

i 20660649

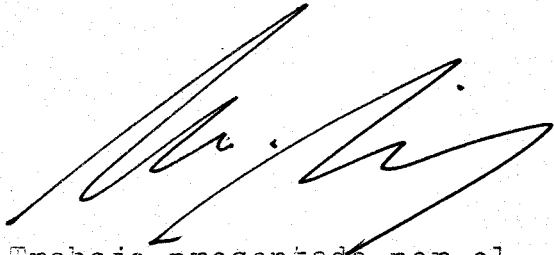
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUIMICAS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE QUIMICAS
28-5-70
LRA

+11138

AZUCARES EN ACEITUNAS VERDES



Trabajo presentado por el
Licenciado D. Manuel Rivas
Moreno para optar al Grado
de Doctor en Ciencias Quí-
micas.

DEPARTAMENTOS DE QUIMICA ORGANICA Y QUIMICA TECNICA DE LA
FACULTAD DE QUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA E INSTI
TUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS, DEL CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, SEVILLA.

Vº Bº

El Catedrático Padrino
y CoDirector de la Tesis

Edo.: J. Martínez Moreno
Catedrático de Química
Técnica de la Universidad
de Sevilla.

Vº Bº

Los CoDirectores de la Tesis

Edo.: J. Fernández-Bolaños
Profesor de Investigación
del C.S.I.C.

Edo.: M. Fernández-Diez
Profesor de Investigación
del C.S.I.C.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada - en los Departamentos de Química Orgánica y Química Técnica de la Facultad de Químicas de la - Universidad de Sevilla bajo la dirección de los Profesores Doctores D. Juan Martínez Moreno, Catedrático de Química Técnica de la Universidad de Sevilla, D. José Fernández-Bolaños y D. Ma--tías Fernández-Diez, Profesores de Investiga---ción del C.S.I.C.

El autor desea expresar su más sincero agradecimiento: Al Profesor Doctor D. José Ma--ría Viguera Lobo, que fué Jefe de este Departamento por las facilidades dadas para la realización de la presente Tesis Doctoral; al Profesor Doctor D. Juan Martínez Moreno, padrino de esta Tesis; a los Profesores Doctores D. José Fernández-Bolaños y D. Matías Fernández-Diez por su - dirección y constante ayuda; a la Doctora D^a Antonia Heredia Moreno por la ayuda prestada; a - la Empresa Medina Garvey y especialmente a D. José Márquez por las facilidades dadas en el suministro de aceitunas; a los Licenciados D^a Teresa Pérez Romero, D. Antonio Gil Serrano y D. Fernando Iglesias Guerra por su colaboración; a todos los demás compañeros de laboratorio por su constante ayuda y estímulo.

I. INTRODUCCION

Una revisión bibliográfica sobre la química y bioquímica de los hidratos de carbono en la aceituna (1,2) - pone de manifiesto el papel fundamental que estos compuestos desempeñan en la biogénesis del aceite de oliva, en el aspecto y conservación del fruto y en los procesos fermentativos del aderezo.

Al mismo tiempo esta revisión nos hace ver lo limitado que es aún el conocimiento sobre la naturaleza y composición de los hidratos de carbono en este fruto.

Según la bibliografía la identificación de los monosacáridos existentes en la pulpa de aceitunas deshuesadas, sólo se ha hecho en cromatografía de papel en algunas variedades del área mediterránea pero no de esta región.

Las determinaciones analíticas cuantitativas de azúcares reductores y totales se realizan de forma global y no específica.

Se desconoce la naturaleza de los oligosacáridos, con la excepción de la sacarosa, cuyo contenido tampoco se ha cuantificado.

En relación con los polisacáridos no se han realizado estudios estructurales. Se desconoce la naturaleza de los polisacáridos de reserva, de las hemicelulosas y de las pectinas o sustancias relacionadas.

Por todo ello resulta necesario realizar un estu-

dio sistemático de los hidratos de carbono en la aceituna. Con este fin iniciamos una investigación coordinada entre el Instituto de la Grasa y sus derivados, con el propósito de que estos estudios puedan también contribuir a la mejora de los procesos industriales del aderezo, de la conservación de la aceituna y de la extracción del aceite.

En esta memoria estudiamos en un primer apartado la identificación de los monosacáridos y oligosacáridos libres existentes en la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", siendo necesarias para la identificación de los que existen en pequeña proporción, unas separaciones cromatográficas previas sobre columnas de celulosa y de carbón.

En un segundo apartado se describe el estudio realizado sobre las determinaciones de los azúcares reductores y azúcares totales por diversos métodos volumétricos y colorimétricos, haciendo énfasis en el tratamiento preliminar de purificación de las muestras por defecación y paso por resinas de intercambio iónico.

A continuación se describe la puesta a punto del método de determinación cuantitativa específica de mezcla de azúcares por cromatografía de papel, que aplicamos en las determinaciones de glucosa, fructosa y sacarosa en aceitunas de la variedad "manzanilla".

En el apartado que sigue se estudia la puesta a punto del método de determinación cuantitativa de mezclas de azúcares por cromatografía gas-líquido, que aplicamos posteriormente en las determinaciones de glucosa, fructosa, sacarosa y manitol en aceitunas de las variedades manzanilla, gordal, hojiblanca y verdial.

En otro apartado se describen las determinaciones enzimáticas de glucosa en los extractos de pulpa de aceitunas sin que sea necesaria una separación previa de los componentes de la mezcla.

Posteriormente se estudia la identificación y cuantificación de los monosacáridos que se encuentran en la pulpa en forma combinada, esto es formando polisacáridos. Estos se encuentran en el producto insoluble que queda al extraer la pulpa húmeda con etanol acuoso al 80% y posteriormente con hexano y acetona. Este producto se hidroliza con ácido sulfúrico y en el hidrolizado se identifican los monosacáridos mediante la cromatografía sobre papel y la cromatografía gas-líquido. Los azúcares presentes se determinan cuantitativamente de forma global por el método colorimétrico de la antrona-ácido sulfúrico e individualmente por cromatografía gas-líquido como acetatos de los correspondientes alditoles.

Finalmente se incluye un apartado en el que se --
discuten los resultados obtenidos.

II. MONOSACARIDOS Y OLIGOSACARIDOS EN LA
FULPA DE ACEITUNAS DE LA VARIEDAD -
MANZANILLA.

IDENTIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE
PAPEL.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La identificación de los monosacáridos en la aceituna ha sido objeto de diversos trabajos a partir de 1930. Parisi y de Vito (3) señalan la presencia de glucosa en los frutos verdes. Marcellet (4) describe la presencia en el alpechín de glucosa, fructosa, manosa y galactosa, --- mientras que Nuccorini (5) niega la presencia de manosa. Más recientemente, Núñez y Spiteri (6) analizan por cromatografía sobre papel los alpechines de aceitunas sobremaduras y atrojadas demostrando la presencia de glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa. Nichols (7) y Leoncini y Rogai (8) encuentran oligosacáridos hidrolizables, posiblemente sacarosa. Sandret (9) identifica por cromatografía sobre papel en aceitunas verdes la glucosa y fructosa como azúcares mayoritarios y en pequeña cantidad sacarosa. En los frutos maduros o pasados ha encontrado pequeñas -- cantidades de xilosa, galactosa y manosa y dos oligosacáridos reductores que en la hidrólisis originan glucosa, - arabinosa y xilosa. Petruccioli (10) identifica por cromatografía sobre papel en extractos de pulpa de las variedades italianas: "canino", "carboncella", "frantoio", "lec-cino", "maurino", "moraiolo" y "morchiaio"; fructosa, glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, manosa y sacarosa. Fi-nalmente Rágazzi y Veronese (11) identifican por cromato-grafía sobre papel en el alpechín de aceitunas maduras -- glucosa y fructosa.

La mayoría de estos trabajos se han realizado en aceitunas del área mediterránea pero no de esta región -- por lo que nos propusimos estudiar la variedad "manzani--lla", *Olea europea pomiformis*, muy abundante en nuestra - zona.

En este capítulo se detallan los trabajos de identificación de monosacáridos y oligosacáridos existentes en los extractos de pulpa de aceitunas deshuesadas mediante las técnicas de la cromatografía sobre papel.

Para llevar a cabo este análisis cualitativo se han obtenido los R_G de las pentosas, hexosas y oligosacáridos más frecuentes en las plantas, en cromatografía descendente y horizontal sobre papel Whatman nº 3 MM empleando distintos desarrolladores y reveladores. Estos valores R_G no se encuentran descritos en la bibliografía.

Para la identificación de los azúcares que existen en la pulpa en pequeñas cantidades, junto con cantidades mayoritarias de glucosa, fructosa y manitol, se hizo necesario una separación cromatográfica de reparto sobre columnas de celulosa para los monosacáridos y de absorción sobre columnas de carbón para los oligosacáridos.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Aceitunas

Se han utilizado aceitunas de la variedad "manzanilla" (*Olea europea pomiformis*) recogidas en olivares de la Provincia de Sevilla, en los meses de Julio, Octubre y Noviembre.

Muestra A (10-7-1974)

Muestra B (23-7-1974)

Muestra C (3-10-1974)

Muestra D (18-11-1977)

Muestra E (16-10-1975)

2.2. Extracción de monosacáridos y oligosacáridos

La extracción se realiza por un procedimiento análogo al descrito por Fernández-Diez y col. (12).

Las aceitunas verdes y de buen tamaño se deshuesan en una máquina de tipo manual y se trituran en una batidora Turmix.

Las aceitunas recogidas en Julio, en las que no está completamente diferenciada la pulpa del hueso la separación se realiza a mano con un cuchillo.

La pulpa se estabiliza con etanol a ebullición para evitar que puedan ocurrir procesos enzimáticos.

En matraces Erlenmeyer de 1000 ml provistos de refrigerante de reflujo se ponen 600 ml de etanol del 95% (teniendo en cuenta la humedad de la pulpa la concentración final de extracto puede ser aproximadamente del 30% en alcohol); 200 g de pulpa se colocan en cada matraz y se lleva a ebullición que se mantiene durante hora y media. Se enfría y se conserva en un frigorífico.

Estabilizada la muestra se filtran los extractos y obtenemos la disolución I. El residuo se pasa a extractores Soxhlet donde se extrae con etanol del 70%, con objeto de que el vapor condensado sobre la muestra sea aproximadamente del 80%. Se continúa la extracción hasta que el etanol del extractor esté incoloro. Este extracto constituye la disolución II. Las disoluciones etanólicas I y II

se concentran separadamente y se llevan a disoluciones --
acuosas. Una vez comprobado por cromatografía de papel --
que la composición en azúcares de ambas disoluciones son
análogas se unen y se filtran.

Un volumen de 500 ml de la disolución resultante
que corresponde a 600 g de pulpa se hace pasar por colum-
nas conteniendo resinas cambiadoras de iones. Estas colum-
nas se lavan con agua recogiendo un volumen igual a ocho
veces el volumen del lecho.

Con las muestras A, B y C se han utilizado:

- 320 ml de resina húmeda IR - 120 H⁺
- 720 ml de resina húmeda IRA-400 OH⁻

La disolución incolora que se obtiene se concen--
tra a sequedad resultando un sólido blanco.

Con la muestra D la disolución acuosa se defeca -
con acetato neutro de plomo y a continuación se desminera-
liza con resinas de cambio iónico IR-120 H⁺ y IR-45 OH⁻.

Se concentra en rotavapor obteniéndose un sirupo.

La muestra E se estabiliza calentando con agua a
80-90° durante 6 horas. La disolución resultante se con--
centra en rotavapor hasta sirupo.

2.3. Identificación de azúcares por cromatografía en - papel

La cromatografía de papel es muy eficaz en el aná-
lisis cualitativo de mezclas de azúcares (13,14).

La fase previa en el análisis cromatográfico de mezclas de azúcares en extractos de plantas es la desionización que se realiza mediante el empleo de resinas de intercambio iónico (15) y la defecación que se efectúa ordinariamente con acetato de plomo (16). Ambos procesos se han detallado en el apartado anterior.

Las técnicas utilizadas han sido la descendente monodimensional y la circular.

En ocasiones se ha empleado el desarrollo múltiple para conseguir una mayor separación de los azúcares.

El papel ha sido Whatman nº 1, 3 y 3 MM.

La cromatografía descendente se ha realizado sobre tiras de papel de 58 ó 49 cm. de longitud, según el tamaño del tanque utilizado y de anchura variable según el número de puntos que se hayan colocado, habiendo dejado 2,5 cm. de intervalo y 3 cm. del borde del papel.

La cromatografía circular se ha realizado en círculos de papel de 28 cm. de diámetro divididos en 16 partes.

Las disoluciones de referencia se han preparado al 2% con monosacáridos y al 5% con disacáridos.

