decremento de la concentración de glucosa total en comparación con la directa, el valor obtenido se encuentra dentro del intervalo de confianza de la glucosa directa, por lo tanto no existe diferencia estadística entre el contenido de glucosa directa y total en esta muestra. Como era de esperarse la concentración de glucosa en los mostos de agave muy baja.

Con la finalidad de hacer una comparación entre el contenido de fructosa y glucosa en las muestras de mostos, se elaboró la **tabla 3.10**, donde se muestra la concentración promedio de fructosa y glucosa obtenido, la relación fructosa glucosa que existe (F/G), la concentración total de azúcares (F+G) y el porcentaje respectivo que constituye cada azúcar en éstas.

Tabla 3.10. Comparación de resultados de fructosa y glucosa en muestras de mostos de agave.

Muestra	Fructosa mg/mL*	Glucosa mg/mL*	Relación F/G	F+G	% glucosa	% fructosa	
Directa	1	293.6	8.6	34	302.2	2.9	97.1
	2	207.1	6.4	32	213.5	3.0	97.0
	3	180.1	7.6	24	187.6	4.0	96.0
	4	124.1	3.9	32	128.1	3.1	96.9
Total	1	299.8	8.4	36	308.2	2.7	97.3
	2	213.2	9.7	22	222.9	4.3	95.7
	3	181.1	8.8	21	189.9	4.6	95.4
	4	127.2	6.0	21	133.2	4.5	95.5

*Se reportó la concentración promedio de glucosa directa y total.

Como se indica en la **tabla 3.10**, la glucosa constituye alrededor del 3 a 5 % del peso de los azúcares presentes en el mosto de agave, por lo tanto la fructosa constituye de un 95 a 97 % de éstos. En la determinación de azúcares directos se observa que la relación fructosa glucosa es mayor que en azúcares totales debido a que existe un incremento en el contenido de glucosa mientras que en fructosa el cambio no es tan significativo.

Debido a que las muestras de mostos analizadas son provenientes del agave, la relación entre fructosa y glucosa proporciona una idea de la composición de los azúcares en la muestras, ya que si el contenido de glucosa es mayor, la relación disminuye y muy probablemente los mostos se encuentren enriquecidos con azúcares distintos a los provenientes del agave.

Con el fin de demostrar que la glucosa no actúa como interferente durante la determinación de fructosa en mostos con el DNS, en la **tabla 3.11** se muestran los valores de concentración obtenidos de las inyecciones de las muestras de mostos sin realizar la corrección de éstos por el efecto de dilución de la muestra.

Tabla 3.11. Concentración de glucosa en mostos diluidos.

Muestra	Glucosa directa mg/mL	Glucosa total mg/mL
1	0.104	0.101
2	0.128	0.193
3	0.151	0.176
4	0.078	0.120

*Se reportó la concentración promedio de glucosa directa y total.

En la **sección 3.1.2, figura 3.3** podemos observar que el estándar más bajo de glucosa que se inyectó en la configuración para la determinación de azúcares reductores por el método del DNS fue de 3.5 mg/mL ($A=0.0543$). Las concentraciones de glucosa encontradas en las muestras de mostos son entre 15 – 30 veces menores a esta concentración, por lo que la señal que se obtendría estaría por debajo del límite de detección.

Para corroborar esto, se utilizaron los datos del diagrama de la **figura 3.3** para calcular el límite de detección y cuantificación de la glucosa utilizando la determinación de azúcares reductores con DNS en FIA. Los límites de detección y cuantificación se determinaron como se describe al inicio del apéndice B. Los cálculos correspondientes se muestran en la tabla B5.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

LD: 0.83 mg/mL

LC: 1.63 mg/mL

3.3.3. Determinación de fructosa y glucosa en muestras de tequila.

3.3.3.1. Evaluación del efecto de la matriz en muestras de tequila.

Para determinar el efecto de la matriz sobre la cuantificación de fructosa en tequila, se siguió el procedimiento descrito en la **sección 2.3.2.1.2**.

Las disoluciones estándar de fructosa, etanol y las muestras de tequila fortificadas y sin fortificar, se inyectaron en la configuración FIA para la determinación de fructosa con DNS. Se obtuvo el diagrama que se muestra en la **figura 3.16**.

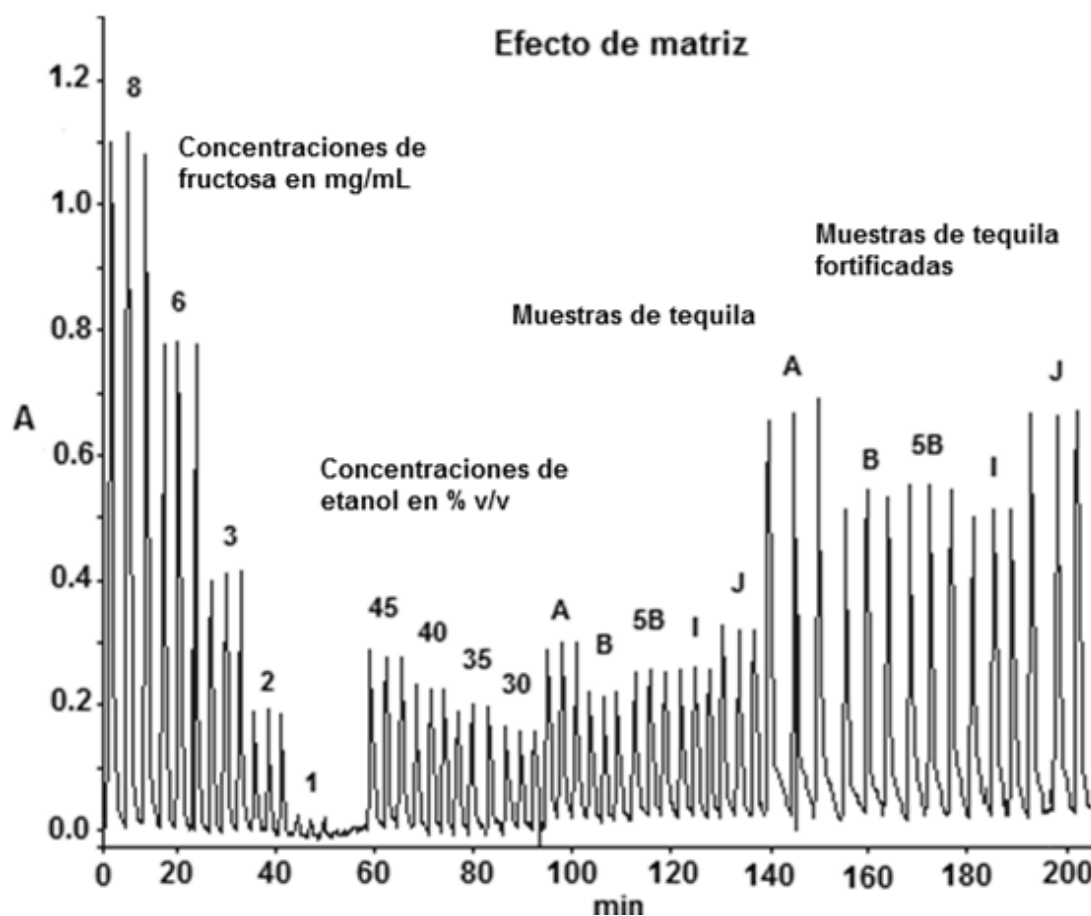


Figura 3.16. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de fructosa (8, 6, 3, 2 y 1 mg/mL) y etanol (45, 40, 35 y 30 % v/v), muestras A, B, 5B, I y J, de tequila con y sin fortificar en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino, a $\lambda=480$ nm.

Los datos obtenidos a partir de éste diagrama se encuentran en la **tabla A24**. Para explicar el cálculo del % de recobro, se utilizará como ejemplo los datos de la muestra A.

Cálculo de la concentración de fructosa en muestras de tequila sin fortificar:

Con el valor del contenido alcohólico de la muestra, se calculó la absorbancia correspondiente de cada muestra inyectada por triplicado, utilizando la curva de calibración del etanol.

Muestra	Absorbancia			% etanol
	A	0.2799	0.2808	

Ecuación de la curva de etanol: $y = 0.0074x - 0.0611$

El valor de etanol se sustituye en la ecuación anterior:

$$y = 0.00074 * (36.2) - 0.0611 = \mathbf{0.2060}$$

El valor de absorbancia obtenido, se resta a los valores de absorbancia de la muestra A. Se obtiene la absorbancia corregida.

Absorbancia corregida	0.0739	0.0748	0.0730
------------------------------	--------	--------	--------

Este valor de absorbancia corregida, se sustituye en la ecuación de la curva de calibración de la fructosa $y=0.1563x-0.1463$, para obtener la concentración de fructosa en la muestra de tequila.

$$x = (0.0739 + 0.1463) / 0.1563 = 1.41 \text{ mg/mL}$$

Fructosa mg/mL			Promedio mg/mL
1.41	1.42	1.40	1.41

Cálculo de la concentración de fructosa en muestras de tequila fortificadas: Con el valor del contenido alcohólico corregido (ya que se utilizaron 9.8 mL de tequila y se aforaron a 10 mL para preparar las muestras fortificadas), se calculó la absorbancia correspondiente utilizando la curva de calibración del etanol.

Muestra	Absorbancia			% etanol
A fortificada	0.6265	0.6462	0.6499	35.5

Ecuación de la curva de etanol: $y = 0.0074x - 0.0611$

El valor de la concentración de etanol se sustituye en la ecuación anterior:

$$y = 0.00074 * (35.5) - 0.0611 = \mathbf{0.2006}$$

El valor de absorbancia obtenido, se resta a los valores de absorbancia de la muestra A. Se obtiene la absorbancia corregida.

