

## Diseño experimental para la calibración y validación de ácido cítrico y ácido tartárico por espectrofotometría uv-visible normal y derivada

Fuensanta Sánchez Rojas<sup>a\*</sup>, Catalina Bosch Ojeda<sup>a</sup>, María Espinosa Bosch<sup>b</sup>, Antonio Jesús Ruiz Sánchez<sup>c</sup>

**Resumen:** El objetivo general del presente trabajo ha sido el desarrollo y aplicación de metodologías analíticas basadas en la combinación de medidas espectroscópicas de ultravioleta con métodos quimiométricos de diseño de experimentos para establecer la matriz de calibración y posterior análisis de los resultados obtenidos. Los analitos seleccionados para este estudio han sido el ácido cítrico y el ácido tartárico. El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarboxílico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. El ácido tartárico es un ácido orgánico bastante extendido en la naturaleza. Se encuentra en la uva, y en pequeñas cantidades en pepinos y patatas. Se presenta en forma de sal en algunos vegetales y en sus zumos.

**Palabras clave:** Ácido cítrico, Ácido tartárico, Diseño experimental, ANOVA, Regresión lineal múltiple

**Abstract:** The aims of this work has been the development and application of analytical methodologies based on the combination of spectroscopic measures of ultraviolet with chemometric methods of experiments design to establishing the matrix of calibration and later analysis of the obtained results. Citric acid and tartaric acid have been the selected analytes for this study. Citric acid is a tricarboxylic organic acid that is present in most of the fruits, mainly in citruses like the lemon and the orange. Tartaric acid is an organic acid extended enough in the nature. It is in the grape, and in small amounts in cucumbers and potatoes. It appears in form of salt in some vegetables and their juices.

**Keywords:** Citric acid, Tartaric acid, Experimental design, ANOVA, Multiple lineal regression.

### Introducción

El ácido cítrico se encuentra en forma de sólido translúcido o blanco. Se ofrece en forma granular; es inodoro, sabor ácido fuerte, fluorescente al aire seco. Cristaliza a partir de soluciones acuosas concentradas calientes en forma de grandes prismas rómbicos, con una molécula de agua, la cual pierde cuando se calienta a 100°C, fundiéndose al mismo tiempo. Se obtenía originalmente por extracción física del ácido del zumo de limón. Hoy en día la producción comercial de ácido cítrico se realiza sobre todo por procesos de fermentación que utilizan dextrosa o melaza de caña de azúcar como materia prima y *Aspergillus niger* como organismo de fermentación. La fermentación puede llevarse a cabo en tanques profundos (fermentación sumergida, que es el método más común) o en tanques no profundos (fermentación de superficie). La fermentación produce ácido cítrico líquido que luego se purifica, concentra y cristaliza.

El ácido cítrico ha llegado a ser el acidulante preferido por la industria de las bebidas, debido a que es el único que otorga a las bebidas gaseosas, en polvo o líquidas, propiedades refrescantes, de sabor y acidez naturales. El ácido cítrico y sus sales de sodio y potasio, actúan como conservantes en las bebidas y jarabes, contribuyendo al logro del gusto deseado mediante la modificación de los sabores dulces. Se aprovecha su capacidad para remover metales extraños que causan tur-

bidez, deterioran el color, el sabor y la vitamina C. El ácido cítrico supone casi las tres cuartas partes del consumo total de acidulantes.<sup>[1]</sup>

En la industria de frutas y vegetales encuentran aplicación el ácido cítrico y sus sales de sodio y potasio como mejoradores del sabor y conservantes, contribuyendo a asegurar el sabor original, la apariencia natural y la consistencia normal de los productos.

Se encuentra un amplio y seguro uso del ácido cítrico y sus sales en industrias tales como las de caramelos, postres, jaleas, dulces, compotas, conservas de carnes, salsas para ensaladas, productos derivados del huevo y pescados. También se usa para mejorar el sabor del helado, relleno de tortas y cremas de fruta. También tiene ciertas aplicaciones en los sectores de la carne y el pan (tratamiento de harina y aditivo en la cocción). En la tabla 1 se resumen los principales usos del ácido cítrico, en el sector de la alimentación.

En general, el ácido cítrico y sus sales, se usan también como constituyentes de formulaciones cosméticas, contribuyendo a mejorar la vida, la eficiencia y la apariencia del producto final. Fácilmente se observa su uso en productos para el cuidado del cabello, perfumes, cremas, lociones desodorantes, quita-esmaltes y jabones.

Por otro lado, cuando el ácido cítrico se combina con bicarbonato de sodio y otras sales, al agregarse agua se produce una bebida salina gaseosa, efervescente y refrescante. Esta combinación es especialmente efectiva en productos donde se desea una disolución rápida, buena apariencia visual y sabores singulares. Uno de los principales usos del ácido cítrico es en la producción de Alka Seltzer. El ácido cítrico provee además en las drogas la necesaria estabilización de los ingredientes activos por su acción antimicrobial y antioxidante. En el sector farmacéutico también tiene demanda el citrato de sodio, además de usarse en jarabes, es anticoagulante especial para bancos de sangre.