Los desarrolladores utilizados han sido los siguientes:

- a) Butanol saturado de agua (15)
- b) Butanol-ácido acético-agua 4:5:1 (15)

- c) Butanol-piridina-agua 6:4:3 (17)
- d) Butanol-acetona-agua 2:7:1 (18,19)
- e) Nitrometano-etanol-ácido acético-agua saturada de ácido bórico 8:1:1:1 (20)
- f) Acetato de etilo-piridina-agua 8:3:1 (21)
- g) Acetato de etilo-piridina-agua 10:4:3 (22)
- h) Acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua 18:3:1:4 (23)

Los reveladores utilizados han sido los siguientes:

- Nitrato de plata-hidróxido sódico (24)
- Alfa-naftol y ácido fosfórico (25)
- Ftalato ácido de anilina (Partridge) (26)
- Difenilamina-anilina y ácido fosfórico,I (27)
- Difenilamina-anilina y ácido fosfórico,II (28)
- Difenilamina-urea y ácido fosfórico (29)
- Difenilamina-p-anisidina y ácido fosfórico (29)
- Cloruro de trifeniltetrazolio (30)

Nitrato de plata-NaOH (24).- Se prepara una disolución que contiene 1 ml de solución saturada de nitrato de plata en 200 ml de acetona. El cromatograma una vez se co se sumerge en esta disolución, se deja secar y se introduce en una solución de hidróxido sódico 0,5 N en etanol. El exceso de plata se elimina lavando con una disolución de tiosulfato sódico al 20%.

Cuando el cromatograma se desarrolla en nitrometano-etanol-ácido acético-agua saturada de ácido bórico ---

(8:1:1:1), en el revelado con nitrato de plata-NaOH la solución 0,5 N de hidróxido sódico etanólico contiene un 4% de pentaeritritol (20) para facilitar la detección de los polioles en presencia de ácido bórico.

α -Naftol y ácido fosfórico (25).- Este reactivo se prepara de la forma siguiente: Una disolución etanólica de α -naftol al 1% se mezcla con ácido fosfórico (del 85% aproximadamente) en la proporción de 10:1 v/v. Después de aplicado sobre el papel mediante un pincel o sumergiendo el cromatograma en la disolución reveladora, se deja secar al aire y a continuación se calienta en una estufa a 90° hasta que aparezcan las manchas (aproximadamente 10 minutos). Con este reactivo se revelan los azúcares no reductores, originando manchas de color violeta.

Ftalato ácido de anilina (reactivo de Partridge)
(26).- Se disuelve anhídrido ftálico (3,2 g) en butanol saturado de agua (200 ml) y se le añade anilina (1,7 ml). Para revelar se sumerge el cromatograma en el reactivo, se deja secar al aire y a continuación se calienta en una estufa a 110-120° durante 10 ó 15 minutos.

Difenilamina-anilina y ácido fosfórico (27,28).-

a) La preparación de este reactivo es como sigue: se disuelve difenilamina (4 g), anilina (4 ml) en acetona (200 ml) y a continuación se le añade a la mezcla ácido fosfórico (20 ml del 80%). La aplicación al cromatograma se realiza de la misma forma que con el reactivo α -naftol

y ácido fosfórico, calentándose en la estufa a 80° durante 8 minutos. Los cromatogramas revelados de esta forma presentan manchas de distintos colores dependiendo de los distintos azúcares que las han originado.

b) Se prepara de manera análoga a la indicada en el apartado a) utilizando etanol en lugar de acetona. El calentamiento se realiza a 80° durante 10 minutos.

Difenilamina-urea y ácido fosfórico (29)..- Se prepara mezclando volúmenes iguales de las siguientes disoluciones:

Disolución 1: Se disuelve difenilamina (2 g) en acetona (100 ml) y se le añade ácido fosfórico concentrado (10 ml del 80 al 85%).

Disolución 2: Se disuelve urea (3 g) en butanol saturado de agua (100 ml) y se le adiciona ácido fosfórico concentrado (10 ml).

El procedimiento para revelar es el siguiente: se sumergen en la solución reveladora, se dejan secar al aire y después se calientan en una estufa a ~~95-100°~~ durante 5 ó 6 minutos.

Difenilamina-para-anisidina y ácido fosfórico (29)..-

Se preparan volúmenes iguales de las siguientes disoluciones:

Disolución 1: Se disuelve difenilamina (2 g) en acetona (100 ml) y se le añade ácido fosfórico concentrado (10 ml).

Disolución 2: Se disuelve p-anisidina (2 g) en -- etanol (100 ml) y se le añade ácido fosfórico concentrado (10 ml).

El procedimiento de revelado es el siguiente: Se sumerge el cromatograma en la disolución reveladora, se -- seca al aire y se calienta a 90-95° durante 2 ó 3 minutos.

Cloruro de trifeniltetrazolio (30)..- Se prepara -- una disolución al 0,5% de cloruro de trifeniltetrazolio -- en cloroformo y una disolución 0,5 N de hidróxido sódico en etanol.

Se revela pulverizando el cromatograma con la di- solución primera, se deja secar al aire y a continuación se pulveriza con la disolución de hidróxido sódico. Se se -- ca y se calienta a 50-55° durante 40 minutos.

En las tablas I al IV, ambas inclusives, se expo- nen los valores R_G de los compuestos de referencia con -- los distintos desarrolladores utilizados.

Tabla I (1)

Valores R_G de azúcares sobre papel Whatman nº 3 MM.

<u>Compuesto</u>	<u>Desarrolladores</u>			
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>d</u>	<u>e</u>
Glucosa	1,00	1,00	1,00	1,00
Manosa	1,41	1,17	1,40	1,27
Galactosa	0,84	0,87	0,87	1,46
Fructosa	1,23	1,11	1,24	1,73
Sorbosa	1,41	1,12	--	1,60
Xilosa	1,85	1,29	2,09	2,41
Ribosa	2,27	1,39	2,72	4,65
Arabinosa	1,52	1,12	1,65	2,36
Ramnosa	3,22	1,58	2,96	3,66
Maltosa	0,25	0,74	0,27	0,25
Lactosa	0,14	0,55	0,17	0,29
Sacarosa	0,45	0,88	--	0,39
Manitol	0,94	0,97	1,07	1,69
Sorbitol	0,97	--	--	2,14
Dulcitol	--	--	--	2,17

Desarrolladores:

a.- Butanol saturado de agua.

b.- Butanol-piridina-agua (6:4:3).

d.- Butanol-acetona-agua (2:7:1).

e.- Nitrometano-etanol-ácido acético-agua saturada de ácido bórico (8:1:1:1).

(1) Cromatografía descendente.

Tabla II (1)

Valores R_G de azúcares sobre papel Whatman nº 3 MM.

<u>Compuesto</u>	<u>Desarrolladores</u>			
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>d</u>	<u>e</u>
Glucosa	1,00	1,00	1,00	1,00
Manosa	1,18	1,01	1,15	1,19
Galactosa	0,96	0,96	0,98	1,29
Fructosa	1,22	1,04	1,11	1,39
Sorbosa	1,18	0,97	1,07	--
Xilosa	1,48	1,13	1,23	1,64
Ribosa	1,61	1,16	1,26	2,47
Arabinosa	1,21	1,04	1,08	1,64
Ramnosa	1,90	1,21	1,38	2,06
Maltosa	0,47	0,82	0,71	0,42
Lactosa	0,33	0,72	0,57	0,40
Sacarosa	0,57	0,89	0,85	0,53
Manitol	0,96	1,01	1,03	1,58
Sorbitol	--	0,92	--	--

Desarrolladores:

a.- Butanol saturado de agua.

b.- Butanol-piridina-agua (6:4:3).

d.- Butanol-acetona-agua (2:7:1).

e.- Nitrometano-etanol-ácido acético-agua saturada de ácido bórico (8:1:1:1).

(1) Cromatografía circular.

Tabla III (1)

Valores R_{Fr} de azúcares sobre papel Whatman nº 3 MM.

<u>Compuesto</u>	<u>Desarrolladores</u>			
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>d</u>	<u>e</u>
Fructosa	1,00	1,00	1,00	1,00
Sacarosa	0,45	0,81	0,82	0,37
Sorbosa	0,92	0,93	1,03	0,99

Desarrolladores:

a.- Butanol saturado de agua.

b.- Butanol-piridina-agua (6:4:3).

d.- Butanol-acetona-agua (2:7:1).

e.- Nitrometano-etanol-ácido acético-agua saturada de ácido bórico (8:1:1:1).

(1) Cromatografía circular.

Tabla IV (1)

Valores R_G de azúcares sobre papel Whatman nº 3

<u>Compuesto</u>	<u>Desarrolladores</u>			<u>Reveladores</u>	
	<u>a</u>	<u>d</u>	<u>g</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Glucosa	1,00	1,00	1,00	Verde	rosa-brillante
Fructosa	1,40	--	1,17	--	gris-verde
Sacarosa	0,47	0,60	0,77	Verde oscuro	gris-morado
Maltosa	0,26	0,35	0,62	Verde-azul	rosa (pasa a amarillo)
Lactosa	0,19	0,24	0,40	azul	rosa (pasa a naranja)

Desarrolladores:

- a.- Butanol saturado de agua.
- d.- Butanol-acetona-agua (2:7:1)
- g.- Acetato de etilo-piridina-agua (10:4:3).

Reveladores:

- A.- Difenilamina-anilina y ácido fosfórico.
- B.- Difenilamina-urea y ácido fosfórico.

(1) Cromatografía descendente.

2.4. Separación de monosacáridos y oligosacáridos por cromatografía sobre columnas de celulosa y columnas de carbón

El desarrollo del método de separación de azúcares por cromatografía de partición sobre columnas de celulosa se debe a Hough y col. (31). Nosotros lo hemos utilizado en la obtención a partir de los extractos de pulpa, de fracciones que estén enriquecidas en algunos componentes minoritarios con el fin de que estos puedan ser identificados por cromatografía de papel.

Las características de estas columnas de celulosa son variables y dependen de las cantidades de extractos concentrados que se desean fraccionar. Se utilizan ordinariamente 20-30 g de celulosa por cada gramo de sólido o sirupo que se cromatografía. Dichas columnas de 1 a 3 cm de diámetro se rellenan con una suspensión de celulosa en el disolvente o mezcla de disolventes que se utilicen como eluyente.

Una vez empaquetada la columna se coloca en la parte superior ~~el sólido mezclado con la misma cantidad~~ de celulosa. Si se trata de un sirupo, este se disuelve en la mínima cantidad del líquido desarrollador e igualmente se coloca en la parte superior de la columna.

A continuación se pasa el eluyente que se haya seleccionado y se recoge el líquido eluido en tubos de 10 ó 25 ml colocados en un colector automático RadiRac Rotator tipo 3401 B.

El curso de la separación en columna, se sigue mediante cromatografía de los líquidos recogidos en los tubos y de acuerdo con los resultados obtenidos se agrupan estos tubos en una serie de fracciones, que después son sometidos a un estudio más detenido mediante cromatografía de papel.

La cromatografía de absorción sobre columnas de carbón se utiliza (32) preferentemente para la separación de oligosacáridos. Es muy útil porque permite el aislamiento cuantitativo de componentes menores y la separación de grandes cantidades de material. La efectividad de la separación no se afecta por la presencia de sales inorgánicas o por el grado de dilución de la solución del azúcar.

Nosotros hemos empleado la cromatografía sobre columnas de carbón para conseguir fracciones enriquecidas en oligosacáridos. El problema que encierra esta técnica es la lentitud cuando se emplea carbón en polvo. Cuando se emplea carbón de grano mayor, la velocidad de elución aumenta aunque puede disminuir la capacidad de separación.

Hemos utilizado mezclas de dos tipos de carbón de los siguientes tamaños: de 0,5-0,75 mm (20-35 mesh ASTM) especial para cromatografía de gases y de 1,5 mm de diámetro.

En cuanto a la forma de preparar estas columnas ha sido la siguiente: Se emplean columnas de 100cm x 6 cm.

El relleno de dichas columnas se realiza preparando una - suspensión de carbón en agua (25 g de carbón por cada 100 ml de agua) que se va introduciendo en la columna dejando salir el agua.

Una vez preparada la columna se lava con agua des- tilada y se coloca en la parte superior una disolución -- acuosa del sirupo, que se adsorbe por el carbón. A conti- nuación se eluye con agua y con mezclas de etanol-agua en distintas proporciones.

3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

A continuación se describe el proceso seguido con cada una de las muestras y los resultados obtenidos.

3.1. Muestra A.

Pulpa 450 g.

Se estabiliza y se extrae con etanol como se ha - indicado en el apartado II.2.2.

Los extractos se concentran hasta sirupo. Este se ~~trata con agua en caliente y se filtra.~~ El filtrado se -- desioniza como se indica en el apartado II.2.2. y se con- centra en rotavapor hasta sirupo. Este se cromatografía - en una columna que contiene celulosa (40 g) y mide 50 cm de largo y 14 mm de diámetro. Se emplea como desarrolla-- dor n-butanol saturado de agua y se recogen fracciones de 10 ml.

El curso de la separación en la columna se ha seguido por cromatografía en papel de las fracciones recogidas. Esto ha permitido agruparlas convenientemente y concentrarlas, obteniendo cinco fracciones principales que se analizan también por cromatografía en papel (Whatman nº 1 y 3), utilizando la técnica descendente con los desarrolladores a y d, y la técnica circular con los desarrolladores b, c, d y e. Los reveladores empleados han sido el nitrato de plata-NaOH y difenilamina-anilina y ácido fosfórico (b).