Absorbancia corregida	0.4259	0.4456	0.4492
------------------------------	--------	--------	--------

Este valor de absorbancia corregida, se sustituye en la ecuación de la curva de calibración de la fructosa $y = 0.1563x - 0.1463$, para obtener la concentración de fructosa en la muestra de tequila.

$$x = (0.4259 + 0.1463) / 0.1563 = \mathbf{1.41 \text{ mg/mL}}$$

Fructosa mg/mL	3.66	3.79	3.81
-----------------------	------	------	------

Cálculo del por ciento de recobro:

Ya que las muestras fortificadas están constituidas en un 98 % de tequila, se calculó la concentración de la fructosa proveniente del tequila, de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Fructosa proveniente del tequila} &= (1.41 \text{ mg/mL} * 9.8 \text{ mL}) / 10 \text{ mL} \\ &= \mathbf{1.38 \text{ mg/mL}} \end{aligned}$$

A la concentración de fructosa de las muestras de tequila fortificada, se le restó la concentración de fructosa proveniente del tequila y se obtiene la fructosa recobrada.

$$\text{Fructosa recobrada} = 3.66 \text{ mg/mL} - 1.38 \text{ mg/mL} = \mathbf{2.28 \text{ mg/mL}}$$

Fructosa recobrada (mg/mL)	2.28	2.41	2.43
-----------------------------------	------	------	------

Como se mencionó anteriormente, a cada muestra fortificada se le adicionó una concentración de 2.39 mg/mL. El porcentaje de recobro se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ recobro} = (\text{Fructosa recobrada} * 100) / \text{Fructosa adicionada}$$

$$\% \text{ recobro} = (2.28 * 100) / 2.39 = 95.3 \%$$

El % de recobro en la muestra A es de:

				Promedio
% recobro	95.3	100.6	101.6	99.1

Los resultados del % de recobro de las muestras de tequila analizadas se muestran en la **tabla 3.12**.

Tabla 3.12. Recobro en las muestras de tequila.

Muestra	Fructosa en tequila (mg/mL)	Fructosa en tequila fortificado (mg/mL)	Fructosa adicionada (mg/mL)	Fructosa recobrada (mg/mL)	% de recobro
A	1.41	3.75	2.39	2.37	99.1
B	No detectado	2.95	2.39	2.95	123.4
5B	No detectado	2.85	2.39	2.85	119.2
I	No detectado	2.58	2.39	2.58	107.9
J	1.43	3.69	2.39	2.29	95.8

Como se observa en la **tabla 3.12**, las muestras A y J (donde el contenido de fructosa es cuantificable), se encontró que el recobro es cercano al 100 %; mientras que en las muestras restantes, el % de recobro es mayor al 100 %, esto se debe a que la concentración presente en estas muestras está por debajo del límite de detección (0.58 mg/mL) y no fue cuantificada, lo que se puede verificar al calcular la diferencia entre la concentración de fructosa en los tequilas fortificados y la fructosa adicionada, los valores obtenidos son menores a 0.56 mg/mL.

Debido a que el recobro en todos los casos es muy cercano al 100 %, el efecto de la matriz es despreciable para la cuantificación de fructosa con DNS en FIA.

3.3.3.2. Determinación de fructosa y glucosa en las muestras de tequila.

Para llevar a cabo la determinación de fructosa en las muestras de tequila, se inyectaron las disoluciones estándar de fructosa (1-8 mg/mL), etanol (35-60 % v/v) y las muestras de tequila en la configuración FIA para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se obtuvo el fiagrama que se muestra en la **figura 3.17**. Es importante mencionar que únicamente se determinó fructosa directa.

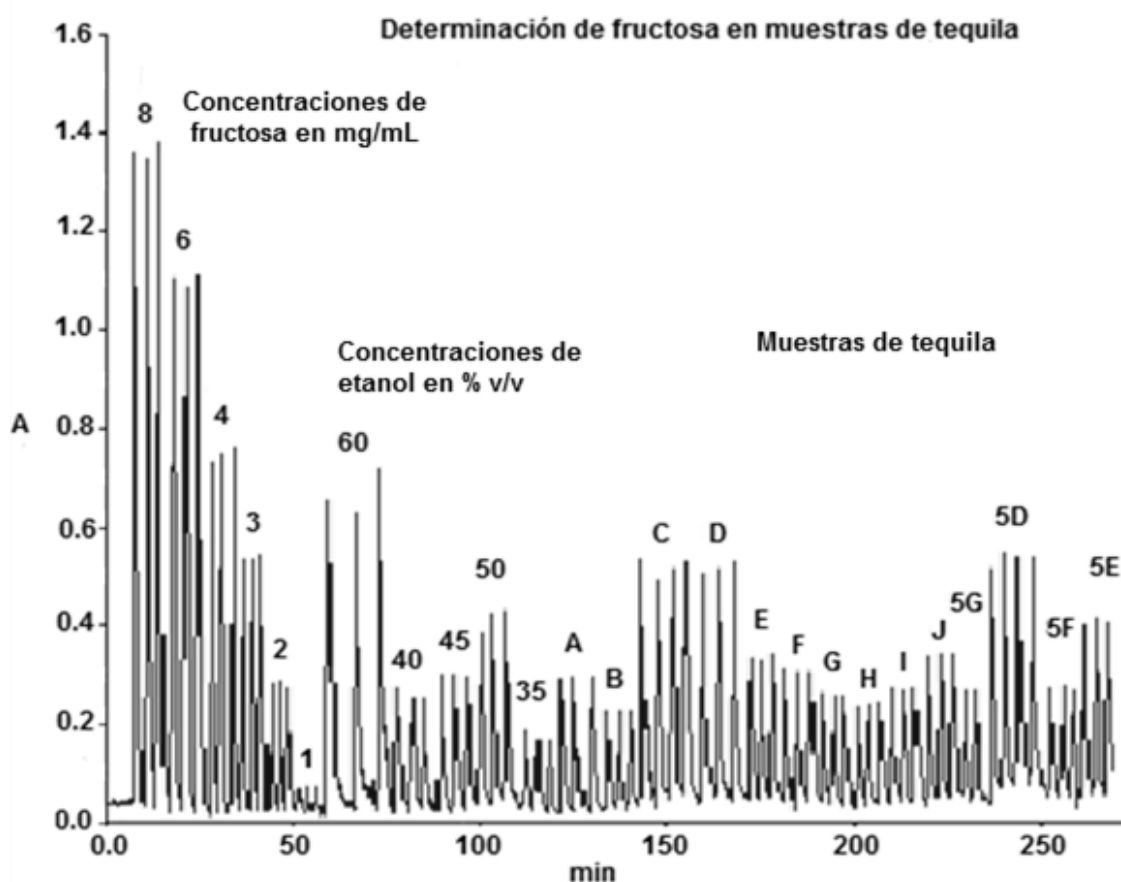


Figura 3.17. Fiagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de fructosa (8, 6, 4, 3, 2 y 1 mg/mL) y etanol (60, 50, 40, 45 y 3.5 % v/v), las muestras de tequila (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, 5G, 5D, 5F y 5E), en la configuración FIA, para la determinación de azúcares reductores con DNS. Se utilizó como reactivo al DNS en medio alcalino, a $\lambda=480$ nm.

Los datos obtenidos de los fiagramas se encuentran en las **tablas A25** y **A26**. A partir de éstos se construyeron las curvas de calibración de fructosa y etanol. La concentración de fructosa en las muestras de tequila, se calculó de la siguiente manera:

- Con el valor del contenido alcohólico, se calculó la absorbancia correspondiente utilizando la curva de calibración de etanol.
- A la altura de pico de la muestra, se le restó el valor correspondiente a la absorbancia debida al etanol.
- Con el valor de absorbancia corregida se calcula el contenido de fructosa utilizando la curva de calibración obtenida.

Para llevar a cabo la determinación de glucosa en las muestras de tequila, se inyectaron las disoluciones estándar de glucosa (8-270 mg/L) las muestras de tequila en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Se obtuvo el diagrama que se muestra en la **figura 3.18**. Es importante mencionar que únicamente se determinó glucosa directa.

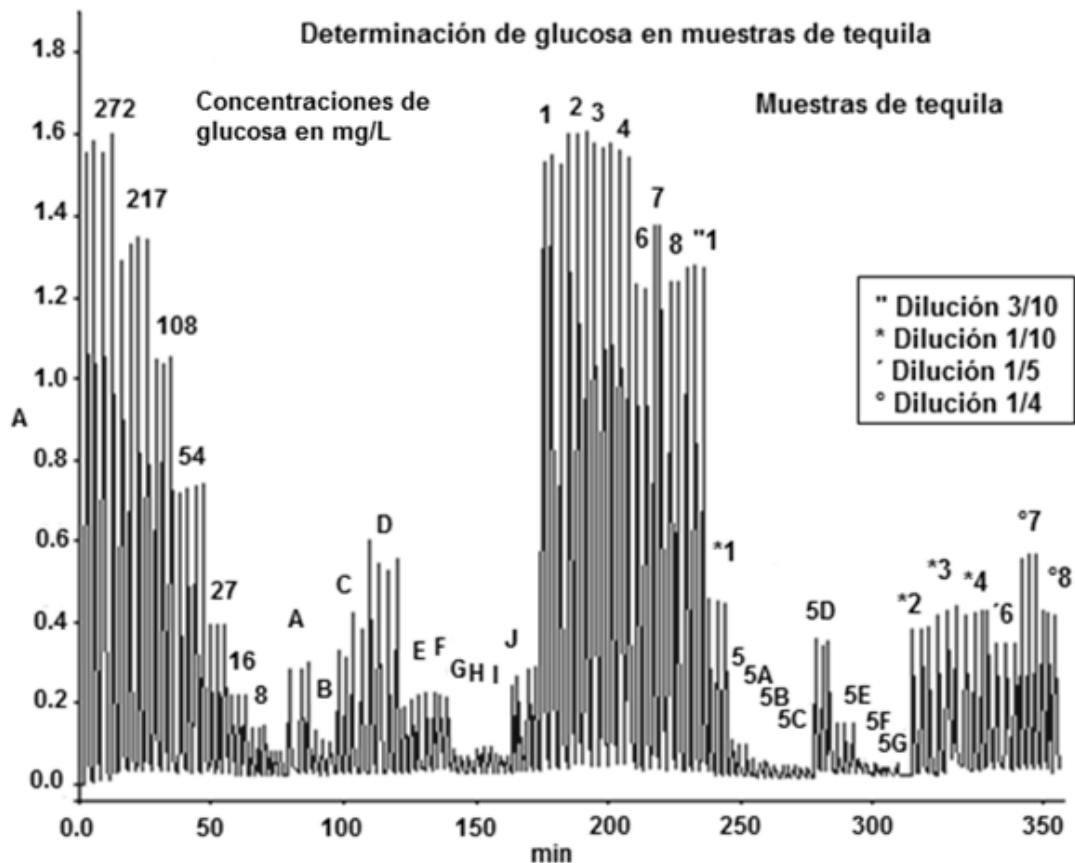


Figura 3.18. Diagrama obtenido de inyectar disoluciones estándar de glucosa (272, 217, 108, 54, 27, 16 y 8 mg/L) y todas las muestras de tequila, en la configuración FIA para la determinación enzimática de glucosa. Utilizando un flujo de 0.9 mL/min. Se identificó a las muestras diluidas de tequila, dependiendo el grado de dilución, con los siguientes símbolos: “, *, ˆ y ˚.