El ácido tartárico se encuentra en forma de sólido translúcido o blanco. Se ofrece en forma granular; es inodoro, sabor ácido fuerte y es estable al aire y a la luz. Su fórmula química es: COOH-CHOH-CHOH-COOH, donde los dos carbonos secundarios son asimétricos y equivalentes, pues ambos están unidos a idénticos radicales (-COOH, -H,-OH,-CHOH·COOH)



F. Sánchez

C. Bosch

M. Espinosa

A. J. Ruiz

<sup>a\*</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 20971 Málaga

<sup>b</sup> Departamento de Farmacia, Hospital General Universitario Virgen del Rocío, 41013 Sevilla

<sup>c</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga

C-e: [fsanchezr@uma.es](mailto:fsanchezr@uma.es)

Recibido: 11/01/2008. Aceptado: 16/04/2008.

Tabla 1. Usos del ácido cítrico en el sector alimenticio.

Sector	Uso
Bebidas	Saborizante y regulador de pH; incrementa la efectividad de los conservantes microbianos.
Dulces y conservas	Acidulante y regulador de pH para lograr óptima gelificación.
Caramelos	Acidulante y regulador de pH con el objetivo de alcanzar la máxima dureza de los geles.
Verduras procesadas	En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación.
Alimentos congelados	Ayuda a la acción de los antioxidantes, inhibe el deterioro del sabor y el color.
Frutas y hortalizas enlatadas	Disminuye el pH, al actuar como quelante; previene la oxidación enzimática y la degradación del color, resalta el sabor.
Aceites y grasas	Previene la oxidación.
Confitería y repostería	Se utiliza como acidulante, resaltador de sabores y para optimizar las características de los geles.
Quesos pasteurizados y procesados	En forma de sal, como emulsificante y texturizante.
Productos de la pesca	Para bajar el pH en presencia de otros conservantes o antioxidantes.
Carnes	Se utiliza como auxiliar del procesado y modificador de textura.
Lácteos	Estabilizante en cremas batidas.

por lo que existen dos formas ópticamente activas y dos inactivas (una, el ácido tartárico racémico, mezcla de las dos variedades activas y otra, el ácido mesotartárico, inactivo por compensación intramolecular). Todas las variedades son sólidas, cristalinas, incoloras y muy solubles en agua y en alcohol. Sus principales aplicaciones se recogen en la tabla 2.

Tabla 3. Determinaciones conjuntas de ácido cítrico y ácido tartárico

Muestra	Técnica	Comentario	Otros analitos	Ref
—	Valoración potenciométrica	Calibración multivariante, PLS	Ác. ascórbico	2
Vinos	Inyección secuencial(SI)-FTIR	PLS, rápido<3 min	Azúcares, alcohol, ác. málico, láctico, acético	3
Refrescos, azúcares	SI-FTIR	PLS	Ácido málico	4
Refrescos, azúcares	SI-FTIR	Extracción con fase sólida, PLS	Azúcares, ác. málico	5
Vino Txacoli (blanco y tinto), mosto de uva	HPLC, C <sub>18</sub> , UV 254 nm	HPLC, C <sub>18</sub> , UV 254 nm	0,1-10g L <sup>-1</sup> tart. 0,05-0,5 g L <sup>-1</sup> cit.	6
Vinos	HPLC, FTIR	Fase móvil 0,005M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1-10 mg mL <sup>-1</sup>	Glucosa, fructosa, glicerol, etanol, ác. acético, láctico, málico, succínico	7
Miel	HPLC, UV 210 nm	Eliminación de matriz con extracción en fase sólida, fase móvil H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ác. pirúvico, galacturónico, citramálico, glicólico, fórmico, acético, butírico, etc.	8
Cosméticos	HPLC, UV	Fase inversa, régimen isocrático	α-hidroxiácidos	9
Vino blanco (dulces y secos)	RP-HPLC, UV 210 nm	Fase móvil H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> DER=3,2% tar. DER=10,4% citr.	Ác. málico	10
—	LC, detección potenciométrica	Electrodo de membrana	Ác. malónico, málico, fumárico, succínico, pirúvico, etc	11
Alimentos, bebidas	HPLC, detección electroquímica	LD=0,5-7 μM	Ác. málico, láctico, fórmico, acético	12
Cerveza	HPLC, fase inversabatidas.	—	Ác. oxálico, málico, succínico, vitamina C	13
Vinagre balsámico	HPLC, columna cambio iónico	Método adiciones estándar	Glucosa, fructosa	14

Tabla 2. Principales aplicaciones del ácido tartárico.

Sector	Aplicación
Alimenticio	Como acidulante para vinos, mostos y derivados
	Como acidulante y estimulante del sabor en los bombones, congelados, confituras, néctares de frutas, helados alimentarios, gelatinas y pastas
	En las conservas de frutas, legumbres y pescados, en las que interviene como antioxidante sinérgico que además estabiliza el pH, el color, el sabor y el valor nutritivo
	En las grasas y aceites, en los que su efecto antioxidante evita que se pongan rancios
	En la preparación de bebidas gaseosas
	Como emulsionante y conservante en la fabricación de panes y de bollería industrial
Farmacéutico	Como excipiente o soporte del principio activo ayudando a corregir la alcalinidad
	Su fácil utilización, su estabilidad y su gran solubilidad lo convierten en una fuente de acidez muy apreciada para la preparación de antibióticos, píldoras y pastillas efervescentes
	Medicina para las cardiopatías y compuestos terapéuticos que combaten el SIDA
Químico	Producto reactivo de laboratorio, galvanotecnia, fotografía
	Para preparación de tártaros
	Como secuestrante de iones metálicos
Construcción	En la industria del cemento y del yeso, en las que su capacidad para retrasar el fraguado facilita las manipulaciones
	Para el pulido y la limpieza de metales

En la tabla 3 se resume la mayor parte de la investigación realizada, que se encuentra recogida en la bibliografía, desde los últimos diez años, y que tienen como objetivo las determinaciones conjuntas de ácido cítrico y ácido tartárico en diferentes muestras de alimentos y en formulaciones farmacéuticas utilizando diferentes técnicas de detección.