Fracción 1. Tubos 1-24.

Se identifica: Glucosa, fructosa y xilosa. Probables: ramnosa y ribosa.

Fracción 2. Tubos 25-69.

Se identifica: Glucosa.

Fracción 3. Tubos 70-110.

Se identifica: Glucosa, fructosa y sacarosa.

Fracción 4. Tubos 111-259.

Se identifica: Sacarosa.

~~Se detectan dos oligosacáridos:~~

- Mancha I:

Técnica descendente

Desarrollador a: R_G 0,22, R_G de la maltosa 0,22.

Desarrollador d: R_G 0,17, R_G de la lactosa 0,17.

Técnica circular

Desarrollador e: R_G 0,35, R_G de la maltosa 0,42

Aunque su R_G en el desarrollador a corresponde con la maltosa y en el d con la lactosa las coloraciones que se obtienen al revelar con difenilamina-anilina y ácido fosfórico (b) son diferentes a las que dan estas sustancias.

- Mancha II:

Técnica descendente

Desarrollador a: R_G 0,05

Desarrollador b: R_G 0,05

Fracción 5. Tubos 260-410.

Se detecta un oligosacárido.

Técnica descendente

Desarrollador a: R_G 0,24, R_G lactosa 0,22

Desarrollador d: R_G 0,15, R_G lactosa 0,15

3.2. Muestra B.

Pulpa 450 g.

~~Se opera como ya se ha indicado en el apartado anterior 3.1.,~~ obteniéndose un sirupo que se cromatografía sobre una columna de celulosa (60 g) empleando como eluyente n-butanol saturado de agua y recogiendo fracciones de 10 ml.

Analizadas estas por cromatografía en papel se -- agrupan convenientemente en seis fracciones principales, que se analizan por cromatografía de papel como se ha indicado en el mismo apartado.

Fracción 1. Tubos 1-35

Se identifica: fructosa y xilosa.

Probables: Ramnosa, ribosa y manitol.

Fracción 2. Tubos 36-70

Se identifican: Glucosa, fructosa y manitol.

Fracción 3. Tubos 80-140

Se identifican: glucosa y sacarosa.

Fracción 4. Tubos 141-199

Se identifican: Glucosa y fructosa.

Se detecta un oligosacárido que por sus R_G corresponde a la maltosa ó lactosa, pero su coloración con el revelador difenilamina-anilina y ácido fosfórico es diferente a la de estos dos disacáridos. Los datos de esta cromatografía son los siguientes:

Técnica descendente.

Desarrollador a: R_G 0,22, R_G maltosa 0,22

Desarrollador d: R_G 0,17, R_G lactosa 0,17

Otra parte de esta fracción se concentra a sequedad (aproximadamente 2 g) y se cromatografía sobre una columna de carbón.

Se han utilizado 40 g de una mezcla a partes iguales de carbón de 1,5 mm y de 0,5-0,75 mm y se ha preparado la columna siguiendo las directrices indicadas en el apartado 2.4.

A continuación se eluye con agua y con etanol-agua en diversas proporciones. Las fracciones obtenidas se analizan por cromatografía sobre papel empleando la técnica descendente, el desarrollador h y como reveladores nitrato de plata-NaOH y difenilamina-urea y ácido fosfórico.

Los resultados son los siguientes:

Fracción 4.1.

Volumen 100 ml. de agua. Evaporado a sequedad: Se obtienen 360 mg de sólido amarillento.

Se identifica: Glucosa, fructosa y manitol.

Fracción 4.2.

Volumen 1500 ml de agua. Evaporado a sequedad se ~~obtiene 1 g de un sólido blanco.~~

Se identifica: Manitol (componente principal) y glucosa.

Fracción 4.3.

Volumen 2500 ml de agua. Evaporado a sequedad se obtiene 150 mg.

Se identifica: manitol y glucosa (trazas).

Fracción 4.4.

Volumen 3500 ml de agua.

Se identifica el manitol.

Se detecta un oligosacárido de R_G 0,28 que reacciona con nitrato de plata y con difenilamina-urea da un color gris morado.

Fracción 4.5.

Volumen 5000 ml de etanol-agua al 2%.

Se identifica el manitol.

Se detectan dos oligosacáridos de R_G 0,21 y 0,26, que con difenilamina-urea dan color rosa-brillante y gris-morado respectivamente.

Fracción 4.6.

Volumen 4000 ml de etanol acuoso al 10%,

Se detectan dos oligosacáridos de R_G 0,18 y 0,37 - que con difenilamina-urea dan color rosa brillante y reacción positiva con nitrato de plata.

Fracción 4.7.

Volumen 2500 ml de etanol acuoso al 20%.

Se detecta un oligosacárido de R_G 0,38 que con difenilamina-urea da color rosa brillante y reacción positiva con nitrato de plata.

Fracción 5. Tubos 500-600

Se identifica galactosa.

Se detectan dos oligosacáridos, que en cromatografía descendente y en el desarrollador d sus R_G son: 0,18, 0,10 y 0,04.

Fracción 6. Tubos 601-720

En las mismas condiciones analíticas se detectan dos manchas cuyas R_G son 0,04 y 0,08.

3.3. Muestra C.

Fulpa 600 g.

El extracto se ha obtenido tratando la pulpa como se ha indicado en el apartado 3.1. obteniendo al evaporar el agua en la fase final un sólido blanco (5,5g). Este se cromatografía sobre celulosa (150 g) en una columna de -- 70 cm de largo y 29 mm de diámetro con butanol-acetona-agua (2:7:1) y recogiendo fracciones de 25 ml. El curso de la separación en columna se sigue mediante cromatografía de las fracciones en papel Whatman nº 1 y 3 MM, utilizando el mismo eluyente usado en la columna. El revelado se hace con nitrato de plata-NaOH. Teniendo en cuenta los resultados de estas cromatografías las fracciones recogidas se reúnen convenientemente y se concentran a pequeño volumen obteniendo diez fracciones principales que se analizan por cromatografía en papel.

Fracción 1. Tubos 1-16

Se identifica: Glucosa y xilosa.

Probable: Ribosa

Fracción 2. Tubos 17-33

Se identifica: Glucosa, xilosa y ramnosa.

Probable: Ribosa

Fracción 3. Tubos 34-43

Se identifica: Glucosa, xilosa y fructosa.

Fracción 4. Tubos 44-66

Se identifica: Glucosa y fructosa.

Fracción 5. Tubos 67-82

Se identifica: Glucosa, fructosa y manitol.

Fracción 6. Tubos 83-108

Al concentrar a sequedad se obtiene un producto -
sólido (710 mg)

Se identifica: Glucosa, fructosa y manitol.

Fracción 7. Tubos 109-114

Se obtiene un producto sólido (46 mg).

Se identifica: Glucosa y manitol.

Fracción 8. Tubos 115-129

Se obtiene un producto sólido (245 mg).

Se identifica: Glucosa y manitol.

Fracción 9. Tubos 130-159

Se obtiene un producto sólido (1940 mg).

Se identifica: Glucosa y manitol.

Fracción 10. Tubos 160-197

Se identifica: Sacarosa.

3.4. Muestra D.

Pulpa 52 g.

Se ha operado de manera análoga a la indicada en el apartado 3.3, obteniendo 292 fracciones de 10 ml que agrupadas convenientemente de acuerdo con los resultados de la cromatografía en papel y concentradas a pequeño volumen dan seis fracciones principales que se analizan como se ha hecho con las muestras anteriores.

Fracción 1. Tubos 1-41

Se identifica: Glucosa, fructosa y xilosa.

Probable: Ramnosa.

Fracción 2. Tubos 42-119

Se identifica: Glucosa y fructosa.

Fracción 3. Tubos 120-184

Se identifica: Sacarosa.

Fracción 4. Tubos 185-214

Se detecta un oligosacárido, que en cromatografía descendente, desarrollador d y revelador nitrato de plata de R_G 0,40. Revelado con difelinamina-urea de color rosa brillante. No se identifica con ninguno de los oligosacáridos de referencia: Sacarosa R_G 0,52 (gris morado), maltosa, 0,30 (rosa que pasa a amarillo) y lactosa, 0,20 (rosa que pasa a naranja).

Fracción 5. Tubos 215-266

Se detecta un oligosacárido de R_G 0,20 en el desarrollador d, cuyas características son similares al de la fracción anterior.

Fracción 6. Tubos 269-292

Se detecta un oligosacárido de R_G 0,17, que da color rosa brillante con difenilamina-urea y castaño claro con ftalato ácido de anilina.

3.5. Muestra E.

Pulpa 2800 g.

Se extrae la pulpa con 8 litros de agua calentando a 80-90° durante seis horas. Se filtra la pulpa residual y se concentra en rotavapor hasta sirupo espeso. Una parte -

de este sirupo (80 g en 400 ml) se cromatografía sobre columna de carbón con el fin de obtener dos fracciones: una en la que se encuentren los monosacáridos y otra que contenga los oligosacáridos. Primero se eluye con agua destilada hasta que no se detecta la presencia de monosacáridos y a continuación se eluye con mezclas de etanol agua al 5, 10, 15 y 20% y aunque se observan algunas diferencias en dichas fracciones se unen para una posterior separación e identificación.

Estudio de la fracción de los monosacáridos.- Para facilitar la identificación de los azúcares que se encuentran en pequeña proporción se cromatografía en columna de celulosa el sirupo (40 g) que se obtiene al concentrar el líquido acuoso eluido a través de la columna de carbón. Siguiendo el procedimiento descrito en los apartados anteriores se han identificado la glucosa, fructosa y xilosa, y se señala como probable la ramnosa y la ribosa.

Estudio de la fracción de oligosacáridos.- Las fracciones obtenidas por elución de las columnas de carbón con etanol-acuoso en distintas proporciones se unen y se concentran a presión reducida hasta sirupo, se disuelve dicho sirupo con agua destilada hasta que la disolución resultante sea aproximadamente del 10% y se coloca en la parte superior de una columna que contiene una mezcla de dos tipos de carbón (40 g de diámetro 1,5 mm y 25 g de otro tipo cuyo diámetro es de 0,5-0,75 mm).

La columna es eluida en primer lugar con agua destilada y a continuación con mezclas de etanol-agua del 2, 4, 5,5, 7 y 10%.

Las fracciones eluidas de la columna se cromatografían en papel (Whatman nº 3) siguiendo la técnica descendente y empleando los desarrolladores d y g y como reveladores: nitrato de plata, difenilamina-anilina y difenilamina-urea.

Los resultados son los siguientes:

Fracción 1.

Volumen 6 litros de agua.

Se concentra a pequeño volumen.

Se identifican por cromatografía en papel: glucosa, fructosa y pequeñas cantidades de sacarosa.

Fracción 2.

Se unen y concentran a pequeño volumen 2,5 litros de etanol-agua al 2% y 5 litros de etanol-agua al 5%.

Se identifica: sacarosa.

Se detecta un oligosacárido de R_G 0,16 con el desarrollador a, y R_G 0,22 con el desarrollador d. Da color rosa brillante con difenilamina-urea.

Fracción 3.

Se unen y concentran a pequeño volumen 5 litros de etanol-agua al 5,5% y 5 litros de etanol-agua al 7%.

Se detectan dos oligosacáridos de R_G 0,46 y 0,15 con el desarrollador a y R_G 0,69 y 0,38 con el desarrollador g. Dan colores verde y verde-azul con el revelador difenilamina-anilina y rosa brillante con difenilamina-urea.

Fracción 4.

Se concentran a pequeño volumen 2,5 litros de etanol-agua al 10%.

Se detectan dos oligosacáridos de R_G 0,68 y 0,36 con el desarrollador g, que dan color rosa brillante con difenilamina-urea.

4. RESULTADOS

Se han identificado en extractos de pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla": glucosa, fructosa, manitol y sacarosa que se encuentran en cantidades apreciables. Como componentes menores: ~~xilosa y damo~~ como probable la existencia de ramnosa.

Se han detectado varios oligosacáridos que por sus movilidades cromatográficas los consideramos disacáridos y tri ó tetrasacáridos.

III. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES DE
LA FULPA.

METODOS VOLUMETRICOS Y COLORIMETRICOS

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Las determinaciones analíticas cuantitativas de azúcares en extractos de pulpa de aceitunas se realizan ordinariamente de forma global y no específica.

Rodríguez de la Borbolla, Fernández Diez y col. (12) determinan los azúcares reductores y totales en extractos de pulpa de las variedades gordal y zorzaleña. Utilizan el método de Lane-Eynon en muestras defecadas con acetato neutro de plomo. Estos autores observan que los azúcares reductores disminuyen progresivamente con el desarrollo y madurez del fruto pasando desde un valor máximo a mediados de julio de 7,8% de pulpa fresca en la variedad gordal y 8,2% en la variedad zorzaleña a otro mínimo a finales de noviembre de 3,1% en la variedad gordal y 3,4% en la variedad zorzaleña.