Como se observa en la **figura 3.18** fue necesario realizar diluciones a las muestras 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 para que la concentración de éstas estuviera dentro del intervalo de la curva de calibración. Los resultados obtenidos de la determinación de glucosa en tequilas se encuentran en la **tabla A27**.

La concentración de glucosa en muestras de tequila se calculó a partir de la curva de calibración, y se realizó la corrección debida a la dilución efectuada en algunas muestras.

Se elaboró la **tabla 3.13**, donde se muestran los resultados de la cuantificación de glucosa y fructosa en tequilas blancos.

Clase	Categoría	Muestra	Fructosa mg/mL*	Glucosa mg/L*
Blanco	Tequila	5	No detectado	Detectado
	Tequila 100 % agave	5A	No detectado	No detectado
		5B	No detectado	No detectado
		5C	No detectado	No detectado
		5D	No detectado	48.3 ± 5.6
		5E	No detectado	14.8 ± 0.2
		5F	No detectado	No detectado
		5G	No detectado	No detectado

*Se reportó la concentración de fructosa y glucosa directa, como el promedio de cada azúcar ± el intervalo de confianza de cada muestra al 95 % de significancia, como se muestra en la siguiente fórmula: $\bar{x} \pm \frac{(t_{\alpha_{0.05}})S}{\sqrt{n}}$.

En la determinación de fructosa con el DNS, se encontró que en las muestras de tequila blanco la concentración de fructosa es no detectable y las señales generadas por las muestras son debidas en su totalidad al contenido alcohólico de las mismas. Se encontró una concentración muy baja de glucosa e los tequilas blancos, esto se puede deber a un fenómeno que ocurre durante la destilación conocido como arrastre por vapor que se caracteriza por la formación de puentes de hidrógeno entre el vapor de agua y los grupos OH de los azúcares aun presentes en los mostos muertos. Por otra parte también se puede explicar mediante la adición de

azúcares para suavizar el sabor del tequila blanco y hacerlo menos agresivo al paladar.

Como se mencionó anteriormente existen dos procesos mediante los cuales es posible obtener tequilas madurados.

El primero es el añejamiento del tequila blanco en barricas de roble o encino por un periodo mínimo de 2 meses (el tiempo depende del tipo de tequila). Durante este proceso, el tequila es capaz de absorber aromas y sabores propios de la madera, llevar a cabo un proceso de oxidación para la formación de compuestos aromáticos como esteroides, aldehídos y ácidos orgánicos. Para que las barricas se puedan utilizar en este proceso, es necesario llevar a cabo un mantenimiento sobre éstas, mismo que consta en quemar las paredes internas de la barrica, de esta manera se forman compuestos capaces de brindar color y propiedades aromáticas (notas ahumadas) a los tequilas.

El segundo llamado "abocado" consiste en la adición de uno o más de los siguientes ingredientes: color caramelo, extracto de roble o encino natural, glicerina y jarabe a base de azúcar. Con este proceso el tequila es capaz de adquirir las características sensoriales de un tequila reposado, ya que, el colorante caramelo es capaz de suavizar y brindar color al producto; al utilizar esencias de madera, no es necesario que este permanezca en una barrica ya que adquirió los aromas de las maderas. Estos procesos son capaces de aportarle a un tequila blanco las características de un tequila reposado, suavizando el sabor e impartir color.

Con la finalidad de hacer una comparación entre el contenido de azúcar en los tequilas y el color (debido al proceso de maduración), se elaboró la **tabla 3.14**, donde se muestra el resumen de los resultados de glucosa y fructosa de los tequilas extra añejos, añejos, reposados y jóvenes; se adicionó una columna donde se colocó una imagen del color de cada muestra de tequila. El contraste de las imágenes con los colores del tequila está aumentado con la finalidad de sea más fácil su visualización.

Tabla 3.14. Comparación de los resultados obtenidos de fructosa y glucosa directa en las muestras de tequilas madurados.

Clase	Categoría	Muestra	Color	Fructosa mg/mL	Glucosa mg/L
Extra añejo	100 % agave	A		1.4± 0.0	39.5 ± 3.0
		F		No detectado	24.9 ± 1.9
Añejo	100 % agave	E		No detectado	24 ± 4.6
		J		1.4 ± 0.1	36.5 ± 3.6
Reposado	Tequila	1		1.7± 0.2	695.8 ± 8.6
		2		1.5± 0.1	556.8 ± 2.6
		3		1.8 ± 0.2	613.1 ± 51.5
		4		1.9± 0.2	616.5 ± 2.5
Reposado	100 % agave	6		Presente	234.5 ± 9.3
		7		1.2 ± 0.2	338.3 ± 5.4
		8		Presente	240.1 ± 10.9
		B		No detectado	9.2 ± 3.9
		C		No detectado	45.5 ± 4.0
		D		1.3 ± 0.1	84.6 ± 2.9
		H		No detectado	Presente
Joven	100 % agave	G		No detectado	No detectado
		I		No detectado	No detectado

*Se reportó la concentración de fructosa y glucosa directa, como el promedio de cada azúcar ± el intervalo de confianza de cada muestra al 95 % de significancia, como se muestra en la siguiente fórmula: $\bar{x} \pm \frac{(t_{\alpha_{0.05}})S}{\sqrt{n}}$.

Como se puede observar en la **tabla 3.14.**, tanto el contenido de fructosa como el de glucosa son los más altos para las muestras de tequila reposado. Al realizar una comparación entre el color de las muestras y el contenido de azúcares, se encontró que en los tequilas reposados 1, 2, 3 y 4, el color está relacionado con el grado de abocado en éstos, ya que, al adicionar azúcares (ya sea como caramelos o mieles), estos van a modificar las características del tequila blanco, dándole color (por los compuestos presentes en los caramelos) y suavizando el sabor por el gusto dulce que tienen éstos.

En comparación con los tequilas anteriormente mencionados, se observa que las muestras 6, 7 y 8 tiene una coloración menos intensa y que la concentración de glucosa y fructosa también es menor, por lo que se puede decir que igualmente estas muestras fueron abocadas con azúcares, pero en menor grado que las anteriores.

El no detectar fructosa pero si una pequeña cantidad de glucosa, en algunas muestras de tequila reposado (E, B, C y H), añejo (E) y extra añejo (F), puede significar que no necesariamente el tequila fue abocado y paso por un proceso de maduración en barricas de roble y así adquirió las características de color y sabor propias de la clase de tequila. Por otra parte estos tequilas pudieron ser abocados con azúcares o miles que tuvieran una concentración muy baja de fructosa o la adición de éstas fue en una proporción muy pequeña, al grado que la concentración de fructosa no es detectada con la metodología propuesta.

En el caso de las muestras de tequilas jóvenes, no se detectó fructosa ni glucosa, ya que como se mencionó anteriormente estos provienen de la dilución de un tequila madurado con tequilas blancos, aunque también existe la posibilidad de que en lugar de ser abocados con azúcares, se utilizaron aceites esenciales de maderas y colorantes (distintos al caramelo) para darles las características necesarias propias de esta clase de tequilas.

Conclusiones.

La determinación de azúcares en muestras de mostos de agave resulta un problema complejo, como quedó demostrado, la hidrólisis de los fructanos del agave no es completa[3, 46]; es por ello que ni el método por vía húmeda ni el propuesto en este trabajo, pueden evaluar de forma completa la cantidad de azúcares en el agave, a diferencia de los azúcares provenientes de otros productos, tales como la caña.

Para conocer el rendimiento de etanol producido por kilogramo de cabeza de agave, es necesario plantearse las siguientes preguntas: ¿los azúcares complejos que quedan en el mosto son fermentables o no?, ¿Se puede aún producir etanol usando a *S. cerevisiae* para la fermentación?, ¿Participan en la fermentación otras levaduras distintas a ésta, que sean capaces de hidrolizar los azúcares complejos residuales aún después de proceso de cocción?

Es así que la evaluación correcta de la cantidad de alcohol que se puede producir por Kg de piñas de agave depende las condiciones particulares de cada proceso de agave-tequila.

A pesar de lo anterior mencionado, se ha podido generar un proceso analítico robusto, sencillo, rápido y barato para determinar el contenido de azúcares en mostos de agave y tequilas, que presenta un gran número de ventajas sobre la metodología oficial mexicana.

Para esta metodología:

- Se confirmó que la temperatura juega un papel muy importante para la determinación de azúcares reductores en FIA utilizando como reactivo el DNS.
- Tanto la metodología para la determinación de fructosa con DNS en FIA como la determinación de glucosa por vía enzimática en FIA, permiten cuantificar fructosa y glucosa satisfactoriamente en las muestras de tequila y mostos de agave.
- Sí la determinación de azúcares con DNS en FIA se desea aplicar a otro tipo de muestras se debe de adaptar la metodología al azúcar presente en la misma.

- La determinación de azúcares reductores por un método FIA tiene una capacidad de 15 inyecciones por hora (1 inyección cada cuatro minutos). Mientras que la metodología para la determinación de glucosa por vía enzimática es de 20 inyecciones por hora (1 inyección cada 3 minutos).
- El contenido de etanol en tequila, actúa como interferente en la determinación de fructosa utilizando el método de DNS.
- El color en las muestras de mostos no interfiere de manera significativa ya que las muestras requieren dilución para ser analizadas.
- La concentración de glucosa en mostos no representa un interferente durante la cuantificación de fructosa con el DNS, ya que, ésta se encuentra en una proporción mucho menor que la fructosa, por otra parte el grado de dilución al que se analizan las muestras provoca que la concentración de ésta disminuya al momento del análisis.
- Los mostos no necesitan un pre-tratamiento de hidrólisis ya que la mayoría de los azúcares complejos se encuentran prácticamente hidrolizados, únicamente es necesario realizarlo para los jugos de agave crudo.
- La presencia de azúcares en tequilas reposados es un indicativo del proceso por el cual se elaboró. A pesar de que en varios tequilas se encontró glucosa y fructosa, esta concentración no sobrepasa lo establecido por la **NMX-V-006 2005** que es de 0 - 15 g de azúcares/L, con respecto al abocado.

Como un elemento adicional esta metodología permite determinar el grado de abocado en tequilas reposado como se ha podido demostrar. Restaría aplicar esta metodología en forma estadística por parte de los productores de tequila o el CRT, para que a través de un estudio estadístico se obtenga la información necesaria para confirmar los resultados del presente trabajo.