## Diseño experimental para la calibración y validación de ácido cítrico y ácido tartárico...

...Continuación Tabla 3. Determinaciones conjuntas de ácido cítrico y ácido tartárico

Muestra	Técnica	Comentario	Otros analitos	Ref.
Cerveza, alimentos, zumo de frutas, leche, vino, refrescos	HPLC C <sub>18</sub> , reacción fotoquímica, detección quimioluminiscente	Irradiación con luz visible en presencia de Fe <sup>3+</sup> y UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup> , luminol	Ác. láctico, málico, oxálico	15
Vinos, Zumo de frutas	HPLC, columna de exclusión de iones, detección potenciométrica	0,1-40nmol (20 µL inyección)	Ác. acético, láctico, málico, succínico	16
Vinos griegos (blanco y tinto)	HPLC-fase inversa, UV 230 nm,	Elución isocrática con KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,02M	Siete ácidos orgánicos	17
Zumo de frutas	HPLC-fase inversa,	Fase móvil H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /agua	Vitamina C, ác. oxálico, málico propiónico	18
Vino tinto, mosto	HPLC-fase inversa, UV	Fase móvil acetonitrilo/agua	Ác. málico, láctico, acético, etc	19
Café	GC, HPLC UV 210 nm	HPLC mejor que GC	Ác. oxálico, succínico, fumárico, málico,	20
Vinagre balsámico (Módona)	GC, HPLC C <sub>18</sub>	Extracción fase sólida para reducir interferencias, mejor HPLC para tartárico y cítrico	Ác. málico, succínico, glucónico	21
Mosto, vino	HPLC, exclusión iónica	Alcohol n-propílico (5%) y THF (4%) como modificador orgánico en la fase móvil. Diseño factorial para optimización de variables	Glicerina, etanol, ác. málico, succínico, fumárico, acético, glucosa, fructosa	22
Brandy de Jerez	HPLC, exclusión iónica, detección conductimétrica	pH 6,5	Ác. málico, fumárico, succínico, fórmico, acético	23
Vinagre	HPLC, exclusión iónica,	Elución isocrática, Diseño factorial	Ác. málico, láctico, acético	24
Zumo de frutas	Cromatografía de exclusión iónica, UV 210 nm	Elución isocrática con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; DER=1,5%-9,8%	Once ácidos orgánicos	25
Vino tinto	Cromatografía de exclusión de iones, Detección amperométrica	Electrodo estable 10 días; LD=3,28x10 <sup>-6</sup> M tar. 3,62 x10 <sup>-6</sup> M citr.	Ác. málico, acético, fórmico, succínico	26
Vinagre	Cromatografía iónica, columna de grafito, detección conductimétrica	Fase móvil ácido salicílico, tiempo de separación 15 min	Ác. acético, láctico, succínico, málico, Cl <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27
Alimentos	Cromatografía iónica, columna de grafito,	Fase móvil benzoato, tiempo de separación 10 min	Ác. acético, láctico, succínico, málico	28
Zumos de frutas	GC, resina cambio iónico, CO <sub>2</sub> supercrítico	LD=10 µg mL <sup>-1</sup> tart.	Ác. fumárico, isocítrico, málico succínico	29
Vinagre de Módona	GC	4,0-9,7 g Kg <sup>-1</sup> tart. 0,6-1,5 g Kg <sup>-1</sup> citr. Análisis multivariante	Azúcares, ác. málico, succínico	30
Frutas, miel	GC-MS	1-20 ng	Ác. oxálico, glicólico, pirúvico, levulínico, succínico, málico, palmítico, oleico, etc	31
Vinos	Cromatografía de cambio iónico, detección conductimétrica	pH 4,15; Fase móvil ácido ftálico 0,975 mM; LD=4,7 mg L <sup>-1</sup> cítrico.	Ác. acético, láctico, succínico, málico	32
Alimentos, bebidas	Electroforesis capilar, Detección UV indirecta	LD= 2x10 <sup>-6</sup> M	Ác. acético, láctico, succínico, málico, carbónico, aspártico, oxálico, ascórbico, glucónico	33
Zumo de uva, vino	Electroforesis capilar Detección UV indirecta	5-125 mg L <sup>-1</sup> ; ác. glicólico como estándar interno	Ác. málico, succínico, acético, láctico	34
Vino blanco, zumo de frutas	Electroforesis capilar	pH 4,9; relleno del capilar con ác. 6-aminohexanoico 20mM y ác. 2,4-dihidroxibenzoico5Mm	Ác. málico, succínico, acético, láctico	35
Pienso	Electroforesis capilar	Recuperaciones entre 85,1-107,3%	Ác. fórmico, fumárico, málico, acético, láctico, propiónico	36
Orina	Electroforesis capilar, detección electroquímica	-	Ác. policarboxílicos	37
Zumo de frutas	Electroforesis capilar de zona, detección amperométrica	pH 6,2, CPB y β-CD como flujo electroosmótico	Ác. di- tri- carboxílicos	38
Aguas	Electroforesis capilar de zona	LD= 90-200 µg L <sup>-1</sup>	Ác. orgánicos bajo PM	39
Suelo, tejidos vegetales	Electroforesis capilar de zona; detección UV indirecta a 185 nm	Capilar de sílice fundida con electrolito (fosfato 25 mM, TTAB 0,5 mM y acetonitrilo 15% a pH=6)	11 ác. orgánicos, y algunos aniones	40