Los azúcares totales también disminuyen progresivamente pasando de un máximo a mediados de julio de 8,0% en la variedad gordal y 8,1% en la variedad zorzaleña a un 3,2% y 3,5% a finales de noviembre.

Estos autores (12) observan que también disminuyen progresivamente los azúcares reductores y azúcares totales expresados en % de pulpa seca.

Sandret (9) hace un estudio analítico cuantitativo de tres variedades que se cultivan en Marruecos: picholine marroqui o Zitoum, hojiblanca y gordal. Emplea el método de Bertrand en las determinaciones de azúcares reductores.

y totales. Los extractos de la pulpa los defeca con acetato de plomo y los trata posteriormente con resinas de cambio iónico, Amberlita IR-120 y IR-4B.

Petruccioli (10) determina los azúcares reductores y totales en extractos de pulpa de las siguientes variedades italianas: "canino", "carboncella", "frantoio", "leccino", "maurino", "moraiolo" y "morchiaio"; utilizando el método de Bertrand.

Donaire y col. (33,34) determinan en aceitunas de la variedad marteña los azúcares reductores y los azúcares totales, utilizando los métodos colorimétricos de Jolin-Malmros (35) y de Mokraah (36) de la antrona.

Los resultados de Sandret, Petruccioli y Donaire coinciden con los de Rodríguez de la Borbolla y col. en cuanto a la disminución progresiva de los azúcares reductores en % de pulpa seca desde agosto a noviembre.

Para Donaire y para Sandret los azúcares solubles totales en algunas variedades, expresados en gramos por 100 frutos, aumentan progresivamente de agosto a noviembre ó septiembre, para después disminuir a los valores bajos de partida.

Según Donaire y col. (34) la relación de azúcares reductores a azúcares totales tiende a disminuir a valores bajos entre octubre y noviembre. Estos resultados están en contradicción con los de Sandret y Petruccioli que

dan para esta relación los valores de 0,7 a 0,9, admitiendo que dicha relación puede tender a 1 por desaparición de la sacarosa en frutos muy maduros.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Aceitunas

Se han utilizado aceitunas de las variedades "manzanilla" y "gordal" recogidas en olivares de la Provincia de Sevilla.

Muestras de manzanilla:

Muestra F (20-9-1977)

Muestra G (18-11-1977)

Muestra H (10-8-1978)

Muestra de "gordal":

Muestra I (20-9-1977)

2.2. Extracción de mono y oligosacáridos

Se ha realizado de manera similar a como ya se ha indicado en el apartado II.2.2.

2.3. Tratamiento de purificación previo a las determinaciones cuantitativas

Los extractos etanólicos procedentes de 100 g de pulpa fresca se evaporan en el rotavapor para eliminar el etanol. El residuo se trata con 250 ml de agua destilada y a la suspensión que resulta se adiciona un poco de celi

ta y se filtra. Lo que queda en el filtro se lava con agua destilada (50-100 ml) y el líquido de lavado se une al primer filtrado.

El extracto acuoso se purifica por defecación y paso por resinas de intercambio iónico.

2.3.1. Defecación (12,16)

A la disolución acuosa de la muestra se le añade una disolución saturada de acetato neutro de plomo (2 ml). Se comprueba con una gota de oxalato potásico en agua si hay exceso de ión plomo. Si la reacción es negativa la operación se repite hasta que haya exceso de acetato de plomo.

El precipitado obtenido se filtra en un embudo normal a través de papel Whatman nº 1 y se lava con agua destilada (50 ml). A los filtrados reunidos se le añade oxalato potásico (0,6 g) y se comprueba el exceso de oxalato con una gota de disolución saturada de acetato de plomo.

La disolución se deja tapada en el frigorífico durante unas 15 horas. Pasado este tiempo se filtra a través de un embudo normal con papel Whatman nº 1, se lava con agua destilada (50 ml) y se pasa a un matraz aforado de 500 ml, llevándola a este volumen con agua destilada.

La mitad de esta disolución, que corresponde a 50 g de pulpa fresca, se somete a otro tratamiento de purificación mediante resinas de intercambio iónico, como se detalla en el apartado siguiente. De ambas mitades se toman --

fracciones alícuotas que se emplean en las distintas de-- terminaciones analíticas.

2.3.2. Tratamiento con resinas de intercambio iónico (37)

La disolución defecada (250 ml) se pasa a través de una columna de Amberlita IR-120 H⁺ (15,38,39) (70 ml de resina húmeda). A continuación la resina se lava con agua destilada empleándose un volumen 15 veces el del lecho. Posteriormente se pasan los filtrados por una columna de Amberlita IR-45 OH⁻ (40) (90 ml de resina húmeda) lavándose la resina aniónica con un volumen 15 veces el del lecho. Los líquidos reunidos se concentran en rotavapor y la disolución que resulta se lleva a un matraz aforado de 250 ml, completando el volumen con agua destilada. De esta solución se toman las fracciones alícuotas que se utilizan en las determinaciones analíticas.

2.4. Determinación de azúcares reductores

2.4.1. Método de Lane-Eynon (41,42)

Se utiliza el método de Lane-Eynon que es una modificación del método de Fehling (43,44). Ambos se basan en que los azúcares que tienen un grupo aldehído ó cetona en su molécula reducen en solución alcalina las sales de cobre.



Esta reacción del complejo de cobre no se realiza estequiométricamente debido a los profundos cambios en la molécula del azúcar causados por el medio fuertemente alcalino. No obstante, las condiciones de la reacción en este método pueden adaptarse de modo que los resultados sean reproducibles y que las cantidades de óxido cuproso sean proporcionales a la concentración del azúcar dentro de un cierto margen.

a) Reactivos

Solución A.- Se disuelve sulfato de cobre (69,28 g) en agua destilada caliente (400-600 ml). La solución fría se pasa a un matraz aforado, completándose el volumen hasta 1000 ml.

Solución B.- Se disuelve tartrato sódico potásico (346 g) en agua destilada (300 ml). Se prepara otra disolución de hidróxido sódico (100 g) en agua (300 ml) y se hierve durante 5 minutos. A continuación se añade el tartrato a la sosa, se enfría la mezcla y se pasa a un matraz aforado de 1000 ml, enrasando con agua destilada.

Solución C.- Se disuelve glucosa anhidra purísima (4 g) en un matraz aforado de 1000 ml con agua destilada. Se le añade a la solución 1 ml de tolueno y puede conservarse, perfectamente tapada, durante una ó dos semanas sin que sufra alteración.

Indicador.- Se prepara una solución acuosa al 1% de azul de metileno.

b) Valoración del reactivo de Fehling

Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones A y B (reactivo de Fehling) y se toman con una pipeta 6 ml de la mezcla que se llevan a un matraz aforado, diluyendo con agua destilada hasta 100 ml. La disolución que resulta se pasa a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Desde una bureta, que contiene la solución C con la que se va a valorar el reactivo de Fehling, se le añaden 6 ml y se calienta a ebullición durante dos minutos. Se forma un precipitado rojo intenso y el líquido que sobrenada toma color azul. Sin que el líquido deje de hervir se continúa la valoración añadiendo glucosa hasta que el color azul sea casi imperceptible; se agregan entonces 2 a 5 gotas de solución de azul de metileno al 1% y se continúa la valoración hasta que el color azul pase a morado débil y por fin desaparece.

Se repite la valoración añadiendo 0,5 ml menos -- que la cantidad que se ha necesitado la primera vez y se ajusta el punto final. Se realizan sucesivas valoraciones hasta que dos de ellas estén dentro de una diferencia de 0,1 ml. El tiempo total de ebullición debe ser de unos 3 minutos y durante la valoración no debe agitarse el matraz.

Llamando P al peso de glucosa disuelta en 1 litro, C al número de ml gastados en la valoración y F al factor del reactivo Fehling ó cantidad en gramos de glucosa para 6 ml del reactivo se tiene:

$$F = \frac{P \cdot C}{1000}$$

Se ha encontrado que el volumen C empleado en la valoración de 4 g de glucosa por litro ha sido de 8,5 ml, por tanto el factor F es 0,034.

$$F = \frac{4 \cdot 8,5}{1000} = 0,034$$

e) Valoración de la solución de azúcares

Se toman 6 ml de la disolución de Fehling, que se diluye a 100 ml, se le añaden desde una bureta 5 ml de la solución de azúcares, se hierve durante dos minutos y se continúa añadiendo solución hasta que el color azul se haga casi imperceptible, se adiciona entonces de 2 a 5 gotas del indicador y se continúa la valoración hasta la completa desaparición del color azul.

Se repite la valoración como en el caso anterior, hasta que dos determinaciones no se diferencian en más de 0,1 ml.

Siendo F el factor del reactivo, C los ml de solución problema y c la concentración de dicha solución en gramos de glucosa por 100 ml, tenemos que:

$$c = \frac{F \cdot 100}{C}$$

2.4.2. Método de las sales de tetrazolio

El método se basa en que los azúcares reducen en

medio alcalino a las sales de tetrazolio incoloras a formazanos coloreados y solubles en disolventes orgánicos.

Se ha seguido con algunas modificaciones el procedimiento de Fairbridge y col. (45) que utiliza el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

a) Procedimiento

A 2 ml de una disolución de glucosa (160-360 μ g) - se le añade 1 ml de una disolución acuosa no coloreada al 0,3% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio y 1 ml de una disolución acuosa de hidróxido sódico 2 N. La mezcla se calienta 3 minutos en baño de agua hirviendo, se enfría inmediatamente sumergiéndola en agua fría y se acidifica con 1 ml de ácido acético 2,1 N. Se lleva con etanol absoluto hasta 50 ml, se agita y se hacen las medidas frente al blanco a 485 nm.

b) Curva de calibrado

Para conocer la concentración de glucosa de cada una de las muestras analizadas por este método, partiendo del dato de absorbancia obtenido experimentalmente, es necesario conocer previamente la absorbancia de distintas cantidades conocidas de glucosa que se someten al mismo proceso que a las muestras, es decir es necesario construir una curva de calibrado.

Para la construcción de esta curva de calibrado se preparan 9 disoluciones de referencia que contienen --

cantidades de glucosa que van desde 168 a 360 μ g por cada 2 ml de disolución. Se toman 2 ml de cada una de estas disoluciones y se someten al procedimiento descrito anteriormente midiendo las absorbancias frente al blanco a 485 nm. Las cantidades de glucosa que contienen las 9 disoluciones así como las absorbancias que resultan se exponen en la tabla V .

La línea de calibrado se obtiene poniendo en abscisas los microgramos de glucosa que hay en 2 ml y en ordenadas los correspondientes valores medidos en absorbancia.

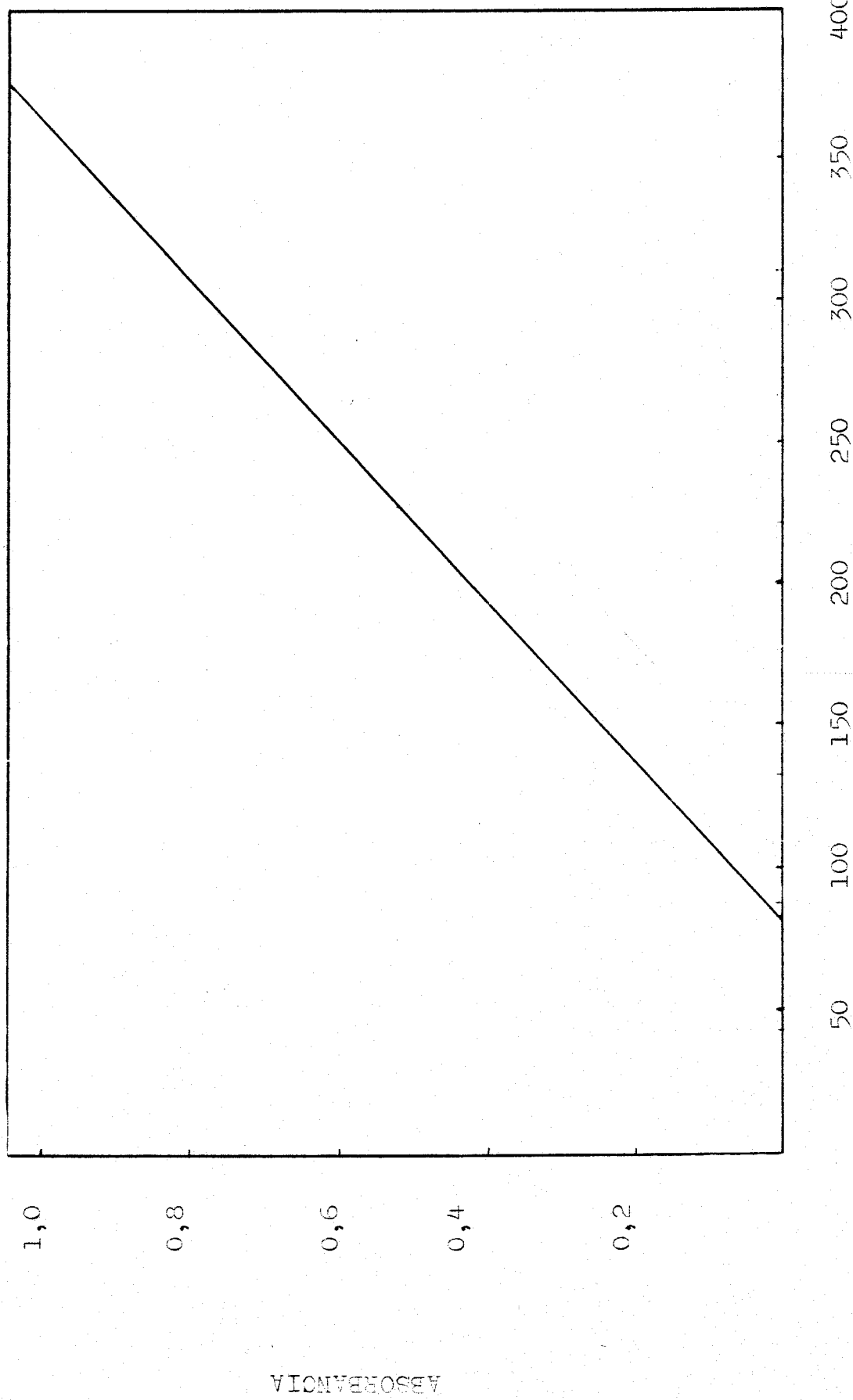
Como blanco se emplea el obtenido al someter 2 ml de agua destilada al mismo proceso que cada una de las disoluciones referencia.