Bibliografía.

1. Secretaría de Economía. Norma Oficial Mexicana. **NOM-006-SCFI-2005**, Bebidas Alcohólicas Tequila especificaciones.
2. http://www.crt.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=174&lang=es Consultada por última vez el día 09 de Agosto de 2012.
3. Waleckx, E.; Gschaedler, A.; Colonna-Ceccaldi, B.; Monsan, P., **2008**. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. Food Chemistry 108, 40 – 48.
4. Meyer D.; Bayarri S.; Tárrega A.; Costell E., **2011**. Inulin as texture modifier in dairy products. Food Hydrocolloids 25, 1881-1890.
5. Mancilla, A; López, M. **2006**. Water- Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasyiron Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 54, No. 20, 7832-7839.
6. Růžicka, J.; Hansen E. H. **1988**. Flow injection analysis. John Wiley and Sons. Segunda edición.
7. Valcarcel, M; Luque de Castro M.D. **1987**. Flow injection analysis. Principles and Applications. Departamento de Química Analítica, Córdoba España. John Wiley and Sons.
8. Růžicka, J.; Hansen E. H. **1975**. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Analytica Chimica Acta. 78. 145-157.
9. Růžicka, J.; Ryan, A. K. Flow injection Analysis. Principles Tutorials and Resources. FIA lab Instruments Inc. 1st Ed.
10. Růžicka, J.; Hansen E. H.; Zagatto, E. A. **1975** Analytica Chimica Acta. **88**. 145.
11. Růžicka, J.; Hansen E. H.; Mosbaek, H. **1977**. Analytica Chimica Acta. **92**.
12. Růžicka, J.; Hansen E. H. **1978**. Analytica Chimica Acta. **99**. 37.
13. Badui Dergal, Salvador. **1993**. Química de los alimentos. Facultad de Química. UNAM. Ed Alhambra Mexicana.

14. Hernández Garciadiego L. **2000**. Incorporación de biosensores a sistemas de flujo continuo para determinaciones analíticas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.
15. Trevan, M. **1980**. Immobilized Enzymes, An Introduction and Applications in biotechnology. John Wiley and sons. Págs 119.
16. Hartmeier, W. **1985**. Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.*
17. Klei, H.E.; Sundstrom, D.W.; Shim, D. **1985**. Immobilization of enzymes by microencapsulation. *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed. IRL Press, pág. 49-54.
18. Linqiu Cao. **2006**. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley Online Library.
19. Dubosi, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J.; Rebers, P.; Smith, F. **1956**. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28, No 3, 350-356.
20. Pragna, R.; Thillaisthanam N.; Pattabiraman. K. **1989**. Reevaluation of the Phenol-Sulfuric Acid Reaction for the Estimation of Hexoses and Pentoses. *Analytical Biochemistry*. 181.18-22.
21. Worsfold, P.; Townshend, A; Poole, C. **2005**. Encyclopedia of Analytical Science. Second Edition. Vol 1. Elsevier Academic Press. 392-439.
22. Zhiyuan Z.; Chi-Huey, W.; **2002**. Regioselective benzylation of sugars mediated by excessive Bu_2SnO : observation of temperature promoted migration. *Tetrahedron* 58 6513–6519.
23. Michiko, M.; Hirokazu Y.; Toshifumi H.; **2007**. Sugar microanalysis by HPLC with benzylation: Improvement via introduction of a C-8 cartridge and a high efficiency ODS column. *Journal of Chromatography B*, 854 286–290.
24. Alpenfels, W. F.; **1981**. A Rapid and Sensitive Method for the Determination of Monosaccharides as Their Dansyl Hydrazones by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 114, 153-157.

25. Steven, R.; Salvatore, J. **1985**. Separation of Dansyl Hydrazine-Derivatized Oligosaccharides by Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 146, 143-149.
26. Honda, S.; Nishimura, Y.; Takashi, M.; Chiba, H.; Kakehi, K. A; **1982**. Manual Method for the Spectrophotometric Determination of Reducing Carbohydrates with 2-Cyanoacetamide *Analytical Biochemistry* 119, 194-199.
27. Bach, E.; Schollmeyer, E.; **1992**. An Ultraviolet-Spectrophotometric Method with 2- Cyanoacetamide for the Determination of the Enzymatic Degradation of Reducing Polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 203,335-339.
28. Raessler, M.; **2011**. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 11.
29. Tommaso R. I.; Cataldi, G.; Zambonin C. G.; **1998**. *Determination* of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. *Food Chemistry*, Vol. 62, No. 1, pp. 109-115.
30. Giannoccaro, E.; Wang, Y.; Chen, P.; **2008**. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars *Food Chemistry* 106, 324–330.
31. Harvey, D.J.; **2011**. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879, 1196–1225
32. Kiguchi, M.; Hamase, K.; Wu, W.; Yamamoto, K.; Zaito, K.; **1999**. *Analytical Science*. 15, 903-907.
33. Dalpathado, D.S.; Jiang, H.; Kater, M.A.; Desaire, H.; **2005**. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381 1130.
34. NMX-V-006-NORMEX-**2005** Bebidas Alcohólicas. Determinación de Azúcares Reductores Directos y Totales. Método Volumétrico de Lane-Eynon.

35. AOAC Official Methods 923.09. **1995**. Invert Sugar in Sugars and Syrups. Lane-Eynon General Volumetric Method. Final Action 16 Edition. Chapter 44, p.8 y p.9
36. G.L. Miller. **1959**. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31, pp. 426–428
37. Sedas Valencia M. **1996**. Estudio de la reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con azúcares reductores. Tesis para obtener el Título de Químico en Alimentos. Facultad de Química UNAM
38. P. Cañizares-Macías; L. Hernández-Garciadiego; H. Gómez-Ruiz. **2001**. *Journal of Food Science* 66, (3), 407-411
39. A. Ángeles-Cañas.; P. Cañizares-Macías; **2004**. Desarrollo de un sistema sensor para la a cuantificación de glucosa en jugos de fruta. *Revista de la Sociedad Química de Mexico*. 48, 106-11
- 40.. Masoom M.; Townshend A. **1984**, *Anaytical. Chimia Acta* 166, 111.
- 41.. Masoom M.; Townshend A. **1985** *Analytical Chimia Acta*, 171, 185.
42. Leslie S. Etre. John V. Hinshaw. **1993** Basic Relationships of Gas Chromatography Edition. Advanstar Cleveland, Ohio.
43. Canizales Curiel Gustavo. **1995**. Estudio para la selección de la tecnología de producción de bacanora. Hermosillo, Sonora. Editorial Universidad de Sonora. División de Ingeniería.
44. Morán G.; Córdova, J.; Valle. J.; Estarrón. M.; Díaz. D.; **2011**. Effect of dilution rate and nutrients addition on the fermentative capability and synthesis of aromatic compounds of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous cultures fed with *Agave tequilana* juice. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 151, Issue 1, 87–92
45. López. A.; Díaz. A.; Sosa. C.; Macías. L.; Campos. J. **2012**. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Volume 113, Issue 5, 614–618.

46. Mancilla. N.; Lopez. M.; **2002**. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 806–812.
47. Ávila. A.; Olvera. C.; Rudiño. E.; Cassab. G.; Nieto. J.; López. A. **2007**. Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul. **Plant Science**. Volume 173, Issue 4, Págs. 478–486.

APÉNDICE A

Tabla A1. Baño de Agua a 85 °C. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
2.524	0.4651	0.4726	0.4716	0.4698	0.0041
3.786	0.7704	0.7138	0.6205	0.7016	0.0757
5.048	1.1192	1.122	1.0519	1.0977	0.0397
6.3108	1.3337	1.3259	1.2589	1.3062	0.0411
8.835	1.6376	1.6222	1.5617	1.6072	0.0401
10.097	1.5848	1.584	1.6265	1.5984	0.0243
12.6216	1.7103	1.6571	1.7716	1.7130	0.0573

Tabla A2. Baño de Agua a 92°C. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
2.771	1.3420	1.2964	1.2221	1.2868	0.0605
1.847	0.8261	0.8128	0.8074	0.8154	0.0096
1.293	0.6039	0.5904	0.6097	0.6013	0.0099
0.924	0.3552	0.3552	0.3484	0.3529	0.0039
0.462	0.1330	0.1042	0.1110	0.1161	0.0151

Tabla A3. Horno para columna Hotpocket a 85°C. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
11.5	0.6826	0.7044	0.7030	0.6967	0.0122
9.3	0.5049	0.4796	0.4794	0.4880	0.0147
8.1	0.4206	0.4048	0.3863	0.4039	0.0172
4.6	0.1578	0.1405	0.1437	0.1473	0.0092
5.8	0.2162	0.2260	0.2184	0.2202	0.0051
3.5	0.0592	0.0552	0.0486	0.0543	0.0054
11.5	0.6826	0.7044	0.7030	0.6967	0.0122

Tabla A4. Sensibilidad del método. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
9	0.4062	0.3945	0.3889	0.3965	0.0088
8	0.3211	0.3161	0.2973	0.3115	0.0125
7	0.2333	0.2351	0.2327	0.2337	0.0012
5	0.1218	0.1234	0.1195	0.1216	0.0020
3	0.0413	0.0408	0.0385	0.0402	0.0015

Tabla A5. Sensibilidad del método. Datos curva de calibración fructosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
9	1.4454	1.4701	1.4409	1.4521	0.0157
8	1.3100	1.3229	1.3062	1.3130	0.0088
7	1.1612	1.1641	1.1645	1.1633	0.0018
5	0.8351	0.8134	0.8252	0.8246	0.0109
3	0.4322	0.4425	0.4387	0.4378	0.0052

Tabla A6. Longitud de onda a 540 nm. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
15	0.2768	0.2684	0.2738	0.2730	0.0043
10	0.1807	0.1802	0.1873	0.1827	0.0040
8	0.1469	0.1512	0.1491	0.1491	0.0022
5	0.0667	0.0762	0.0774	0.0734	0.0059
3	0.0265	0.0258	0.0249	0.0257	0.0008

Tabla A7. Longitud de onda a 540 nm. Datos curva de calibración fructosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
10.8	0.5982	0.6236	0.6334	0.6184	0.0182
8.6	0.5180	0.5333	0.5378	0.5297	0.0104
5.4	0.3252	0.3329	0.3314	0.3298	0.0041
3.2	0.1762	0.1798	0.1710	0.1757	0.0044
1.1	0.0274	0.0275	0.0273	0.0274	0.0001