...Continuación Tabla 3. Determinaciones conjuntas de ácido cítrico y ácido tartárico

Vino	Isotacoforesis, detección conductimétrica	pH= 2,9; DER= 3,5%	13 ác. orgánicos e inorgánicos	41
Frutas	Electroforesis capilar directa UV 200 nm	pH 7,2; Presión inyección=15 psi; Potencial =-15 kV	$\alpha$ -hidroxiácidos	42
Vinos	Electroforesis capilar, detección UV 185 nm	Adición Ca y Mg como complejantes en el electrolito, pH 9,3;	Ác. fórmico, fumárico, succínico, oxálico, málico, acético, láctico	43
Cerveza	Electroforesis capilar de zona-ESIMS	LD<0,05-0,7 mg L <sup>-1</sup>	11 ácidos de bajo peso molecular	44
Vinos	Electroforesis capilar, detección UV, inyección electrocinética	Ác. 2,6-piridin-dicarboxílico como electrolito de fondo, EDTA como enmascarante de trazas de metales	Ác. málico, succínico, acético, láctico	45
Vinos	Electroforesis capilar de zona, detección conductimétrica	DER= 3-5%; tiempo de análisis 10 min	22 ácidos orgánicos e inorgánicos	46
Bebidas	Electroforesis capilar de zona, detección directa UV 185 nm	Separaciones en menos de 3,5 min;; modificador de flujo osmótico TTAOH 2,5 mM; tampón fosfato pH 6,4	Ác. oxálico, fórmico, málico, succínico, maleico, glutámico, pirúvico, acético, láctico, butírico, benzoico, sórbico, ascórbico, glucónico	47

El conocimiento de la metodología estadística es un arma imprescindible para la obtención, análisis e interpretación de los datos que proceden de observaciones sistemáticas o de experimentaciones proyectadas, específicamente para conocer los efectos de uno o varios factores que intervienen en los fenómenos en estudio. Gran parte de la investigación en el campo de la ingeniería e industria es empírica y emplea en forma extensiva la experimentación. Los métodos estadísticos pueden incrementar grandemente la eficiencia de estos experimentos y, a menudo, reforzar las conclusiones obtenidas. Elegir el método adecuado de análisis es de suma importancia.

Dos métodos de análisis muy utilizados en la práctica son el análisis de variancia y el de regresión lineal, ambos pertenecientes a la familia de los modelos lineales generalizados. Frecuentemente, los métodos de regresión son utilizados para analizar datos que provienen de estudios que no fueron diseñados, este es el caso del estudio de fenómenos no controlados o de registros históricos; también son muy útiles en experimentos diseñados. Por lo general, el análisis de variancia en un experimento diseñado ayuda a determinar qué factores son importantes, usándose el de regresión para construir un modelo cuantitativo que relaciona los factores importantes con la respuesta. Usualmente el investigador se decide por alguna de las dos técnicas de análisis, dependiendo de los objetivos de su estudio, pero pocas veces se hace un estudio comparativo de ambas técnicas. Esta investigación pretende, precisamente, comparar ambas técnicas de análisis, para un conjunto de datos provenientes de un experimento controlado, determinar si existen diferencias entre ellas, tanto en los resultados obtenidos como en su aplicación práctica y la riqueza de análisis que ofrece cada una. En nuestro caso, el experimento controlado consiste en un procedimiento espectrofotométrico para el análisis simultáneo de ácido cítrico y ácido tartárico.

## Experimental

### Reactivos, instrumentación y software

- Disoluciones patrón de ácido cítrico y ácido tartárico de 1 g L<sup>-1</sup>.
- Espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-VIS.
- Programa Statgraphics plus 5.1 para el diseño experimental y los estudios estadísticos.

### Estudio preliminar

Las características espectrales de ambos analitos en soluciones homogéneas de ácido cítrico y ácido tartárico se establecen previamente. Debido al gran solapamiento espectral obtenido, es imposible la determinación simultánea de los mismos, mediante medidas espectrofotométricas convencionales, sin errores significativos.

### Matriz de calibración y análisis de datos

La matriz de calibración se ha diseñado estadísticamente sobre un intervalo de concentraciones entre 1 y 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito. Se ha realizado un diseño factorial multinivel (2<sup>4</sup>) que consiste en 32 ejecuciones. El diseño se ejecuta en 2 bloques y el orden de los experimentos se ha realizado totalmente de forma aleatoria para protegerlo contra los efectos de variables ocultas. Los valores experimentales de las variables de diseño que se han empleado se detallan en la tabla 4. Se registraron los espectros y se obtuvieron la primera, segunda, tercera y cuarta derivada de los mismos con el software del espectrofotómetro y se archivaron para ser usados en la calibración y predicción posterior.