Para que las absorbancias obtenidas con las distintas muestras se puedan comparar, con el mínimo error, con las absorbancias obtenidas para las disoluciones de referencia, se hace una curva de calibrado cada vez que se hace el análisis de una muestra. Así, tanto las muestras como las referencias están sometidas a las mismas condiciones experimentales. Si se analizan juntas más de una muestra, se hace solo una curva de calibrado al mismo tiempo que las muestras se someten al proceso analítico.

Tabla V

<u>Disoluciones de referencia.</u>	<u>Cantidad de glu- cosa en 2 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	168	0,315
nº 2	192	0,390
nº 3	216	0,475
nº 4	240	0,550
nº 5	264	0,660
nº 6	288	0,735
nº 7	312	0,790
nº 8	336	0,905
nº 9	360	1,000

Con los valores de la tabla V se construye la cur
va de calibrado de la figura 1.



Microgramos de glucosa en 2 ml

Figura 1

2.5. Determinación de azúcares totales

2.5.1. Método de Lane-Eynon (41,42)

En la determinación de azúcares totales se utiliza el método volumétrico de Lane-Eynon realizando previamente una hidrólisis de los disacáricos presentes, en este caso sacarosa con ácido clorhídrico 1,2 N, Para ello se opera de la forma siguiente: a la disolución de la muestra (250 ml) se le añade ácido clorhídrico concentrado (10 ml) y se deja la disolución toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se neutraliza la disolución con hidróxido sódico al 30%; procediéndose a continuación a la determinación de los azúcares totales por el método ya descrito en el apartado 2.4.1.

2.5.2. Método del fenol-ácido sulfúrico

El método se basa en que los azúcares simples y oligosacáridos con un grupo reductor libre o potencialmente libre dan un color anaranjado-amarillo cuando se tratan con fenol y ácido sulfúrico concentrado.

~~Se utiliza el procedimiento de Smith y col. (46, 47).~~

a) Reactivos

- Disolución de fenol al 5%: se disuelve fenol (50 g) en agua y se diluye hasta 1000 ml.

- Acido sulfúrico, grado reactivo del 96-97%.

b) Procedimiento

A 1 ml de la disolución acuosa de glucosa (4-40 μ g) se le añade 1 ml de la disolución de fenol al 5% y se mezclan. El blanco se prepara con 1 ml de agua destilada.

Con una pipeta se le añaden 5 ml de ácido sulfúrico de forma que golpee en la superficie del líquido agitando durante la adición del ácido. Después de 10 minutos el tubo en que se efectúa la reacción se vuelve a agitar y se coloca en un baño de agua a 30° durante 20 minutos. Una hora después de su preparación se mide la absorbancia de la disolución frente al blanco a 490 nm.

c) Curvas de calibrado

Como se han analizado extractos de pulpa en dos momentos diferentes (septiembre de 1977 y agosto de 1978) en cada una de estas fechas se construye una curva de calibrado con disoluciones de glucosa, que se preparan y se someten al procedimiento descrito en este apartado al mismo tiempo que los correspondientes extractos de pulpa.

~~Curva de calibrado nº 1.- Se construye una curva de calibrado en septiembre de 1977 que se emplea en la determinación cuantitativa de las muestras F e I. Para ello se preparan 10 disoluciones de glucosa (4-40 μ g) que se someten al procedimiento indicado en este apartado midiéndose las absorbancias frente al blanco a 490 nm. Las cantidades de glucosa de las disoluciones de referencia, así~~

como los valores de las absorbancias que resultan, se exponen en la tabla VI. Con dichos valores se construye la curva de calibrado nº 1 (figura 2).

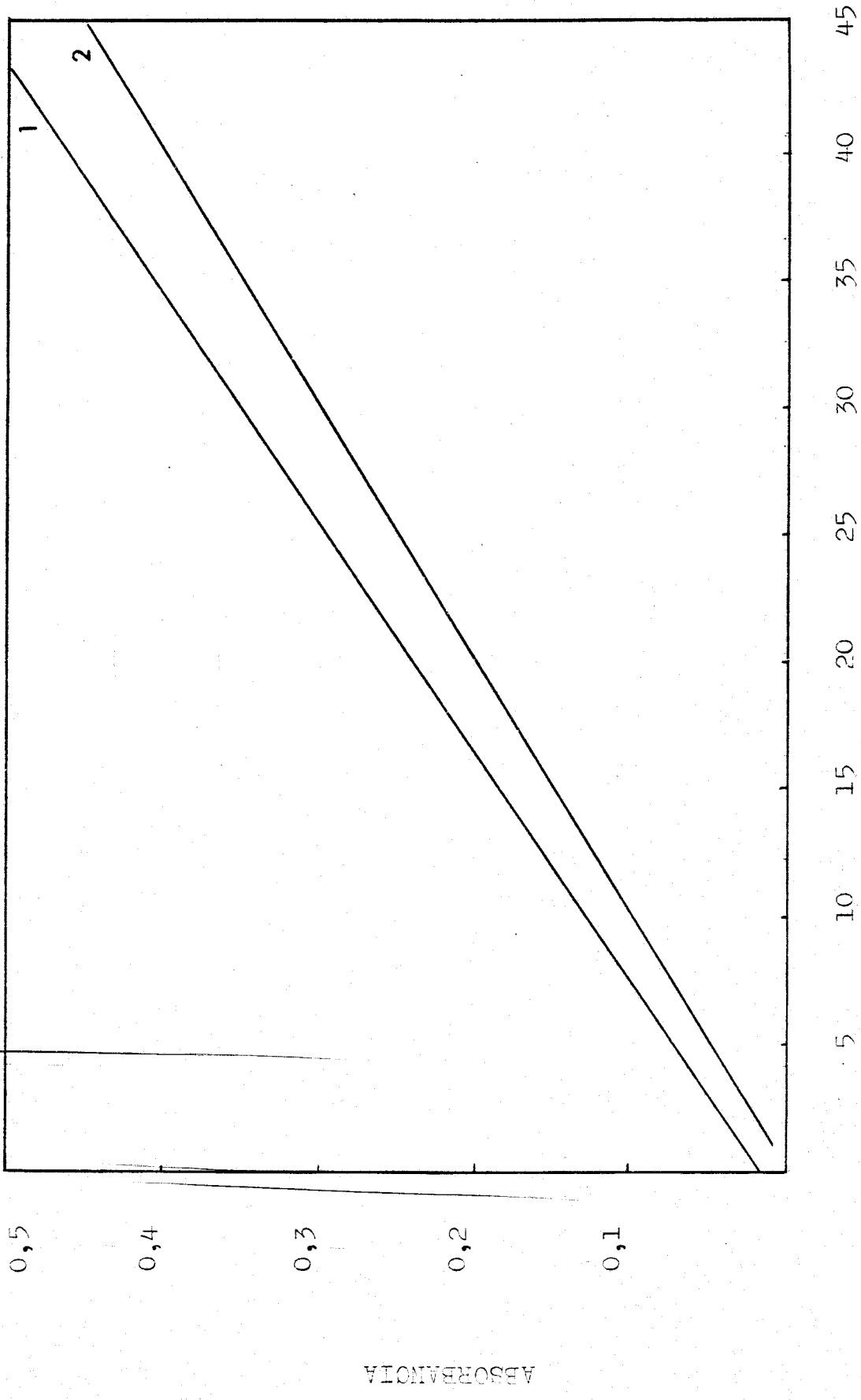
Curva de calibrado nº 2.- Se construye otra curva de calibrado en agosto de 1978 que se emplea en el análisis cuantitativo de la muestra H. Se preparan 8 disoluciones de glucosa (8-36 μg), se someten al procedimiento descrito en este apartado y se miden las absorbancias frente al blanco a 490 nm. Las cantidades de glucosa de las disoluciones de referencia, así como los valores de absorbancias que resultan se exponen en la tabla VII. Con dichos valores se construye la curva de calibrado nº 2 (figura 2).

Tabla VI

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glucosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	4	0,075
nº 2	8	0,095
nº 3	12	0,130
nº 4	16	0,225
nº 5	20	0,235
nº 6	24	0,285
nº 7	28	0,340
nº 8	32	0,355
nº 9	36	0,415
nº 10	40	0,475

Tabla VII

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glu- cosa en 1 ml, en microgramos</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	8	0,090
nº 2	12	0,105
nº 3	16	0,160
nº 4	20	0,195
nº 5	24	0,245
nº 6	28	0,295
nº 7	32	0,310
nº 8	36	0,360



Microgramos de glucosa en 1 ml

Figura 2.

2.5.3. Método de la antrona

Se sigue el método de Roe (48)

a) Preparación del reactivo

333 ml de ácido sulfúrico concentrado (del 96-97%) se añaden lentamente sobre 140 ml de agua destilada, cuidando que no suba la temperatura por encima de 110°. Se disuelve tiourea (5 g) en esta disolución. Se enfría por debajo de 90°, se le adiciona antrona (0,25 g) y se almacena en un frigorífico a 4°.

b) Procedimiento

A 1 ml de disolución acuosa de glucosa (18-180 μ g) se le añaden 10 ml del reactivo antrona. El tubo en que se realiza la reacción se tapa, se agita y se calienta en agua a ebullición (95°) durante 15 minutos. Después se enfría rápidamente en agua fría.

De la misma forma se opera con el blanco (1 ml de agua destilada) y con las muestras.

Después del enfriamiento se hacen las medidas a - 620 nm.

~~c) Curvas de calibrado~~

Se analizan extractos de pulpa en dos momentos diferentes (noviembre de 1977 y agosto de 1978) y en cada una de estas fechas se construye la correspondiente curva de calibrado.

Curva de calibrado nº 1. Se construye una curva de calibrado en noviembre de 1977 que se emplea en la determinación de la muestra G.

Se preparan 8 disoluciones de glucosa (18-144 µg), se someten al procedimiento descrito en este apartado y se miden las absorbancias frente al blanco a 620 nm.

Las cantidades de glucosa contenidas en las disoluciones de referencia y los valores de absorbancia que resultan se exponen en la tabla VIII.

Tabla VIII

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glucosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	18	0,045
nº 2	36	0,100
nº 3	54	0,130
nº 4	72	0,205
nº 5	90	0,255
nº 6	108	0,330
nº 7	126	0,310
nº 8	144	0,410

Con los valores de la tabla anterior se construye la curva de calibrado nº 1 (Figura 3).

Curva de calibrado nº 2.- Se construye otra curva de calibrado en agosto de 1978 que se emplea en el análisis cuantitativo de la muestra H.

Se preparan 10 disoluciones de glucosa (18-180 μg), se sigue el procedimiento descrito midiendo las absorbancias frente al blanco a 620 nm.

Las cantidades de glucosa de las disoluciones de referencia, así como los valores de las absorbancias que resultan, se exponen en la tabla IX.