Tabla A8. Longitud de onda a 480 nm. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
15.0	0.8757	0.8868	0.9078	0.8901	0.0163
10.0	0.5858	0.6053	0.5953	0.5955	0.0098
8.0	0.5067	0.4900	0.4926	0.4964	0.0090
5.0	0.2849	0.2576	0.2650	0.2692	0.0142
3.0	0.0981	0.0999	0.0992	0.0991	0.0009

Tabla A9. Longitud de onda a 480 nm. Datos curva de calibración fructosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
10.8	1.7378	1.7491	1.7122	1.7330	0.0189
8.6	1.5325	1.5335	1.5362	1.5341	0.0019
5.4	1.0472	1.0586	1.0731	1.0596	0.0130
3.2	0.6533	0.6522	0.6223	0.6426	0.0176
1.1	0.1046	0.1033	0.0990	0.1023	0.0029

Tabla A10. Reactivo: DNS con sal de la Rochelle en medio alcalino. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
17.9	1.0812	1.0782	1.0771	1.0788	0.0021
11.9	0.7960	0.8101	0.8035	0.8032	0.0071
9.5	0.6185	0.6166	0.6211	0.6187	0.0023
7.1	0.4568	0.4685	0.4645	0.4633	0.0059
4.8	0.2889	0.3038	0.2965	0.2964	0.0075

Tabla A11. Reactivo. Reactivo: DNS con sal de la Rochelle en medio alcalino. Datos curva de calibración fructosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
7.1	1.4597	1.4637	1.4767	1.4667	0.0089
5.1	1.1270	1.1395	1.1433	1.1366	0.0085
3.0	0.6531	0.6647	0.6618	0.6599	0.0060
2.0	0.4347	0.4307	0.4276	0.4310	0.0036
1.0	0.1076	0.1103	0.1118	0.1099	0.0021
0.5	0.0118	0.0164	0.0127	0.0136	0.0024

Tabla A12. Reactivo: DNS en medio alcalino. Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
17.9	0.8022	0.8114	0.8103	0.8080	0.0050
11.9	0.5484	0.5729	0.5780	0.5664	0.0158
9.5	0.4549	0.4681	0.4580	0.4603	0.0069
7.1	0.3414	0.3284	0.3466	0.3388	0.0094
4.8	0.1902	0.2061	0.1860	0.1941	0.0106

Tabla A13. Reactivo: DNS en medio alcalino. Datos curva de calibración fructosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
7.1	1.0688	1.0920	1.0804	1.0804	0.0116
5.1	0.7976	0.8247	0.8075	0.8099	0.0137
3.0	0.4670	0.4656	0.4753	0.4693	0.0052
2.0	0.2914	0.2869	0.2896	0.2893	0.0023
1.0	0.0586	0.0574	0.0507	0.0556	0.0043

Tabla A14. Determinación del intervalo lineal y los límites de detección y cuantificación. Datos curva de calibración fructosa.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
20.8	1.9960	1.9305	1.9331	1.9532	0.0371
12.5	1.7536	1.7305	1.7094	1.7312	0.0221
9.3	1.4639	1.4739	1.5097	1.4825	0.0241
7.3	1.2684	1.2485	1.2226	1.2465	0.0230
5.2	0.9433	0.9750	0.9914	0.9699	0.0245
4.2	0.7537	0.7655	0.7753	0.7648	0.0108
3.2	0.5592	0.5897	0.6148	0.5879	0.0278
2.1	0.3126	0.3080	0.2866	0.3024	0.0139
1	0.0671	0.0622	0.0618	0.0637	0.0030

Tabla A15. Determinación del límite alto del intervalo lineal. Datos curva de calibración fructosa.

mg/mL	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
8.0	1.3510	1.3650	1.3656	1.3605	0.0082
6.0	1.0803	1.1074	1.1029	1.0969	0.0145
4.0	0.7041	0.6924	0.7138	0.7035	0.0107
3.0	0.4849	0.4700	0.4748	0.4765	0.0076
2.0	0.2648	0.2689	0.2572	0.2637	0.0059
1.0	0.0725	0.0807	0.0766	0.0766	0.0041

Tabla A16. Optimización del flujo (0.9 mL/min). Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
288	0.8439	0.8320	0.8276	0.8345	0.0084
231	0.6569	0.6583	0.6617	0.6590	0.0025
173	0.5043	0.5020	0.5021	0.5028	0.0013
115	0.3400	0.3424	0.3496	0.3440	0.0050
86	0.2650	0.2661	0.2670	0.2660	0.0010
58	0.2062	0.2043	0.2026	0.2044	0.0018

Tabla A17. Optimización del flujo (0.5 mL/min). Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
272	1.5755	1.5425	1.5856	1.5679	0.0225
217.6	1.2954	1.3099	1.3055	1.3036	0.0074
163.2	1.0075	0.9973	0.9886	0.9978	0.0095
108.8	0.6940	0.6936	0.6978	0.6951	0.0023
54.4	0.3621	0.3634	0.3636	0.3630	0.0008

Tabla A18. Optimización del flujo (0.35 mL/min). Datos curva de calibración glucosa.

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
256	1.0198	1.0094	1.0111	1.0134	0.0056
204.8	0.8213	0.8208	0.8157	0.8193	0.0031
153.6	0.6181	0.6187	0.6220	0.6196	0.0021
102.4	0.4141	0.4118	0.4116	0.4125	0.0014
76.8	0.2893	0.2891	0.2850	0.2878	0.0024
64	0.2631	0.2649	0.2629	0.2636	0.0011

Tabla A19. Determinación del intervalo lineal y los límites de detección y cuantificación. Datos curva de calibración glucosa

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
272	1.5755	1.5425	1.5856	1.5679	0.0225
217.6	1.2954	1.3099	1.3055	1.3036	0.0074
163.2	1.0075	0.9973	0.9886	0.9978	0.0095
108.8	0.6940	0.6936	0.6978	0.6951	0.0023
54.4	0.3621	0.3634	0.3636	0.3630	0.0008
27.2	0.1904	0.1902	0.1907	0.1904	0.0003
16.3	0.1141	0.1141	0.1152	0.1145	0.0006
8.2	0.0569	0.0586	0.0572	0.0576	0.0009

Tabla A20. Evaluación del etanol como interferente. Datos curva de calibración etanol.

Etanol (% v/V)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
30	0.1376	0.1482	0.1461	0.1440	0.0056
35	0.1743	0.1795	0.1858	0.1799	0.0058
40	0.2219	0.2210	0.2245	0.2225	0.0018
45	0.2746	0.2702	0.2755	0.2735	0.0028
50	0.3437	0.3374	0.3209	0.3340	0.0118
55	0.5231	0.5623	0.5183	0.5345	0.0241
60	0.8287	0.8194	0.8455	0.8312	0.0133

Tabla A21. Determinación de fructosa en muestras de mostos. Datos y cálculos de la curva de calibración de fructosa y de fructosa directa y total para las muestras de mostos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7)

CURVA DE CALIBRACIÓN					
Fructosa					
Concentración mg/mL	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
9.3	1.2438	1.2423	1.2048	1.2303	0.0221
7.2	1.0348	1.0057	0.9769	1.0058	0.0290
5.2	0.7614	0.6936	0.7188	0.7246	0.0343
3.1	0.4027	0.3914	0.4111	0.4017	0.0099
2.1	0.2176	0.2260	0.2449	0.2295	0.0140
1.0	0.1260	0.1250	0.1190	0.1233	0.0038
$y = 0.1389x - 0.0255$ $R = 0.9970$					

Muestra	Absorbancia			Concentración fructosa mg/mL		
FDM1	0.1138	0.112	0.1126	1.00	0.99	0.99
FDM2	0.1377	0.1422	0.1567	1.17	1.21	1.31
FDM3	0.4803	0.4593	0.4807	3.64	3.49	3.64
FDM4	0.6184	0.5753	0.5621	4.63	4.32	4.23
FDM5	0.8936	0.9202	0.9233	6.62	6.81	6.83
FDM6	0.5497	0.5512	0.5671	4.14	4.15	4.27
FDM7	0.3985	0.4547	0.4025	3.05	3.46	3.08
FTM1	0.3664	0.3478	0.3479	2.82	2.69	2.69
FTM2	0.4169	0.3629	0.3778	3.18	2.80	2.90
FTM3	0.408	0.4479	0.4525	3.12	3.41	3.44
FTM4	0.1797	0.1726	0.1744	1.48	1.43	1.44
FTM5	0.3713	0.3288	0.3458	2.86	2.55	2.67
FTM6	0.4757	0.4727	0.506	3.61	3.59	3.83
FTM7	0.4588	0.3917	0.3737	3.49	3.00	2.87

Nota: fructosa directa (FD) y fructosa total (RT), número de muestra (M#)

Se realizó la corrección de la concentración por efecto de la dilución y se obtuvieron los siguientes resultados.

Muestra	Dilución	Concentración mg/mL			Promedio	Desviación estándar	Intervalo de confianza a 95%
FDM1	no	1.00	0.99	0.99	1.00	0.01	0.02
FDM2	no	1.17	1.21	1.31	1.23	0.07	0.18
FDM3	1/50	182.04	174.48	182.19	179.57	4.41	10.94
FDM4	3/25	38.62	36.04	35.25	36.64	1.77	4.38
FDM5	1/25	165.40	170.18	170.74	168.77	2.94	7.29
FDM6	1/25	103.51	103.78	106.64	104.64	1.74	4.31
FDM7	1/5	15.26	17.28	15.40	15.98	1.13	2.80
FTM1	1/5	14.10	13.44	13.44	13.66	0.39	0.96
FTM2	1/5	15.92	13.98	14.51	14.81	1.00	2.49
FTM3	1/50	156.02	170.38	172.04	166.15	8.81	21.87
FTM4	1/25	36.93	35.65	35.97	36.18	0.66	1.65
FTM5	1/50	142.81	127.51	133.63	134.65	7.70	19.11
FTM6	1/25	80.30	85.30	84.06	83.22	2.61	6.47
FTM7	1/5	17.43	15.02	14.37	15.60	1.61	4.01

Tabla A22. Determinación de fructosa en muestras de mostos. Datos y cálculos de la curva de calibración de fructosa y de fructosa directa y total para las muestras de mostos (1, 2, 3, 4)

CRUVA DE CALIBRACIÓN					
Fructosa					
mg/mL	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
8.0	1.3510	1.3650	1.3656	1.3605	0.0082
6.0	1.0803	1.1074	1.1029	1.0969	0.0145
4.0	0.7041	0.6924	0.7138	0.7035	0.0107
3.0	0.4849	0.4700	0.4748	0.4765	0.0076
2.0	0.2648	0.2689	0.2572	0.2637	0.0059
1.0	0.0725	0.0807	0.0766	0.0766	0.0041
$y = 0.2058x - 0.1369$				R= 0.9994	

Muestra	Absorbancia			Concentración mg/mL		
FD1	1.0236	1.0092	1.0038	5.93	5.85	5.83
FD2	0.6533	0.7261	0.6833	3.96	4.35	4.12
FD3	0.6032	0.5776	0.5773	3.69	3.56	3.56
FD4	0.3768	0.3831	0.3680	2.49	2.52	2.44
FT1	1.0202	1.0149	1.0717	5.91	5.89	6.19
FT2	0.7083	0.6962	0.7271	4.25	4.19	4.35
FT3	0.5644	0.5900	0.6156	3.49	3.62	3.76
FT4	0.4077	0.3807	0.3743	2.65	2.51	2.47

Nota: fructosa directa (FD) y fructosa total (RT), número de muestra (#)

Se realizó la corrección de la concentración por efecto de la dilución y se obtuvieron los siguientes resultados.