Para el análisis de los datos se realizó un ajuste de los mismos a partir de un modelo cuadrático y otro de regresión lineal múltiple.

## Resultados y discusión

### Datos de absorbancia

Los resultados obtenidos para el modelo cuadrático a la longitud de onda seleccionada se recogen en la tabla 5. La tabla de análisis de la variancia (ANOVA) divide la variabilidad de la absorbancia en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. En este caso, 4 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05; indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

La ecuación de regresión del modelo ajustado es:

$$\text{Absorbancia} = 0,710777 + 0,00790571 \cdot [\text{ácido cítrico}] - 0,00759497 \cdot [\text{ácido tartárico}] - 0,000109052 \cdot [\text{ácido cítrico}]^2 +$$

Diseño experimental para la calibración y validación de ácido cítrico y ácido tartárico...

Tabla 4. Matriz de calibración

Ejecución	Bloque	Ácido cítrico (mg L <sup>-1</sup> )	Ácido tartárico (mg L <sup>-1</sup> )
1	1	6	6
2	1	4,4	1
3	1	1	1
4	1	4,4	6
5	1	4,4	2,8
6	1	1	2,8
7	1	2,8	1
8	1	2,8	6
9	1	6	1
10	1	1	4,4
11	1	2,8	2,8
12	1	6	2,8
13	1	2,8	4,4
14	1	4,4	4,4
15	1	1	6
16	1	6	4,4
17	2	4,4	4,4
18	2	2,8	1
19	2	6	1
20	2	1	4,4
21	2	2,8	2,8
22	2	6	2,8
23	2	1	1
24	2	4,4	1
25	2	4,4	6
26	2	6	6
27	2	2,8	6
28	2	1	6
29	2	1	2,8
30	2	4,4	2,8
31	2	6	4,4
32	2	2,8	4,4

$$0,000355154 \cdot [\text{ácido cítrico}] \cdot [\text{ácido tartárico}] + 0,00312037 \cdot [\text{ácido tartárico}]^2$$

Para una mayor comprensión de la influencia de las variables sobre la absorbancia, en la Figura 1 se representa la variación de dicha respuesta a lo largo de los respectivos intervalos de ensayo y en la Figura 2 se muestra la no existencia de interacción entre ellas. Además, en la Figura 3 se representa el diagrama de Pareto en el que aparecen ordenados gráficamente los efectos de los factores y de las interacciones, trazando una línea divisoria de los que se consideran significativos y los que no.

Por tanto, a la vista de los resultados anteriores, se procede a eliminar los efectos insignificantes, que son AA y AB, con lo que la nueva ecuación obtenida es:

$$\text{Absorbancia} = 0,707252 + 0,00840555 \cdot [\text{ácido cítrico}] - 0,00633417 \cdot [\text{ácido tartárico}] + 0,00312037 \cdot [\text{ácido tartárico}]^2$$

Tabla 5. Modelo cuadrático para absorbancia

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
A: ácido cítrico	0,00774984	1	0,00774984	16,29	0,0005
B: ácido tartárico	0,0264476	1	0,0264476	55,61	0,0000
AA	0,0000029877	1	0,0000029877	0,01	0,9375
AB	0,0000479724	1	0,0000479724	0,10	0,7534
BB	0,00244621	1	0,00244621	5,14	0,0322
Bloques	0,0037845	1	0,0037845	7,96	0,0092
Error total	0,0118904	25	0,0037845		
Total (corr.)	0,0522649	31			

R-cuadrado = 77,2497 %

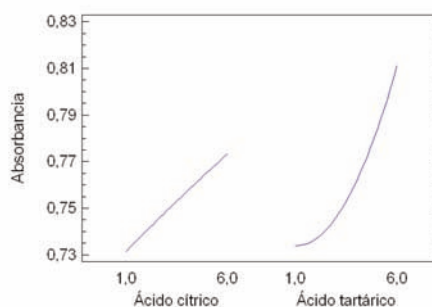


Figura 1. Gráfico de efectos principales

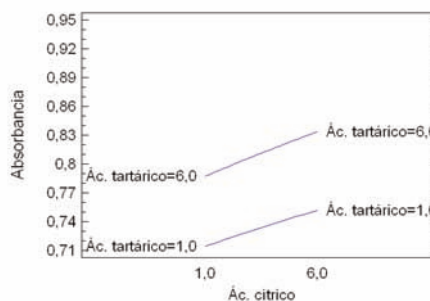


Figura 2. Gráfico de interacción

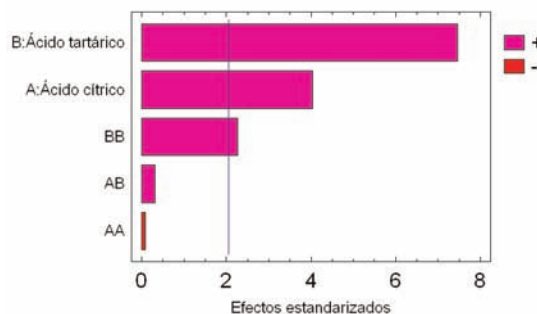


Figura 3. Gráfico de Pareto estandarizado

A continuación se realiza el ajuste del modelo de regresión lineal múltiple para la variable absorbancia, utilizando las concentraciones de ácido cítrico y ácido tartárico como variables independientes. La tabla 6 muestra los resultados del ajuste a un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre absorbancia y dos variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es:



Absorbancia = 0,680037 + 0,00840555 · [ácido cítrico] + 0,0154396 · [ácido tartárico]

Tabla 6. Modelo lineal múltiple

Análisis de regresión múltiple					
Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-valor	
Constante	0,680037	0,0127573	53,3059	0,0000	
A. cítrico	0,00840555	0,00238329	3,52687	0,0014	
A. tartárico	0,0154396	0,00238329	6,47829	0,0000	
Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	0,0340928	2	0,0170464	27,20	0,0000
Residuo	0,0181721	29	0,000626624		
Total (Corr.)	0,0522649	31			
R-cuadrado = 65,2308 %					

La segunda etapa del proceso de calibración consiste en obtener las variables dependientes de una o varias muestras, que junto con los coeficientes de regresión permiten predecir el valor de las variables independientes. Esta etapa se denomina de predicción y el conjunto de datos utilizados constituye el grupo o "set de predicción". Cuando esta operación se realiza con un conjunto de muestras de composición conocida, recibe el nombre de validación del procedimiento.

Al igual que la etapa anterior, la predicción se ha efectuado empleando los dos procedimientos descritos anteriormente. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 7, de los cuales se deduce que los dos análisis conducen a resultados muy parecidos.

Tabla 7. Resultados para la estimación de la absorbancia

Ácido cítrico (mg L <sup>-1</sup> )	Ácido tartárico (mg L <sup>-1</sup> )	Valor observado	Valor ajustado Regresión lineal	Valor ajustado Modelo cuadrático
1	1	0,718	0,703882	0,714454
1	2	0,733	0,719322	0,716575
1	3	0,75	0,734762	0,724937
2	2	0,725	0,727727	0,724864
3	3	0,763	0,751573	0,742007
2	4	0,77	0,758607	0,748539
3	6	0,804	0,797892	0,806669
2	1	0,76	0,712288	0,722388
3	1	0,82	0,720693	0,730103
1	4	0,728	0,750201	0,73954
1	5	0,745	0,765641	0,760384
1	6	0,781	0,78108	0,787468
4	1	0,738	0,729099	0,737601
5	1	0,746	0,737504	0,74488
6	1	0,752	0,74591	0,751942

## Datos de derivadas

Al igual que en el apartado anterior, para el análisis de los datos obtenidos empleando los espectros derivados (1ª, 2ª, 3ª y 4ª derivada) se realizó un ajuste de los modelos cuadrático y lineal múltiple. Los resultados obtenidos para el valor P mediante ANOVA se detallan en la tabla 8 así como los valores de R-cuadrado.

Como puede observarse en la tabla 8 sólo son significativos los efectos correspondientes al ácido cítrico (A) y al ácido tartárico (B), por lo que se pueden eliminar los efectos AA, AB y BB. De esta forma, las ecuaciones obtenidas por el modelo cuadrático coinciden exactamente con las del modelo de regresión lineal múltiple recogidas en la tabla 9.

Tabla 8. Análisis obtenido por el modelo cuadrático para las derivadas

Orden de la derivada	Valor P					R-cuadrado (%)
	Fuente					
	A: ác. cítrico	B: ác. tartárico	AA	AB	BB	
1ª derivada	0,0066	0,0000	0,6594	0,9559	0,0828	90,4688
2ª derivada	0,0075	0,0000	0,6428	0,9156	0,0768	90,75
3ª y 4ª derivada	0,0073	0,0000	0,6470	0,9413	0,0851	90,458

Tabla 9. Ecuaciones de los modelos ajustados por regresión lineal múltiple

Orden de la derivada	Ecuación
1ª derivada	Y = 0,0368322 + 0,000627719 · [ácido cítrico] + 0,00125934 · [ácido tartárico]
2ª derivada	Y = 0,0138489 + 0,00023033 · [ácido cítrico] + 0,000475979 · [ácido tartárico]
3ª y 4ª derivada	Y = 0,0302764 + 0,000511195 · [ácido cítrico] + 0,00103331 · [ácido tartárico]

La tabla 9 muestra las ecuaciones del modelo ajustado a un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre la señal y las dos variables independientes.

Del mismo modo que en el apartado anterior, la predicción se ha efectuado empleando los dos procedimientos descritos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 10, de los cuales se deduce que los dos análisis conducen a resultados similares cualquiera que sea el orden de la derivada.

## Conclusiones

El ácido cítrico y ácido tartárico son dos ácidos orgánicos muy interesantes desde el punto de vista de sus aplicaciones, por lo que han sido escogidos para la realización de este estudio, en el cual se han obtenido las calibraciones individuales de ácido cítrico y ácido tartárico, utilizando señales en absorbancia, y en derivadas desde la primera a la cuarta.

Para la calibración conjunta se ha hecho uso del programa Statgraphics plus 5.1 para la creación de la matriz de calibración, utilizando un diseño factorial multinivel (2<sup>4</sup>) que consiste en 32 ejecuciones. El diseño se ejecuta en 2 bloques y el orden de los experimentos se ha realizado de forma totalmente aleatoria para protegerlo contra los efectos de variables ocultas.