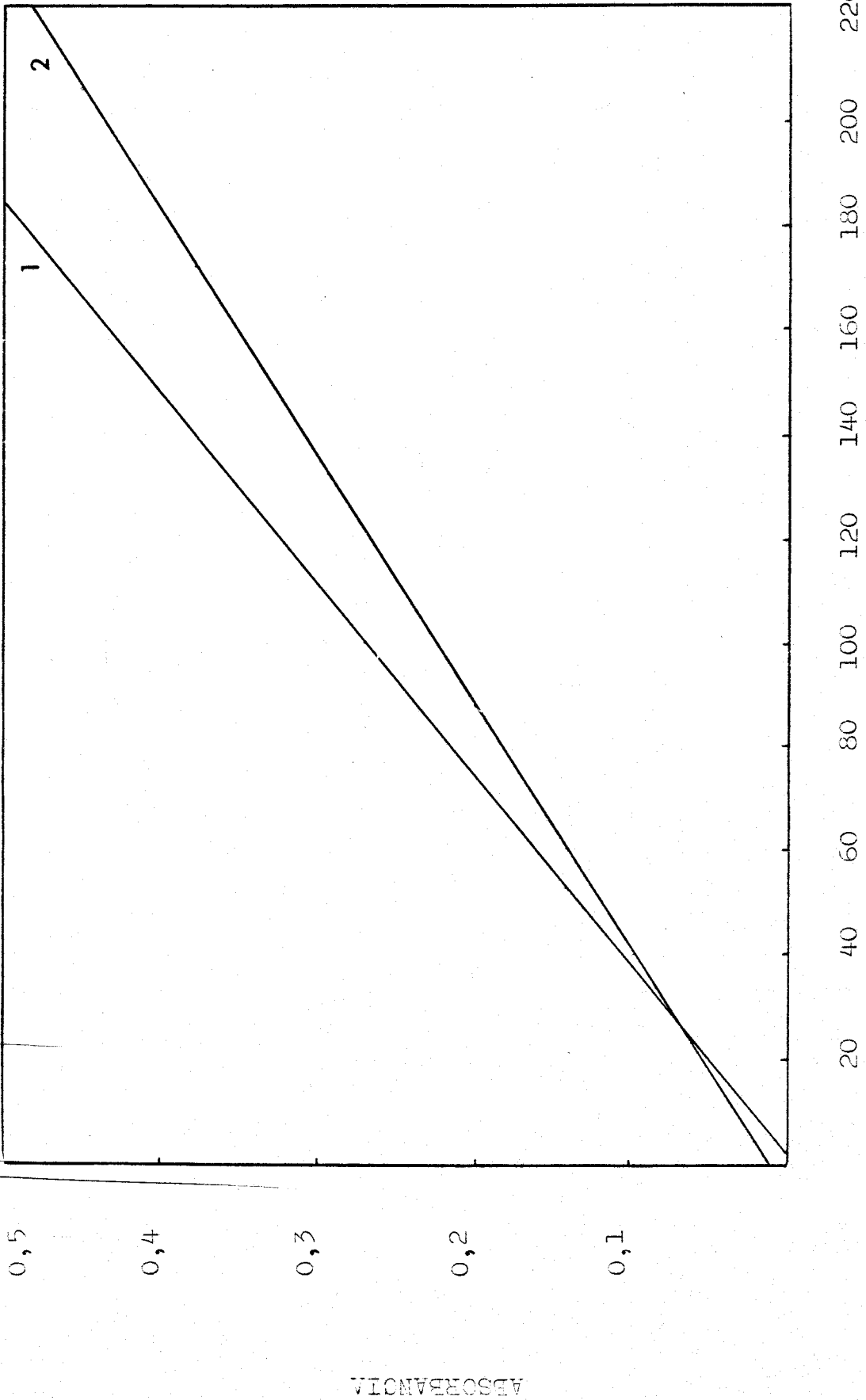
Tabla IX

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glucosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	18	0,045
nº 2	36	0,110
nº 3	54	0,110
nº 4	72	0,175
nº 5	90	0,205
nº 6	108	0,270
nº 7	126	0,280
nº 8	144	0,310
nº 9	162	0,370
nº 10	180	0,410

Con los valores de la tabla anterior se construye la curva de calibrado nº 2 (figura nº 3)

2.6. Determinación de fructosa

En la determinación de fructosa en extractos de -



Microgramos de glucosa en 1 ml.

Figura 3.

pulpa de aceitunas se emplea el método de la cisteina-ácido sulfúrico de Dische y Davi (49) específico de este azúcar, pues la glucosa solo interfiere cuando está presente en cantidades 100 veces mayor que la de fructosa.

El resultado en estas determinaciones corresponde a la fructosa total existente en dichos extractos, pues la sacarosa se hidroliza por la acción de los reactivos empleados en este método liberando fructosa. No obstante, al estar la sacarosa en estos extractos en pequeña cantidad, los resultados de estas determinaciones pueden ser referidos a la fructosa libre cometiendo ligeros errores por exceso y que pueden además ser corregidos si se conocen las cantidades de sacarosa en cada uno de dichos extractos.

a) Procedimiento

A 0,4 ml de una disolución de fructosa (44,8-224 μ g), se le añaden 0,1 ml de una disolución acuosa de clorhidrato de L-cisteina al 20% y 5 ml de una disolución de ácido sulfúrico del 75%. La mezcla se agita vigorosamente y se deja 4 horas a temperatura ambiente.

El mismo procedimiento se aplica tanto al blanco (0,4 ml de agua destilada), como a las distintas muestras. Las absorbancias se miden a 420 nm.

b) Curvas de calibrado

Se determinan cuantitativamente por el método de

la cisteina-ácido sulfúrico extractos de pulpa en tres momentos diferentes (septiembre 1977, noviembre 1977 y agosto 1978) y en cada una de estas fechas se construye una curva de calibrado.

A las disoluciones de referencia se les aplica el método descrito en este apartado. Las disoluciones coloreadas que resultan no pueden medirse directamente, sino que es necesario diluirlas previamente para que sus absorbancias estén dentro del intervalo adecuado. Como se ha indicado antes se han hecho tres determinaciones y teniendo en cuenta la experiencia, la dilución ha sido diferente en cada una de ellas.

Curva de calibrado nº 1.- Se construye dicha curva de calibrado en septiembre de 1977 y se utiliza en la determinación cuantitativa de las muestras F e I.

Se preparan 9 disoluciones de fructosa (44,8-224 μ g) y se someten al procedimiento descrito en este apartado.

Las disoluciones coloreadas que resultan se diluyen de la siguiente forma: se toma 1 ml de cada una de ellas y se le añaden 3 ml de ácido sulfúrico del 75% agitando a continuación.

De la misma forma se procede con el blanco y con los extractos de pulpa correspondientes.

Las cantidades de fructosa contenidas en las disoluciones de referencia y los valores de absorbancias que resultan se exponen en la tabla X.

Tabla X

<u>Disoluciones de referencia.</u>	<u>Cantidad de fructosa en 0,4 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	44,8	0,170
nº 2	67,2	0,315
nº 3	89,6	0,435
nº 4	112,0	0,580
nº 5	134,4	0,680
nº 6	156,8	0,805
nº 7	179,2	1,080
nº 8	201,6	1,190
nº 9	224,0	1,480

Con estos valores se construye la curva de calibrado nº 1 (figura 4).

Curva de calibrado nº 2.- Se construye otra curva de calibrado en noviembre de 1977 que se emplea en el análisis cuantitativo de la muestra G.

Se preparan 9 disoluciones de fructosa (44,8-224µg) y se sigue el procedimiento descrito en este apartado.

Las disoluciones coloreadas que resultan se diluyen de la siguiente forma: se toma 1 ml de cada una de ellas y se le añaden 4 ml de ácido sulfúrico del 75%. Se agitan y se miden las absorbancias frente al blanco a 420 nm.

De la misma forma se procede con el blanco y con los extractos de pulpa de la muestra G.

Las cantidades de fructosa de las disoluciones de referencia, así como los valores de las absorbancias que resultan se expresan en la tabla XI.

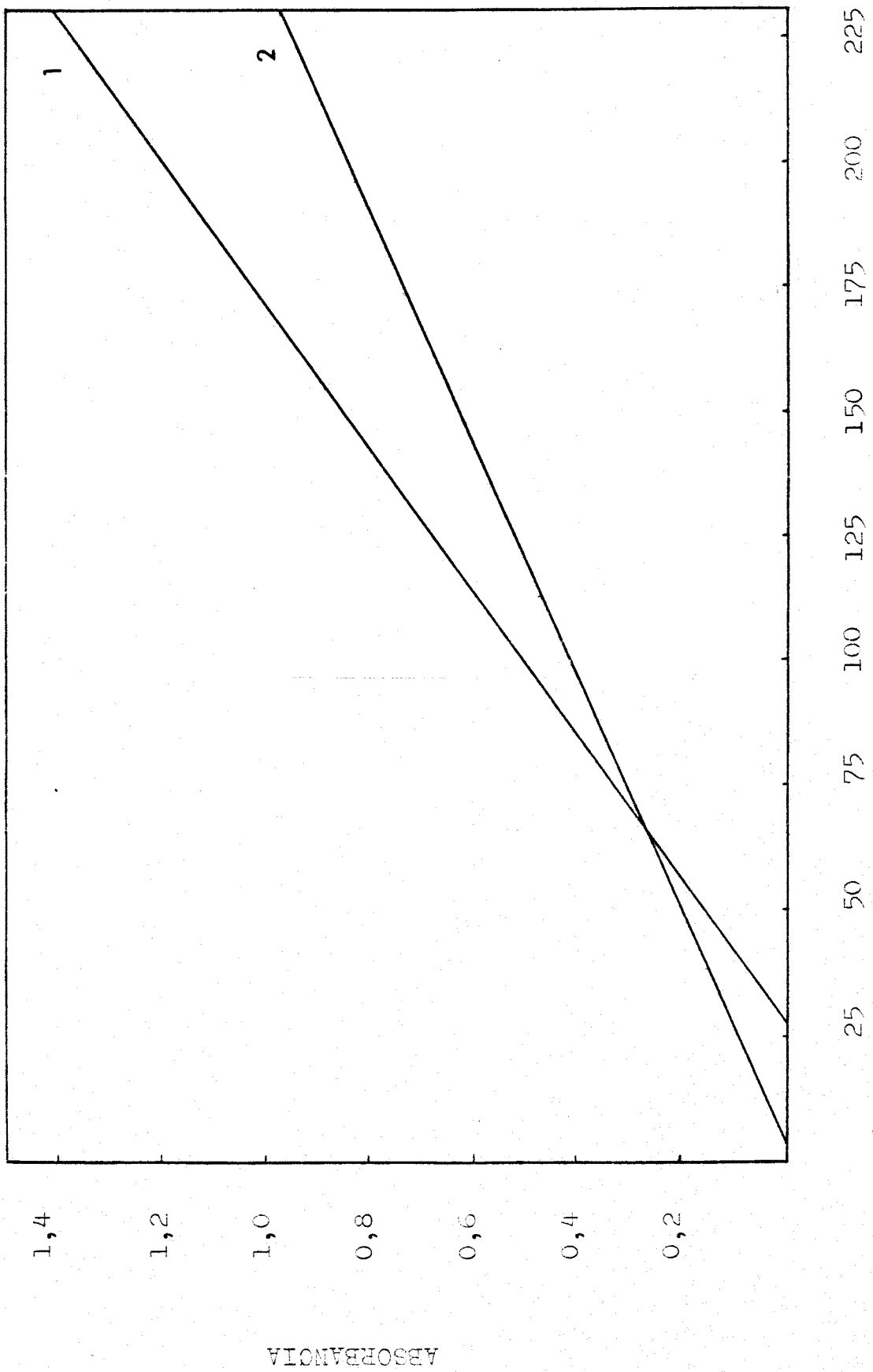
Tabla XI

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de fructosa en 0,4 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	44,8	0,190
nº 2	67,2	0,275
nº 3	89,6	0,365
nº 4	112,0	0,490
nº 5	134,4	0,570
nº 6	156,8	0,675
nº 7	179,2	0,745
nº 8	201,6	0,845
nº 9	224,0	0,970

Con estos valores se construye la curva de calibrado nº 2 (figura 4).

Curva de calibrado nº 3.- Se construye esta curva de calibrado en agosto de 1978 y se emplea en la determinación cuantitativa de la muestra H.

Se preparan 10 disoluciones de fructosa (41,6-228,8 µg) y se someten al procedimiento que ha sido descrito en este apartado.



Microgramos de fructosa en 0,4 ml

Figura 4.

Las disoluciones coloreadas que resultan se diluyen de la siguiente forma: se toma 1 ml de cada una de estas disoluciones y se le añaden 6 ml de ácido sulfúrico - del 75%. Se agitan los tubos que las contienen y se miden las absorbancias frente al blanco a 420 nm.