Muestra	Dilución	Concentración corregida			Promedio	Desviación estándar	Intervalo de Confianza a 95%
FD1	0.5 a 25	296.59	292.75	291.33	293.55	2.72	6.75
FD2	0.5 a 25	197.98	217.37	205.99	207.11	9.74	24.19
FD3	0.5 a 25	184.66	177.84	177.76	180.09	3.96	9.84
FD4	0.5 a 25	124.37	126.03	122.02	124.14	2.01	5.00
FT1	0.5/25	295.69	294.27	309.39	299.79	8.35	20.74
FT2	0.5/25	212.63	209.40	217.65	213.23	4.16	10.32
FT3	0.5/25	174.31	181.14	187.95	181.13	6.82	16.93
FT4	0.5/25	132.60	125.41	123.71	127.24	4.72	11.71

Tabla A23. Determinación de glucosa en muestras de mostos. Datos y cálculos de la curva de calibración de fructosa y de fructosa directa y total para las muestras de mostos (1, 2, 3, 4)

CURVA DE CALIBRACIÓN					
Glucosa					
mg/L	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
260	0.5286	0.5286	0.5310	0.5294	0.0014
208	0.4310	0.4310	0.4286	0.4302	0.0014
156	0.3214	0.3214	0.3190	0.3206	0.0014
104	0.2119	0.2119	0.2143	0.2127	0.0014
52	0.1048	0.1048	0.1048	0.1048	0.0014
y= 0.0021x - 0.0005				R=0.9998	

Muestra	Absorbancia			Concentración mg/L Glucosa			Promedio
GD1	0.2143	0.2119	0.2095	104.7	103.5	102.4	103.5
GD2	0.2619	0.2595	0.2619	127.9	126.8	127.9	127.5
GD3	0.3119	0.3119	0.3048	152.3	152.3	148.8	151.1
GD4	0.1571	0.1643	0.1595	76.8	80.3	78.0	78.4
GT1	0.2071	0.2071	0.2071	101.2	101.2	101.2	101.2
GT2	0.3905	0.3976	0.4000	190.6	194.1	195.2	193.3
GT3	0.3548	0.3619	0.3643	173.2	176.7	177.8	175.9
GT4	0.2429	0.2476	0.2452	118.6	120.9	119.8	119.8

Nota: glucosa directa (GD) y glucosa total (GT), número de muestra (#)

Se realizó la corrección de la concentración por efecto de la dilución y se obtuvieron los siguientes resultados.

Muestra	Dilución	Concentración mg/L Glucosa			Promedio	Dst	IC 95%
GD1	0.3/25	8724.7	8628.0	8531.3	8628.0	96.7	240.1
GD2	0.5/25	6395.5	6337.5	6395.5	6376.2	33.5	83.2
GD3	0.5/25	7614.3	7614.3	7440.2	7556.3	100.5	249.6
GD4	0.5/25	3842.0	4016.1	3900.0	3919.3	88.7	220.1
GT1	0.3/25	8434.5	8434.5	8434.5	8434.5	62.3	154.7
GT2	0.5/25	9529.5	9703.6	9761.6	9664.9	120.8	299.9
GT3	0.5/25	8658.9	8833.0	8891.1	8794.3	120.8	299.9
GT4	0.5/25	5931.3	6047.3	5989.3	5989.3	58.0	144.1

Nota: glucosa directa (GD) y glucosa total (GT), número de muestra (#)

Tabla A24. Evaluación del efecto de la matriz en la cuantificación de fructosa en muestras de tequila. Datos curva de calibración fructosa y etanol. Muestras de tequila A, B, 5B y J con y sin fortificar.

Curvas de calibración					
Fructosa					
mg/mL	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
8.0	1.0942	1.1106	1.0690	1.0913	0.0210
5.7	0.7705	0.7789	0.7775	0.7756	0.0045
3.4	0.4001	0.4082	0.4146	0.4076	0.0073
2.3	0.1913	0.1932	0.1925	0.1924	0.0010
1.1	0.0318	0.0285	0.0332	0.0312	0.0024
y=0.1563x-0.1463 R=0.9987					
Etanol					
%v/v	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
45	0.2701	0.2699	0.2705	0.2702	0.0003
40	0.2320	0.2344	0.2280	0.2314	0.0032
35	0.1992	0.2074	0.2011	0.2026	0.0043
30	0.1586	0.1551	0.1572	0.1570	0.0018
y=0.0151X - 0.3825 R= 0.9908					

Muestras de tequila

muestra	Absorbancia			%Etanol	Aetanol
A	0.2799	0.2808	0.2789	36.2	0.2060
B	0.2004	0.1997	0.2015	35.0	0.1971
5B	0.2377	0.2335	0.2271	40.0	0.2340
I	0.2353	0.2331	0.2387	40.1	0.2347
J	0.2995	0.2970	0.2984	38.2	0.2207
	Fructosa (mg/mL)			Promedio	DS
A	1.41	1.42	1.40	1.409	0.006
B	---	---	---	---	---
5B	---	---	---	---	---
I	---	---	---	---	---
J	1.44	1.42	1.43	1.433	0.008

Muestras de tequila fortificadas

muestras	Absorbancia			% Etanol	Aetanol
A	0.6265	0.6462	0.6692	35.5	0.2006
B	0.4983	0.5155	0.5061	34.3	0.1920
5B	0.5334	0.5260	0.5233	39.2	0.2281
I	0.4813	0.4889	0.4879	39.3	0.2288
J	0.6580	0.6396	0.6401	37.4	0.2151
	Fructosa (mg/mL)			Promedio	DS
A	3.66	3.79	3.81	3.75	0.08
B	2.90	3.01	2.95	2.95	0.06
5B	2.89	2.84	2.83	2.85	0.03
I	2.55	2.60	2.59	2.58	0.03
J	3.77	3.65	3.66	3.69	0.07

Resultados fortificación.

Muestra	Fructosa en tequila (mg/mL)	Fructosa en tequila fortificado (mg/mL)	Fructosa adicionada (mg/mL)	Fructosa recobrada (mg/mL)	% de recobro
A	1.41	3.75	2.39	2.37	99.1
B	No detectado	2.95	2.39	2.95	123.4
5B	No detectado	2.85	2.39	2.85	119.2
I	No detectado	2.58	2.39	2.58	107.9
J	1.43	3.69	2.39	2.29	95.8

Tabla A25. Determinación de fructosa en muestras de tequila. Datos y cálculos de las curvas de calibración (etanol y fructosa) y de las muestras de tequila (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, 5G, 5D, 5F y 5E).

Curvas de calibración					
Fructosa					
mg/mL	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
8.1	1.3270	1.3193	1.3538	1.3334	0.0181
6.1	1.0871	1.0676	1.0997	1.0848	0.0161
4.0	0.7115	0.7219	0.7173	0.7169	0.0052
3.0	0.5039	0.5005	0.5060	0.5035	0.0028
2.0	0.2593	0.2554	0.2471	0.2540	0.0062
1.0	0.0422	0.0537	0.0451	0.0470	0.0060
Y=0.2073x - 0.1495 R=0.9971					

Etanol					
%v/v	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
60	0.6632	0.6417	0.6311	0.6453	0.0164
50	0.3803	0.3875	0.3816	0.3831	0.0039
45	0.2784	0.2846	0.2796	0.2809	0.0033
40	0.2341	0.2333	0.2219	0.2297	0.0068
35	0.1521	0.1435	0.1486	0.1481	0.0043
$y=0.0151X - 0.3825$ R= 0.9908					

Muestra	Absorbancia			% Etanol	A debida al % de etanol	A corregida		
A	0.2717	0.2738	0.2761	36.2	0.1634	0.1083	0.1105	0.1127
B	0.2004	0.1958	0.2004	35.0	0.1460	0.0544	0.0498	0.0544
C	0.5051	0.4876	0.4803	55.1	0.5152	-0.0101	-0.0276	-0.0349
D	0.4718	0.4665	0.4822	48.0	0.3423	0.1295	0.1242	0.1399
E	0.2866	0.2847	0.2929	40.0	0.2215	0.0651	0.0632	0.0714
F	0.2654	0.2827	0.2654	40.2	0.2245	0.0409	0.0582	0.0409
G	0.2212	0.2222	0.2270	40.2	0.2238	-0.0025	-0.0016	0.0033
H	0.2052	0.2038	0.2060	35.5	0.1540	0.0512	0.0498	0.0520
I	0.2323	0.2302	0.2307	40.1	0.2229	0.0094	0.0073	0.0078
J	0.3042	0.2955	0.2914	38.2	0.1943	0.1099	0.1012	0.0970
5G	0.2131	0.2174	0.2089	40.0	0.2215	-0.0084	-0.0041	-0.0126
5D	0.4730	0.4604	0.4630	55.0	0.5131	-0.0422	-0.0548	-0.0522
5F	0.2192	0.2268	0.2189	40.1	0.2236	-0.0044	0.0032	-0.0047
5E	0.3737	0.3536	0.3466	50.5	0.3801	-0.0063	-0.0264	-0.0335