## Diseño experimental para la calibración y validación de ácido cítrico y ácido tartárico...

Tabla 10. Resultados para la estimación de las derivadas


Ác. cítrico (mgL <sup>-1</sup> )	Ác. tartárico (mgL <sup>-1</sup> )	Orden de la derivada								
		Primera			Segunda			Tercera y Cuarta		
		Valor obs.	Modelo regresión lineal	Modelo cuadrático	Valor obs.	Modelo regresión lineal	Modelo cuadrático	Valor obs.	Modelo regresión lineal	Modelo cuadrático
1	1	0,0384	0,0387193	0,0392012	0,0144	0,0145552	0,0147232	0,0315	0,0318209	0,0321972
1	2	0,0373	0,0399786	0,0394694	0,0148	0,0150311	0,0148264	0,0319	0,0328542	0,0324236
1	3	0,0369	0,0412379	0,0402441	0,0150	0,0155071	0,0151229	0,0322	0,0338875	0,0330646
2	2	0,0380	0,0406063	0,0403557	0,0150	0,0152615	0,0151616	0,0320	0,0333654	0,0331589
3	3	0,0411	0,0424934	0,0418788	0,0161	0,0159678	0,015735	0,0342	0,0349099	0,034414
2	4	0,0414	0,043125	0,0423987	0,0165	0,0162134	0,0159387	0,0343	0,035432	0,0348416
3	6	0,0455	0,0462714	0,0472035	0,0170	0,0173957	0,0177566	0,0378	0,0380098	0,0387832
2	1	0,0389	0,039347	0,0400938	0,0145	0,0147855	0,015063	0,0323	0,0323321	0,0329395
3	1	0,0408	0,0399747	0,0408614	0,0152	0,0150158	0,0153535	0,0338	0,0328433	0,0335745
1	4	0,0423	0,0424973	0,0415252	0,0159	0,0159831	0,0156126	0,0347	0,0349208	0,0341203
1	5	0,0393	0,0437566	0,0433128	0,0172	0,0164591	0,0162956	0,0366	0,0359541	0,0355907
1	6	0,0487	0,0450159	0,0456069	0,0183	0,0169351	0,0171719	0,0400	0,0369874	0,0374757
4	1	0,0388	0,0406024	0,041504	0,0146	0,0152462	0,0155949	0,0356	0,0333545	0,0341024
5	1	0,0381	0,0412301	0,0420215	0,0170	0,0154765	0,0157872	0,0367	0,0338657	0,034523
6	1	0,0403	0,0418579	0,042414	0,0174	0,0157068	0,0159303	0,0371	0,0343769	0,0348364

Se han analizado los datos obtenidos mediante un modelo cuadrático y un modelo de regresión lineal múltiple. La validación del procedimiento se ha llevado a cabo mediante el análisis ANOVA y de regresión lineal múltiple para cada uno de los datos obtenidos, esto es absorbancia, primera derivada, segunda derivada, tercera derivada y cuarta derivada concluyendo que los dos análisis conducen a resultados similares.