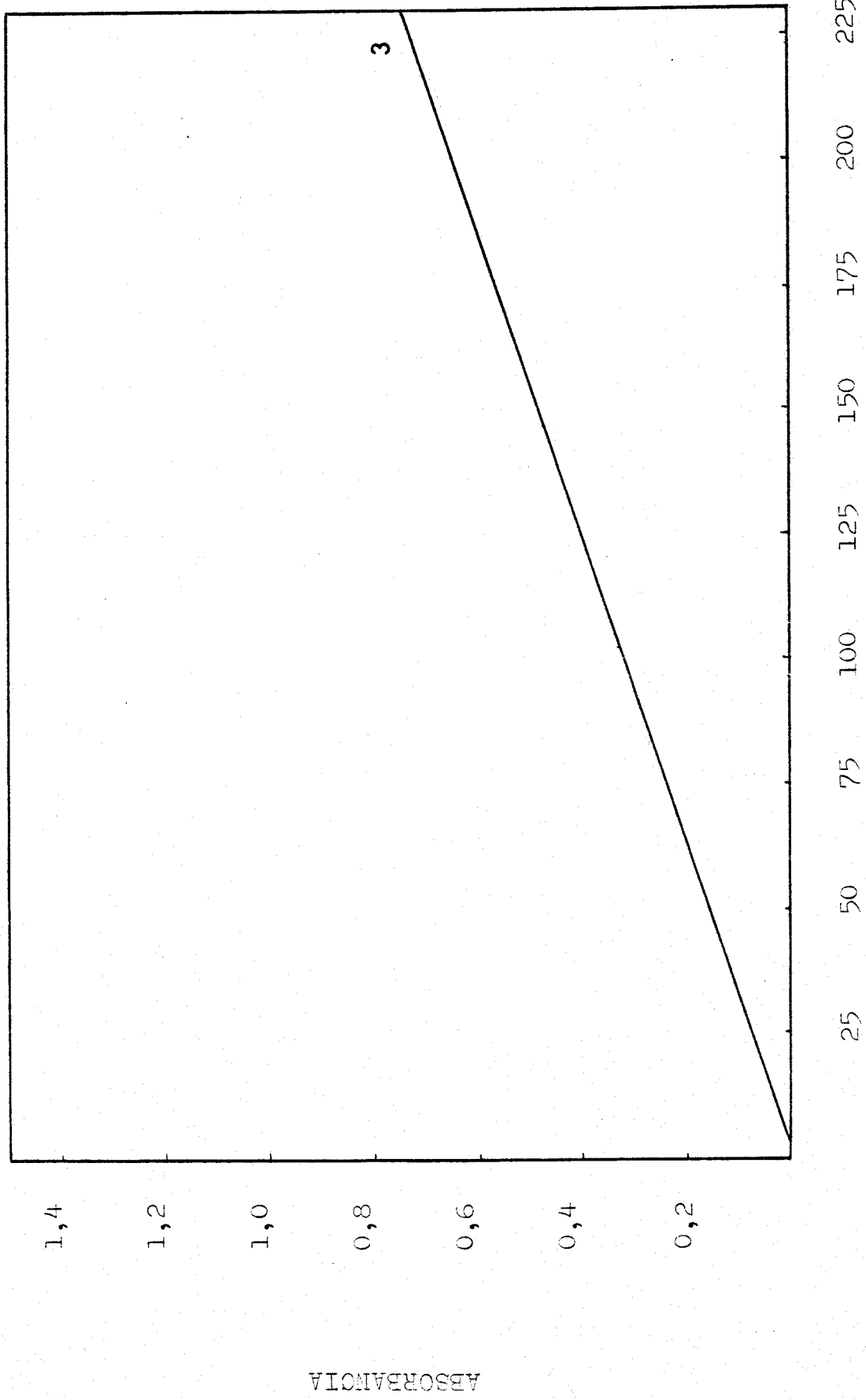
De la misma forma se procede con el blanco y con los extractos de pulpa de la muestra H.

Las cantidades de fructosa de las disoluciones de referencia y los valores de absorbancias que resultan se exponen en la tabla XII.

Tabla XII

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de fructosa en 0,4 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	41,6	0,130
nº 2	62,4	0,195
nº 3	83,2	0,270
nº 4	104,0	0,345
nº 5	124,8	0,380
nº 6	145,6	0,470
nº 7	166,4	0,500
nº 8	187,2	0,600
nº 9	208,0	0,640
nº 10	228,8	0,790

Con los datos expuestos en la tabla anterior se construye la curva de calibrado 2.3 (figura 5).



Microgramos de fructosa en 0,4 ml

Figura 5.

3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

A continuación se describe el proceso seguido con cada una de las muestras y se detallan los resultados obtenidos.

3.1. Muestra F.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 20-9-1977.

Su estabilización y extracción se ha realizado como se indica en el apartado II.2.2.

Los extractos etanólicos procedentes de 100 g de pulpa fresca se evaporan en el rotavapor para eliminar el etanol. El residuo se trata con agua, como se indica en el apartado III.2.3., con el fin de pasar a solución acuosa los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

La mitad de la disolución acuosa se ha purificado por defecación y la otra mitad por paso a través de resinas de intercambio iónico y defecación. En ambos casos se sigue el procedimiento indicado en los apartados III.2.3.1. y III.2.3.2.

Las disoluciones resultantes, 250 ml de cada una, constituyen las muestras que denominamos F-1 y F-2, y corresponden cada una a los extractos de 50 g de pulpa fresca.

En las muestras F-1 y F-2 se determinan los azúcares reductores y totales por el método de Lane-Eynon, siguiendo el procedimiento descrito en los apartados III.2.4.1. y III.2.5.1.

Los resultados han sido:

Muestra	Azúcares reductores % (glucosa)	Azúcares totales % (glucosa)
F-1	3,7	3,9
F-2	3,8	3,8

En la muestra F-1, convenientemente diluída, se han determinado también los azúcares reductores por el procedimiento del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio descrito en el apartado III.2.4.2.

El resultado ha sido el siguiente:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por 2 ml de <u>di</u> solución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 2 ml.	Azúcares reductores % (glucosa)
F-1	4544	0,550	237	5,2

En la muestra F-1, se han determinado los azúcares totales por el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico descrito en el apartado III.2.5.2., utilizando la curva de calibrado nº 1 (figura 2).

El resultado ha sido el siguiente:

Muestra	Microgramos de pulpa por cada ml de disolución	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales % (glucos
F-1	454	0,235	19	4,2

En las muestras F-1 y F-2 se ha determinado el contenido en fructosa por el método de la cisteina-ácido sulfúrico de Dische y Davi descrito en el apartado III.2.6., utilizando la curva de calibrado nº 1 (figura 4).

Los resultados han sido los siguientes:

Muestra	Microgramos de pulpa por cada 0,4 ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de fructosa en 0,4 ml	Fructosa %
F-1	9088	0,500	99	1,1
F-2	12800	0,880	153	1,2

3.2. Muestra G.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 18-11-1977.

La disolución acuosa de los extractos se ha purificado por defecación y paso por resinas como se ha indicado en los apartados III.2.3.1. y III.2.3.2.

En la muestra G, convenientemente diluída, se han determinado los azúcares reductores por el método de Lane-Eynon. El resultado ha sido de 3,2% (expresado en glucosa).

Los azúcares totales se han determinado por el método de la antrona-ácido sulfúrico de Roe; que se detalla en el apartado III. 2.5.3., utilizando la curva de cali--brado nº 1 (figura 3).

Los resultados han sido:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por 1 ml de <u>di</u> solución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales % (glucosa)
nº 1	2000	0,180	66	3,3
nº 2	4000	0,350	126	3,1

La fructosa se ha determinado por el método de la cisteina-sulfúrico utilizando la curva de calibrado nº 2 (figura 4).

Los resultados han sido:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por cada 0,4 ml de disolución	Absorbancia	Microgramos fructosa de fructosa en 0,4 ml	
nº 1	20000	0,350	83	0,4
nº 2	30000	0,580	137	0,5

3.3. Muestra H.

Variiedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 10-8-1978

Después de deshuesar las aceitunas, la pulpa se divide en dos fracciones iguales que se someten a todas las operaciones ya indicadas de estabilización y extracción y paso a disolución acuosa. La purificación se realiza en una de las disoluciones por defecación, y en la otra por defecación y paso por resinas de intercambio iónico como ya se ha detallado anteriormente. Las dos muestras así obtenidas las denominamos H-1 y H-2 respectivamente.

En las muestras H-1 y H-2 se han determinado los azúcares reductores y los totales por el método de Lane-Eynon.

Los resultados han sido:

Muestra	Azúcares reductores % de glucosa	Azúcares totales % de glucosa
H-1	4,5	4,8
H-2	4,4	4,4

En las muestras H-1 y H-2 convenientemente diluídas se han determinado también los azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico utilizando la curva de calibrado nº 2 (figura 2).

Los resultados han sido los siguientes:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por 1 ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales % (glucosa)
H-1	672	0,295	29	4,3
H-1	864	0,400	40	4,6
H-2	672	0,250	25	3,7
H-2	864	0,315	31	3,6

En las muestras H-1 y H-2, convenientemente diluídas, se han determinado también los azúcares totales por el método de la antrona-sulfúrico, utilizando la curva -- de calibrado nº 2 (figura 3).

Los resultados han sido:

Muestra	Microgramos de pul- pa extraída por 1 ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales %(glucos
H-1	2400	0,250	109	4,5
H-1	3600	0,400	177	4,9
H-2	2400	0,250	109	4,5
H-2	3600	0,370	164	4,6

La fructosa se ha determinado por el método de la cisteína-sulfúrico, utilizando la curva de calibrado nº 3 (figura 5).

Los resultados han sido:

Muestra	Microgramos de pul- pa extraída por 0,4 ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de fructosa en 0,4 ml.	Fructosa
H-1	9216	0,385	121	1,3
H-1	12288	0,510	159	1,3
H-2	9216	0,400	125	1,4
H-2	12288	0,560	174	1,4

3.4. Muestra I.

Variedad: "gordal".

Fecha de la toma de muestra: 20-9-1977.

La estabilización y extracción se ha realizado como se indica en el apartado II.2.2.

La disolución acuosa de los extractos se ha purificado una parte por defecación (Muestra I-1) y la otra por paso por resinas de intercambio iónico y defecación (Muestra I-2).

En las muestras I-1 y I-2 se han determinado los azúcares reductores y totales por el método de Lane-Eynon.

Los resultados han sido:

Muestra	Azúcares reductores % de glucosa	Azúcares totales % de glucosa
I-1	4,5	5,1
I-2	4,3	4,8

También se han determinado los azúcares reductores por el método de las sales de tetrazolio con los siguientes resultados:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por 2 ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 2 ml.	Azúcares reductores % (glucosa)
I-1	4342	0,645	263	6,1
I-2	3789	0,280	160	4,2

En las muestras I-1 y I-2, convenientemente diluidas, se han determinado los azúcares totales por el método

del fenol-sulfúrico utilizando la curva de calibrado nº 1 (figura 2).

Los resultados han sido los siguientes:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por cada ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales % (gluco
I-1	434	0,295	25	5,8
I-2	379	0,205	17	4,5

La fructosa se ha determinado por el método de la cisteína-sulfúrico, utilizando la curva de calibrado nº 1 (figura 4).

Los resultados han sido los siguientes:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por cada 0,4 ml de disoluc.	Absorbancia	Microgramos de fructosa en 0,4 ml.	Fructosa %
I-1	10421	0,410	86	0,8
I-2	9093	0,315	72	0,8

3.5. Resumen

En la tabla XIII, se recopilan los resultados de todas las determinaciones.

En el apartado VIII.2 se hace un estudio comparado de los resultados obtenidos con los métodos globales y -- los encontrados por aplicación de los métodos cromatográficos.

Tabla XIII

Muestra	Tratamiento	Porcentajes, en % de pulpa fresca				
		Azúcares reductores (1)	(2)	Azúcares totales (3)	(4)	Fructosa (5)
P-1	a	3,7	5,2	3,9	4,2	1,1
P-2	b	3,8		3,8		1,2
G	b	3,2			3,2	0,5
H-1	a	4,5		4,8	4,5	1,3
H-2	b	4,4		4,4	3,7	1,4
I-1	a	4,5	6,1	5,1	5,8	0,8
I-2	b	4,3	4,2	4,8	4,5	0,8

(1) Método de Lane-Eynon.

(2) Método de las sales de tetrazolio.

(3) Método del fenol-sulfúrico.

(4) Método de la antrona-sulfúrico de Roe.

(5) Método de la cisteína-sulfúrico.

Tratamiento: a, defecación; b, defecación y resinas.

IV. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA EN LA PULPA

METODO ENZIMATICO (1)

(1) En la realización de este apartado ha colaborado el Licenciado D. Fernando Iglesias Guerra.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Los métodos enzimáticos son precisos y específicos, sin embargo son pocos los trabajos descritos en la bibliografía en los que se utilizan estos métodos en el análisis cuantitativo de azúcares en productos naturales.

El método enzimático más empleado en la determinación de glucosa presente en distintos productos naturales es el de Hough y Jones (50), que se fundamenta en la deshidrogenación específica de la β -D-glucopiranososa en presencia de la enzima aerodeshidrogenasa ó glucosa-oxidasa con la formación de la D-glucono-1,5-lactona y peróxido de hidrógeno, el cual al reaccionar con ortodianisidina en presencia de peroxidasa da un compuesto coloreado. La intensidad de color se mide a 540 nm, y es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

Recientemente, A. Heredia (51) ha puesto a punto una técnica analítica de tipo enzimático para esclarecer la presencia o ausencia de almidón en aceitunas verdes que aplica a las variedades "gordal" y "manzanilla". El procedimiento analítico seguido consiste en la hidrólisis enzimática del almidón, posiblemente presente, con amiloglucosidasa y posterior análisis de la glucosa resultante mediante el reactivo glucosa-oxidasa.

En este capítulo se emplea el método enzimático de Hough y Jones para la determinación de glucosa en los extractos de pulpa de aceitunas, sin que sea necesaria una previa separación de los componentes de la mezcla.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Aceitunas

Se han utilizado aceitunas de las variedades "manzanilla" y "gordal" recogidas en olivares de la provincia de Sevilla.