Muestra	Concentración fructosa mg/mL			Promedio	Desviación estándar	Intervalo de confianza a 95%
A	0.52	0.53	0.54	0.53	0.01	0.03
B	0.26	0.24	0.26	0.25	0.01	0.03
C	0.27	0.19	0.15	0.20	0.06	0.15
D	0.62	0.60	0.67	0.63	0.04	0.10
E	0.31	0.30	0.34	0.32	0.02	0.05
F	0.20	0.28	0.20	0.23	0.05	0.12
G	-0.01	-0.01	0.02	0.00	0.02	0.04
H	0.25	0.24	0.25	0.25	0.01	0.01
I	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01
J	0.53	0.49	0.47	0.50	0.03	0.08
5G	-0.04	0.02	0.06	0.01	0.05	0.13
5D	0.12	0.06	0.07	0.08	0.03	0.08
5F	-0.02	0.02	-0.02	-0.01	0.02	0.05
5E	-0.03	-0.13	-0.16	-0.11	0.07	0.17

Tabla A26. Determinación de fructosa en muestras de tequila. Datos y cálculos de las curvas de calibración (de etanol y fructosa) y de las muestras de tequila (1, 2, 3, 4, 5, 5A, 5B, 5C, 6, 7, 8)

CURVAS DE CALIBRACIÓN					
Fructosa					
Concentración mg/mL	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
9.3	1.1902	1.2040	1.2090	1.2011	0.0097
7.2	0.9682	1.0146	0.9843	0.9890	0.0236
5.2	0.7079	0.7320	0.7468	0.7289	0.0196
3.1	0.4109	0.3991	0.3569	0.3890	0.0284
2.1	0.2158	0.2381	0.2261	0.2267	0.0112
1.0	0.0828	0.0854	0.0815	0.0832	0.0020
0.5	0.0549	0.0547	0.0526	0.0540	0.0013
$y = 0.1456x - 0.0505$ $R = 0.9971$					
Etanol					
Concentración % v/v	Absorbancia.			Promedio	Desviación estándar
50.0	0.2831	0.2957	0.2798	0.2862	0.0084
44.8	0.2417	0.2378	0.2434	0.2410	0.0029
40.0	0.21946	0.2113	0.2187	0.2165	0.0045
35.2	0.1932	0.1798	0.1863	0.1864	0.0067
30.0	0.1398	0.155	0.14529	0.1467	0.0077
$Y = 0.0068x - 0.0505$ $R = 0.9908$					

Muestra	Absorbancia			% Etanol	A Etanol	Absorbancia corregida		
1	0.4150	0.3892	0.4100	38.0	0.2015	0.2135	0.1877	0.2085
2	0.3565	0.3524	0.3504	35.3	0.1826	0.1739	0.1698	0.1678
3	0.4189	0.4304	0.4382	40.0	0.2155	0.2034	0.2149	0.2227
4	0.4445	0.4698	0.4555	43.0	0.2365	0.2080	0.2333	0.2190
5	0.1950	0.2130	0.2010	35.0	0.1805	0.0145	0.0325	0.0205
5A	0.2020	0.2100	0.2030	40.0	0.2155	-0.0135	-0.0055	-0.0125
5B	0.2208	0.2176	0.2194	40.0	0.2155	0.0053	0.0021	0.0039
5C	0.1820	0.1850	0.1840	40.0	0.2155	-0.0335	-0.0305	-0.0315
6	0.2633	0.2523	0.2661	38.1	0.2022	0.0611	0.0501	0.0639
7	0.2890	0.3074	0.3084	35.0	0.1805	0.1085	0.1269	0.1279
8	0.2734	0.2806	0.2718	40.0	0.2155	0.0579	0.0651	0.0563

MUESTRA	Concentración fructosa mg/mL			Promedio	Desviación estándar	Intervalo de confianza a 95%
1	1.8	1.6	1.8	1.74	0.09	0.23
2	1.5	1.5	1.5	1.52	0.02	0.05
3	1.7	1.8	1.9	1.81	0.07	0.17
4	1.8	1.9	1.9	1.86	0.09	0.22

5	0.4	0.6	0.5	0.50	0.06	0.16
5A	0.3	0.3	0.3	0.28	0.03	0.07
5B	0.4	0.4	0.4	0.37	0.01	0.03
5C	0.1	0.1	0.1	0.13	0.01	0.03
6	0.8	0.7	0.8	0.75	0.05	0.12
7	1.1	1.2	1.2	1.18	0.08	0.19
8	0.7	0.8	0.7	0.76	0.03	0.08

Tabla A27. Determinación de glucosa en muestras de tequila. Datos y cálculos de las curvas de calibración (de etanol y fructosa) y de las muestras de tequila (1, 2, 3, 4, 5, 5A, 5B, 5C, 6, 7, 8, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, 5G, 5D, 5F y 5E)

CRUVA DE CALIBRACIÓN					
Glucosa					
Concentración (mg/L)	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
272	1.5755	1.5425	1.5856	1.5679	0.0225
217.6	1.2954	1.3099	1.3055	1.3036	0.0074
163.2	1.0075	0.9973	0.9886	0.9978	0.0095
108.8	0.694	0.6936	0.6978	0.6951	0.0023
54.4	0.3621	0.3634	0.3636	0.363	0.0008
27.2	0.1904	0.1902	0.1907	0.1904	0.0003
16.3	0.1141	0.1141	0.1152	0.1145	0.0006
8.2	0.0569	0.0586	0.0572	0.0576	0.0009

Muestra	Absorbancia			Concentración mg/L			Promedio	Desviación estándar	IC 95%
A	0.2604	0.2600	0.2722	38.79	38.73	40.85	39.5	1.2	3.0
B	0.1003	0.0875	0.0827	10.97	8.74	7.90	9.2	1.6	3.9
C	0.3065	0.2885	0.3010	46.81	43.69	45.86	45.5	1.6	4.0
D	0.5161	0.5257	0.5291	83.25	84.92	85.51	84.6	1.2	2.9
E	0.1639	0.1771	0.1849	22.01	24.31	25.66	24.0	1.8	4.6
F	0.1849	0.1801	0.1762	25.67	24.84	24.16	24.9	0.8	1.9
G	0.0466	0.0375	0.0371	1.64	0.05	-0.02	0.0	0.9	2.3
H	0.0605	0.0633	0.0655	4.04	4.53	4.92	4.5	0.4	1.1
I	0.0433	0.0391	0.0382	1.05	0.33	0.16	0.5	0.5	1.2
J	0.2362	0.2347	0.2499	34.59	34.33	36.97	35.3	1.5	3.6
1	1.5319	1.5066	1.4839	259.86	255.46	251.51	255.6	4.2	10.4
2	1.5561	1.5517	1.5584	264.06	263.29	264.46	263.9	0.6	1.5
3	1.5267	1.5184	1.5294	258.96	257.50	259.41	258.6	1.0	2.5
4	1.5056	1.4914		255.28	252.82		254.1	1.7	4.3
6	1.1843	1.1804		199.43	198.74		199.1	0.5	1.2
7	1.3322	1.3307		225.13	224.88		225.0	0.2	0.4
8	1.1981	1.1915		201.83	200.67		201.2	0.8	2.0

5	0.0894	0.0783	0.0755	9.08	7.14	6.65	7.6	1.3	3.2
5A	0.0404	0.0403	0.0406	0.56	0.53	0.59	0.6	0.0	0.1
5B	0.0306	0.0290	0.0277	-1.16	-1.43	-1.65	-1.4	0.2	0.6
5C	0.0262	0.0274	0.0262	-1.92	-1.72	-1.93	-1.9	0.1	0.3
5D	0.3263	0.3008	0.3174	50.26	45.82	48.71	48.3	2.3	5.6
5E	0.1222	0.1225	0.1216	14.78	14.83	14.66	14.8	0.1	0.2
5F	0.0310	0.0229	0.0251	-1.09	-2.50	-2.10	-1.9	0.7	1.8
5G	0.0167	0.0147	0.0165	-3.57	-3.92	-3.60	-3.7	0.2	0.5

Debido a que en algunas muestras el contenido de glucosa se encontró muy cercano al punto más alto de la curva de calibración, se decidió realizar diluciones de estas para ser analizadas, a continuación se muestra la corrección de la concentración por efecto de la dilución.

Muestra	Absorbancia			Concentración mg/L		
	1 (3/10)	1.2310	1.2419	1.2406	207.54	209.44
1 (1/10)	0.4290	0.4223	0.4211	68.10	66.95	66.73
2(1/10)	0.3569	0.3581	0.3575	55.57	55.78	55.67
3(1/10)	0.3921	0.4005	0.3770	61.70	63.16	59.06
4(1/10)	0.3912	0.3921	0.3923	61.54	61.69	61.73
6(2/10)	0.3023	0.3108	0.3078	46.08	47.55	47.05
7(2.5/10)	0.5201	0.5262	0.5246	83.96	85.00	84.73
8(2.5/10)	0.38634	0.37531	0.3860	60.70	58.77	60.64

Muestra	Concentración corregida mg/L			Promedio	S	IC 95%
1 (3/10)	691.79	698.14	697.38	695.77	3.47	8.61
1 (1/10)	681.05	669.51	667.29	672.61	7.39	18.34
2(1/10)	555.72	557.81	556.75	556.76	1.04	2.59
3(1/10)	616.99	631.57	590.64	613.06	20.75	51.50
4(1/10)	615.39	616.87	617.27	616.51	0.99	2.46
6(2/10)	230.39	237.77	235.23	234.46	3.75	9.31
7(2.5/10)	335.83	340.01	338.94	338.26	2.17	5.40
8(2.5/10)	242.77	235.11	242.55	240.14	4.36	10.84

APÉNDICE B

Determinación de Límites de Detección y Cuantificación.

Cálculos para determinar los Límites de Detección y Cuantificación, utilizando el método de Mínimos Cuadrados.

Si existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la “mejor” línea recta que pasa a través de los puntos de la curva de calibración se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en y, lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada. Algunas de esas desviaciones (conocidas como los residuos de y) serán positivas y otras negativas, por lo que se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que “la línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) ”.

Para la recta

$$y = a + bx \quad \text{Ecuación 1}$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para calcular los errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor de $S_{y/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{calc})^2}{n - 2}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto, r:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Límite de detección

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_{\pm} = \bar{y} + b(x_i - \bar{x}) \pm t S_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 8}$$

en donde t es el valor de la "t de student", a dos colas, con un nivel de confianza s para n-2 grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y_+ para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta y_- . Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas y_{\pm} se utiliza un término auxiliar:

$$C = b^2 - \frac{(t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 9}$$

por lo que, para la recta y_+

$$x_1 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 10}$$

y para la recta y_-

$$x_2 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor calculado de y_+ para $x=0$ en la ecuación 11.