## Bibliografía

- [1] H. A. Wittcoff, B. G. Reuben, "Productos Químicos Orgánicos Industriales. Tecnología, Formulaciones y Usos" 2, México **2000**, 408–412.
- [2] M. Akhond, J. Tashkhourian, B. Hemmateenejad, *J. Anal. Chem.*, **2006**, *61*, 804–808.
- [3] R. Shindler, R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1998**, *362*, 130–136.
- [4] M. J. Ayora-Cañada, B. Lendl, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *417*, 41–50.
- [5] H. Lethanh, B. Lendl, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *422*, 63–69.
- [6] A. Escobal, J. González, C. Iriondo, C. Laborra, *Food Chem.*, **1997**, *58*, 381–384.
- [7] R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, *J. Chromatog. A*, **1998**, *824*, 159–167.
- [8] M. J. Del Nozal, J. L. Bernal, P. Marinero, J. C. Diego, J. I. Frechilla, M. Higes, J. Llorente, *J. Liquid Chromatog. Related Technol.*, **1998**, *21*, 3197–3214.
- [9] I. Nicoletti, C. Corradini, E. Cogliandro, A. Cavazza, *Inter. J. Cosmetic Sci.*, **1999**, *21*, 265–274.
- [10] M. Kordis-Krapez, V. Abram, M. Kac, S. Ferjancic, *Food Technol. Biotechnol.*, **2001**, *39*, 93–99.
- [11] D. Zielinska, I. Poels, M. Pietraszkiewicz, J. Radecki, H. J. Geise, L. J. Nagels, *J. Chromatog. A*, **2001**, *915*, 25–33.
- [12] I. G. Casella, M. Gatta, *J. Agricultural Food Chem.*, **2002**, *50*, 23–28.
- [13] C. Zhanguo, L. Jiuru, *J. Chromatog. Sci.*, **2002**, *40*, 35–39.
- [14] D. Sanarico, S. Motta, L. Bertolini, A. Antonelli, *J. Liquid Chromatog. Related Technol.*, **2003**, *26*, 2177–2187.
- [15] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *J. Chromatog. A*, **2004**, *1026*, 57–64.
- [16] A. Kotani, Y. Miyaguchi, E. Tomita, K. Takamura, F. Kusu, *J. Agricultural Food Chem.*, **2004**, *52*, 1440–1444.
- [17] A. Zotou, Z. Loukou, O. Karava, *Chromatographia*, **2004**, *60*, 39–44.
- [18] M. D. Pundlik, *J. Indian Chem. Soc.*, **2004**, *81*, 721–723.
- [19] Z. Kerem, B. A. Bravdo, O. Shoseyov, Y. Tugendhaft, *J. Chromatog. A*, **2004**, *1052*, 211–215.
- [20] G. N. Jham, S. A. Fernandes, C. F. García, A. A. da Silva, *Phytochemical Anal.*, **2002**, *13*, 99–104.
- [21] M. Cocchi, P. Lambertini, D. Manzini, A. Marchetti, A. Ulrici, *J. Agricultural Food Chem.*, **2002**, *50*, 5255–5261.
- [22] F. Chinnici, U. Spinabelli, A. Amati, *J. Liquid Chromatog. Related Technol.*, **2002**, *25*, 2551–2560.
- [23] D. A. Guillén, C. G. Barroso, L. Zorro, V. Carrascal, J. A. Pérez-Bustamante, *Analisis*, **1998**, *26*, 186–189.
- [24] M. L. Morales, A. G. González, A. M. Troncoso, *J. Chromatog. A*, **1998**, *822*, 45–51.
- [25] D. H. Guo, L. Xia, *Chinese J. Chromatog.*, **2001**, *19*, 276–278.
- [26] J. Xu, Y. Wang, Y. Xian, M. Liu, L. Jin, Tanaka K., *Chromatographia*, **2003**, *57*, 751–756.
- [27] A. Sakuragawa, M. Nakane, *Bunseki Kagaku*, **2004**, *53*, 851–856.
- [28] K. Yoshikawa, M. Okamura, M. Inokuchi, A. Sakuragawa, *Bunseki Kagaku*, **2005**, *54*, 1215–1218.
- [29] T. J. Barden, M. Y. Croft, E. J. Murby, R. J. Wells, *J. Chromatog. A*, **1997**, *785*, 251–261.
- [30] M. Cocchi, C. Durante, M. Grandi, P. Lambertini, D. Manzini, A. Marchetti, *Talanta*, **2006**, *69*, 1166–1175.
- [31] I. Molnar-Perl, A. Vasani, K. Horvath, *Chromatographia*, **1998**, *48*, 111–119.

- [32] C. Mongay, A. Pastor, C. Olmos, *J. Chromatog. A*, **1996**, 736, 351–357.
- [33] C. H. Wu, Y. S. Lo, Y. H. Lee, T. I. Lin, *J. Chromatog. A*, **1995**, 716, 291–301.
- [34] T. Kandl, S. Kupina, *American J. Enology Viticulture*, **1999**, 50, 155–161.
- [35] M. S. Nutku, F. B. Erim, *J. Microcolumn Separations*, **1999**, 11, 541–543.
- [36] E. Ishikuro, H. Hibino, T. Soga, H. Yanai, H., *J. Sawada, Food Hygienic Soc. Japan*, **2000**, 41, 261–267.
- [37] W. C. Yang, Y. Q. Dai, A. M. Yu, H. Y. Chen, *J. Chromatog. A*, **2000**, 867, 261–269.
- [38] W. C. Yang, A. M. Yu, Y. Q. Dai, H. Y. Chen, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 415, 75–81.
- [39] J. Hagberg, J. Dahlen, S. Karlsson, B. Allard, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **2000**, 78, 385–396.
- [40] R. Naidu, Z.L. Chen, *Chromatographia*, **2001**, 54, 495–500.
- [41] M. Masar, D. Kaniansky, R. Bodor, M. Johnck, B. Stanislawski, *J. Chromatog. A*, **2001**, 916, 167–174.
- [42] S. Vorarat, C. Aromdee, Y. Podokmai, *Anal. Sci.*, **2002**, 18, 893–896.
- [43] M. V. G. Moreno, C. J. Jurado, C. G. Barroso, *Chromatographia*, **2003**, 57, 185–189.
- [44] J. Hagberg, *J. Chromatog. A*, **2003**, 988, 133–139.
- [45] A. De Villiers, F. Lynen, A. Crouch, P. Sandra, *European Food Res. Technol.*, **2003**, 217, 535–540.
- [46] M. Masar, K. Poliakova, M. Dankova, D. Kaniansky, B. Stanislawski, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 905–914.
- [47] I. Mato, J. F. Huidobro, J. Simal-Lozano, M. T. Sancho, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 565, 190–197.



**Microtechnology for single crystal diffraction**

**MicroMounts™**  
Easier crystal retrieval

Less background X-ray scatter

No vibrations in the cryostream

**MicroTools™**  
Microfabricated tools for common crystal manipulation tasks including:

- (1) dislodging
- (2) separating
- (3) transferring
- (4) cutting
- (5) repositioning and (6) measuring crystals as small as 20 microns.

 **diffractia.com**  
Estructuras Analíticas, S.L.

[www.diffractia.com](http://www.diffractia.com)  
[info@diffractia.com](mailto:info@diffractia.com)