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de y_+ para $x=LD$, y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta y_- . Este valor corresponde al límite de cuantificación.

Tabla B1. Límites de detección y cuantificación fructosa. Los datos fueron tomados de la tabla **A14**.

x	y	xi-x	(xi-x) ²	yi-y	(yi-y) ²	(xi-x)(yi-y)	y _{calc}	(yi-y _{calc})	(yi-y _{calc}) ²	(xi) ²	xiyi	yi-(a+bx _i)	yi-(a+bx _i) ²
5.2	0.9433	2.060	4.244	0.406	0.164	0.835	0.985	-0.041	0.00171	27.040	4.905	-0.041	0.001708
5.2	0.975	2.060	4.244	0.437	0.191	0.901	0.985	-0.010	0.00009	27.040	5.070	-0.010	0.000093
5.2	0.9914	2.060	4.244	0.454	0.206	0.935	0.985	0.007	0.00005	27.040	5.155	0.007	0.000046
4.2	0.7537	1.060	1.124	0.216	0.047	0.229	0.768	-0.014	0.00020	17.640	3.166	-0.014	0.000196
4.2	0.7655	1.060	1.124	0.228	0.052	0.241	0.768	-0.002	0.00000	17.640	3.215	-0.002	0.000005
4.2	0.7753	1.060	1.124	0.238	0.056	0.252	0.768	0.008	0.00006	17.640	3.256	0.008	0.000058
3.2	0.5592	0.060	0.004	0.021	0.000	0.001	0.551	0.008	0.00007	10.240	1.789	0.008	0.000071
3.2	0.5897	0.060	0.004	0.052	0.003	0.003	0.551	0.039	0.00152	10.240	1.887	0.039	0.001516
3.2	0.6148	0.060	0.004	0.077	0.006	0.005	0.551	0.064	0.00410	10.240	1.967	0.064	0.004101
2.1	0.3126	-1.040	1.082	-0.225	0.051	0.234	0.312	0.000	0.00000	4.410	0.656	0.000	0.000000
2.1	0.308	-1.040	1.082	-0.230	0.053	0.239	0.312	-0.004	0.00002	4.410	0.647	-0.004	0.000017
2.1	0.2866	-1.040	1.082	-0.251	0.063	0.261	0.312	-0.026	0.00065	4.410	0.602	-0.026	0.000652
1	0.0671	-2.140	4.580	-0.471	0.222	1.007	0.074	-0.006	0.00004	1.000	0.067	-0.006	0.000041
1	0.0622	-2.140	4.580	-0.476	0.226	1.018	0.074	-0.011	0.00013	1.000	0.062	-0.011	0.000128
1	0.0618	-2.140	4.580	-0.476	0.227	1.019	0.074	-0.012	0.00014	1.000	0.062	-0.012	0.000137
suma	47.10	8.07	0.00	33.10	0.000	1.566	7.180		0.00877	180.99	32.507		0.00877
promedio	3.14	0.54											
			LD = 0.582 mg/mL				LC = 1.144 mg/mL						

Tabla B2. Límites superior del intervalo lineal. Fructosa. Los datos fueron tomados de la tabla A15.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia			Absorbancia Promedio	Pendiente	Logaritmo de la Concentración.
8	1.351	1.365	1.3656	1.3605	0.1314	0.9043
6	1.0803	1.1074	1.1029	1.0969	0.1962	0.7794
4	0.7041	0.6924	0.7138	0.7035	0.2263	0.6033
3	0.4849	0.47	0.4748	0.4765	0.2123	0.4783
2	0.2648	0.2689	0.2572	0.2637	0.1865	0.3022
1	0.0725	0.0807	0.0766	0.0766		0.0012
				X	0.2053	
				S	0.0176	
				X+2S	0.2404	
				X-2S	0.1702	

Tabla B3. Límites de detección y cuantificación glucosa. Los datos fueron tomados de la **tabla A19**.

x	y	xi-x	(xi-x) ²	yi-y	(yi-y) ²	(xi-x)(yi-y)	y _{calc}	(yi-y _{calc})	(yi-y _{calc}) ²	(xi) ²	xiyi	yi-(a+bx _i)	yi-(a+bx _i) ²
108.8	0.694	65.820	4332.27	0.410	0.168	26.978	0.699	-0.005	0.00003	11837	75.507	-0.005	0.000028
108.8	0.6936	65.820	4332.27	0.409	0.168	26.952	0.699	-0.006	0.00003	11837	75.464	-0.006	0.000032
108.8	0.6978	65.820	4332.27	0.414	0.171	27.228	0.699	-0.001	0.00000	11837	75.921	-0.001	0.000002
54.4	0.3621	11.420	130.42	0.078	0.006	0.890	0.356	0.006	0.00004	2959	19.698	0.006	0.000035
54.4	0.3634	11.420	130.42	0.079	0.006	0.905	0.356	0.007	0.00005	2959	19.769	0.007	0.000052
54.4	0.3636	11.420	130.42	0.079	0.006	0.908	0.356	0.007	0.00006	2959	19.780	0.007	0.000055
27.2	0.1904	-15.780	249.01	-0.094	0.009	1.479	0.185	0.006	0.00003	740	5.179	0.006	0.000034
27.2	0.1902	-15.780	249.01	-0.094	0.009	1.482	0.185	0.006	0.00003	740	5.173	0.006	0.000031
27.2	0.1907	-15.780	249.01	-0.093	0.009	1.474	0.185	0.006	0.00004	740	5.187	0.006	0.000037
16.3	0.1141	-26.680	711.82	-0.170	0.029	4.536	0.116	-0.002	0.00000	266	1.860	-0.002	0.000003
16.3	0.1141	-26.680	711.82	-0.170	0.029	4.536	0.116	-0.002	0.00000	266	1.860	-0.002	0.000003
16.3	0.1152	-26.680	711.82	-0.169	0.029	4.507	0.116	-0.001	0.00000	266	1.878	-0.001	0.000000
8.2	0.0569	-34.780	1209.65	-0.227	0.052	7.903	0.065	-0.008	0.00006	67	0.467	-0.008	0.000062
8.2	0.0586	-34.780	1209.65	-0.226	0.051	7.844	0.065	-0.006	0.00004	67	0.481	-0.006	0.000038
8.2	0.0572	-34.780	1209.65	-0.227	0.051	7.893	0.065	-0.008	0.00006	67	0.469	-0.008	0.000057
suma	644.70	4.26	0.00	19899.5	0.000	0.792	125.515		0.00047	47609	308.691		0.00047
promedio	42.98	0.28											
			LD = 4.34 mg/L				LC= 8.65 mg/L						

Tabla B4. Estimación del intervalo lineal de la glucosa. Los datos fueron tomados de la **tabla A19.**

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Promedio	Pendiente	Logaritmo de la Concentración.
272	1.5755	1.5425	1.5856	1.5679	0.0049	2.4346
217.6	1.2954	1.3099	1.3055	1.3036	0.0056	2.3377
163.2	1.0075	0.9973	0.9886	0.9978	0.0056	2.2127
108.8	0.6940	0.6936	0.6978	0.6951	0.0061	2.0366
54.4	0.3621	0.3634	0.3636	0.3630	0.0063	1.7356
27.2	0.1904	0.1902	0.1907	0.1905	0.0070	1.4346
16.3	0.1141	0.1141	0.1152	0.1145	0.0070	1.2122
8.2	0.0569	0.0586	0.0572	0.0576		0.9138
				X	0.0061	
				S	0.0006	
				X+2S	0.0073	
				X-2S	0.0048	

Tabla B5. Límites de detección y cuantificación de glucosa. Los datos fueron tomados de la **tabla A3**.

	x	y	xi-x	(xi-x) ²	yi-y	(yi-y) ²	(xi-x)(yi-y)	y _{calc}	(yi-y _{calc})	(yi-y _{calc}) ²	(xi) ²	x _i y _i	y _i -(a+bx _i)	y _i -(a+bx _i) ²
	9.3	0.5049	3.040	9.242	0.242	0.059	0.736	0.489	0.015	0.0002	86.490	4.696	0.015	0.0002
	9.3	0.4796	3.040	9.242	0.217	0.047	0.659	0.489	-0.010	0.0001	86.490	4.460	-0.010	0.0001
	9.3	0.4794	3.040	9.242	0.217	0.047	0.659	0.489	-0.010	0.0001	86.490	4.458	-0.010	0.0001
	8.1	0.4206	1.840	3.386	0.158	0.025	0.290	0.400	0.021	0.0004	65.610	3.407	0.021	0.0004
	8.1	0.4048	1.840	3.386	0.142	0.020	0.261	0.400	0.005	0.0000	65.610	3.279	0.005	0.0000
	8.1	0.3863	1.840	3.386	0.124	0.015	0.227	0.400	-0.014	0.0002	65.610	3.129	-0.014	0.0002
	4.6	0.1578	-1.660	2.756	-0.105	0.011	0.174	0.139	0.019	0.0004	21.160	0.726	0.019	0.0004
	4.6	0.1405	-1.660	2.756	-0.122	0.015	0.203	0.139	0.002	0.0000	21.160	0.646	0.002	0.0000
	4.6	0.1437	-1.660	2.756	-0.119	0.014	0.198	0.139	0.005	0.0000	21.160	0.661	0.005	0.0000
	5.8	0.2162	-0.460	0.212	-0.047	0.002	0.021	0.228	-0.012	0.0001	33.640	1.254	-0.012	0.0001
	5.8	0.226	-0.460	0.212	-0.037	0.001	0.017	0.228	-0.002	0.0000	33.640	1.311	-0.002	0.0000
	5.8	0.2184	-0.460	0.212	-0.044	0.002	0.020	0.228	-0.010	0.0001	33.640	1.267	-0.010	0.0001
	3.5	0.0592	-2.760	7.618	-0.204	0.041	0.562	0.057	0.002	0.0000	12.250	0.207	0.002	0.0000
	3.5	0.0552	-2.760	7.618	-0.208	0.043	0.573	0.057	-0.002	0.0000	12.250	0.193	-0.002	0.0000
	3.5	0.0486	-2.760	7.618	-0.214	0.046	0.591	0.057	-0.008	0.0001	12.250	0.170	-0.008	0.0001
suma	93.90	3.94	0.00	69.64	0.00	0.39	5.19			0.00	657.45	29.86		0.00
promedio	6.26	0.26												
				LD = 0.83 mg/mL			LC= 1.63 mg/mL							