Muestras de "manzanilla":

Muestra G (18-11-1977)

Muestra J (20-11-1978)

Muestras de "gordal":

Muestra I (20-9-1977)

Muestra K (20-11-1978)

2.2. Extracción de mono y oligosacáridos

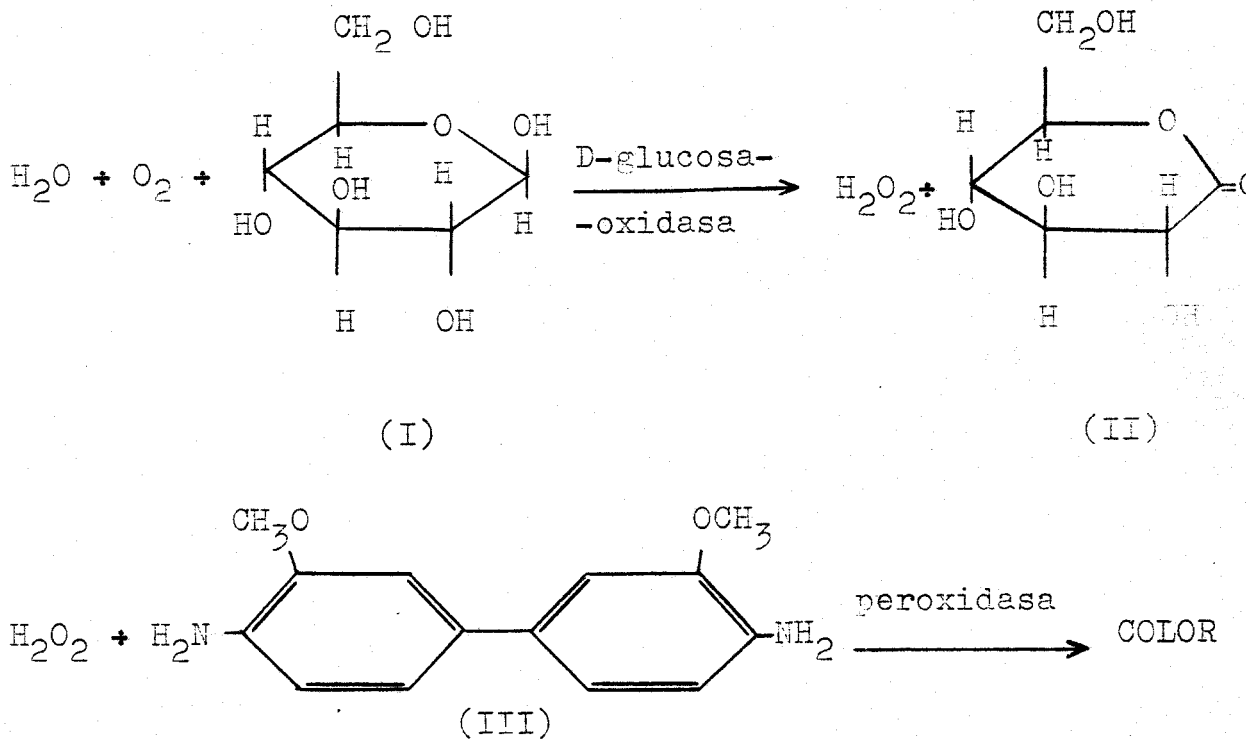
Se ha realizado de manera similar a como ya se ha indicado en el apartado II.2.2.

2.3. Tratamiento de purificación previo a las determinaciones cuantitativas

Se sigue el procedimiento indicado en el apartado - III.2.3.

2.4. Método analítico

El método empleado para la determinación de la glucosa en las distintas muestras de aceitunas es el descrito por Hough y Jones (50) que emplea el reactivo glucosa-oxidasa y que se basa en el siguiente esquema de reacciones:



La enzima glucosa-oxidasa cataliza la separación de dos átomos de hidrógeno, del carbono anomérico, de la β -D-glucopiranososa (I) formándose D-glucono-1,5-lactona (II) y peróxido de hidrógeno, el cual, origina un producto coloreado al reaccionar con la ortodianisidina (III) en presencia de la enzima peroxidasa. Después de acidificar con ácido clorhídrico 5 N, la intensidad de la coloración medida a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman Mod. 2400, es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

2.4.1. Reactivos

Tris-hidroximetil-aminometano (Eastman)

Glicerina (Panreac)

Clorhidrato de o-dianisidina (Eastman)

Glucosa-oxidasa (Merck)

Peroxidasa (BDH)

2.4.2. Solución de tris-glicerol buffer, de pH 7.

Se disuelven 6,1 g de tris-hidroximetilamino-metano en 8,6 ml de ácido clorhídrico 5 N. La solución se diluye a 100 ml, con agua destilada y se añaden 66 ml de glicerina. Se ajusta el pH a 7 con ácido clorhídrico 5 N.

2.4.3. Reactivo glucosa-oxidasa

En 100 ml de tris-glicerol buffer, de pH 7, se disuelven 30 mg de glucosa-oxidasa, 3 mg de peroxidasa y 10 mg de clorhidrato de o-dianisidina y la solución se conserva en la oscuridad a 4º.

2.4.4. Procedimiento de análisis

A 1 ml de la muestra preparada para la determinación de la glucosa se le añaden 2 ml del reactivo glucosa-oxidasa y se calienta en termóstato durante una hora a 30º ± 1º. A continuación se añaden 4 ml de ácido clorhídrico 5 N y se mide la absorbancia a 540 nm.

2.4.5. Curvas de calibrado

~~Con objeto de conocer la concentración de glucosa~~ de cada una de las muestras analizadas por este método, partiendo del dato de absorbancia obtenido experimentalmente, es necesario conocer previamente la absorbancia de distintas cantidades conocidas de glucosa que se someten al mismo proceso que a las muestras, es decir se necesita tener una curva de calibrado.

Para la construcción de esta curva de calibrado se preparan 9 disoluciones de referencia cuyas concentraciones estén comprendidas en el intervalo de 10-90 microgramos de glucosa por mililitro de disolución. Se toma 1 ml de cada una de estas disoluciones, en distintos tubos de ensayo y se someten a la reacción enzimática con el reactivo de la glucosa-oxidasa. Posteriormente se añaden 4 ml de ácido clorhídrico 5 N a cada tubo y se mide la absorbancia a 540 nm.

La línea de calibrado se obtiene poniendo en abscisas los microgramos de glucosa que hay en un mililitro y en ordenadas los correspondientes valores medidos de absorbancia.

Como blanco se utiliza un tubo de ensayo conteniendo 1 ml de agua destilada, el cual se somete al mismo proceso que las disoluciones de referencia.

Para que las absorbancias obtenidas con las distintas muestras se puedan comparar, con el mínimo error, con las absorbancias obtenidas para las disoluciones de referencia, se hace una curva de calibrado cada vez que se hace el análisis de una muestra. Así, tanto las muestras como las referencias están sometidas a las mismas condiciones experimentales. Si se analizan juntas más de una muestra, se hace solo una curva de calibrado al mismo tiempo que las muestras se someten al proceso analítico.

Como se han analizado muestras en cuatro momentos diferentes se han construido también cuatro curvas de calibrado.

Curva de calibrado nº 1.- Se emplea en la determinación analítica de la muestra G (disoluciones G-1-1, G-1-2, G-2-1 y G-2-2).

Las cantidades de glucosa que contienen las 9 disoluciones de referencia, así como los valores de absorbancia que resultan por aplicación del método se exponen en la tabla XIV, construyéndose con dichos valores la curva de calibrado nº 1 (figura 6).

Curva de calibrado nº 2.- Se utiliza en la determinación cuantitativa de glucosa en las muestras G (disoluciones G-3-1 y G-3-2) e I.

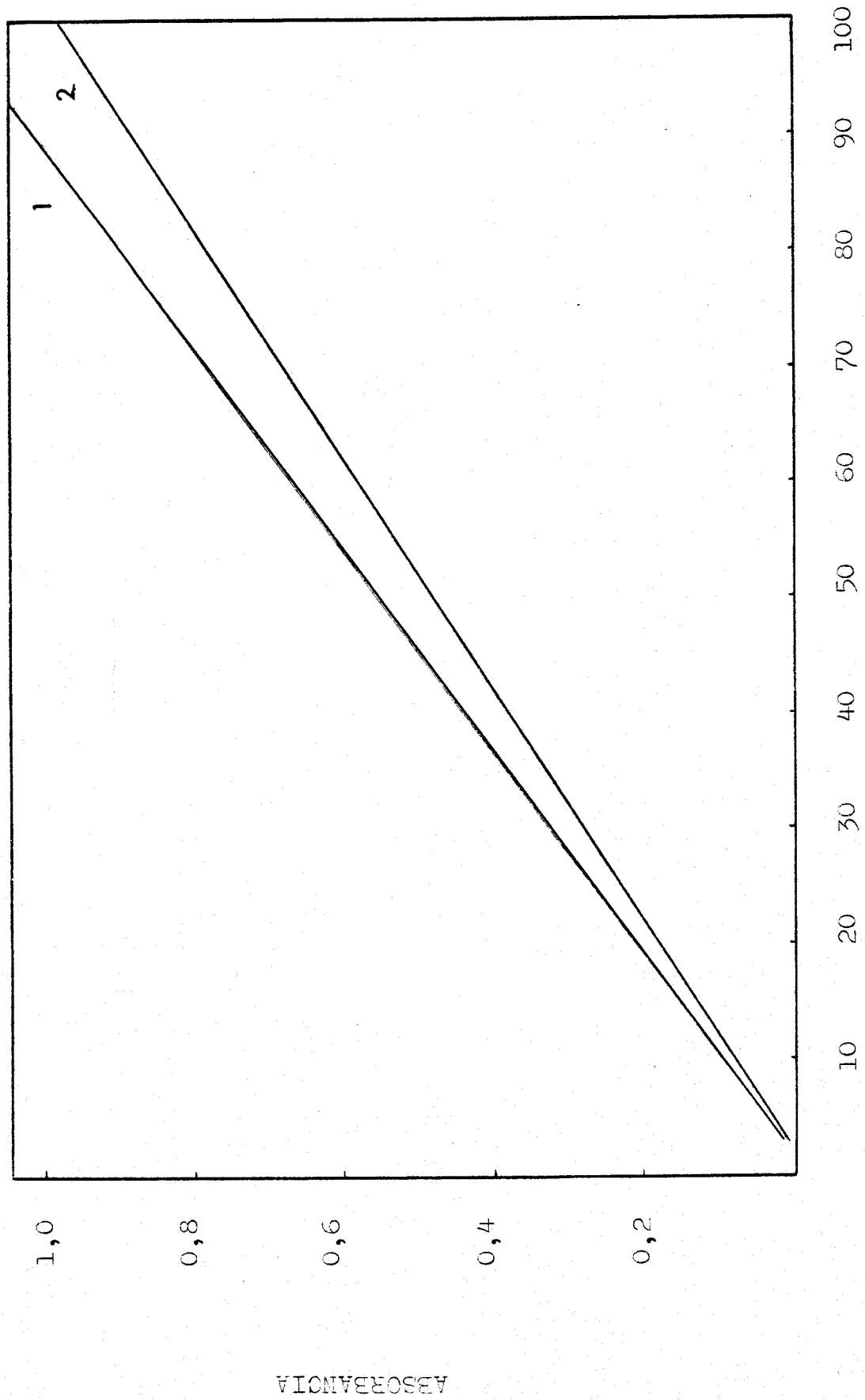
Los valores de absorbancias obtenidos para las 9 disoluciones de referencia por aplicación del procedimiento analítico se exponen en la tabla XV, y con dichos valores se construye la curva de calibrado nº 2 (figura 6).

Tabla XIV

<u>Disoluciones de referencia.</u>	<u>Cantidad de glu- cosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	10	0,115
nº 2	20	0,220
nº 3	30	0,310
nº 4	40	0,430
nº 5	50	0,510
nº 6	60	0,660
nº 7	70	0,780
nº 8	80	0,880
nº 9	90	1,050

Tabla XV

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glu- cosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	10	0,065
nº 2	20	0,175
nº 3	30	0,285
nº 4	40	0,390
nº 5	50	0,470
nº 6	60	0,610
nº 7	70	0,695
nº 8	80	0,710
nº 9	90	0,910



Microgramos de glucosa en 1 ml

Figura 6.

Curva de calibrado nº 3.- Se emplea en el análisis de la muestra J.

Se preparan 9 disoluciones de glucosa (10-90 μg), se someten al procedimiento analítico descrito en el apartado 2.4.4. y se miden las absorbancias frente al blanco a 540 nm.

Los valores obtenidos se exponen en la tabla XVI.

Tabla XVI

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glucosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	10	0,090
nº 2	20	0,190
nº 3	30	0,285
nº 4	40	0,395
nº 5	50	0,510
nº 6	60	0,610
nº 7	70	0,700
nº 8	80	0,750
nº 9	90	0,880

Con estos valores se construye la curva de calibrado nº 3 (figura 7).

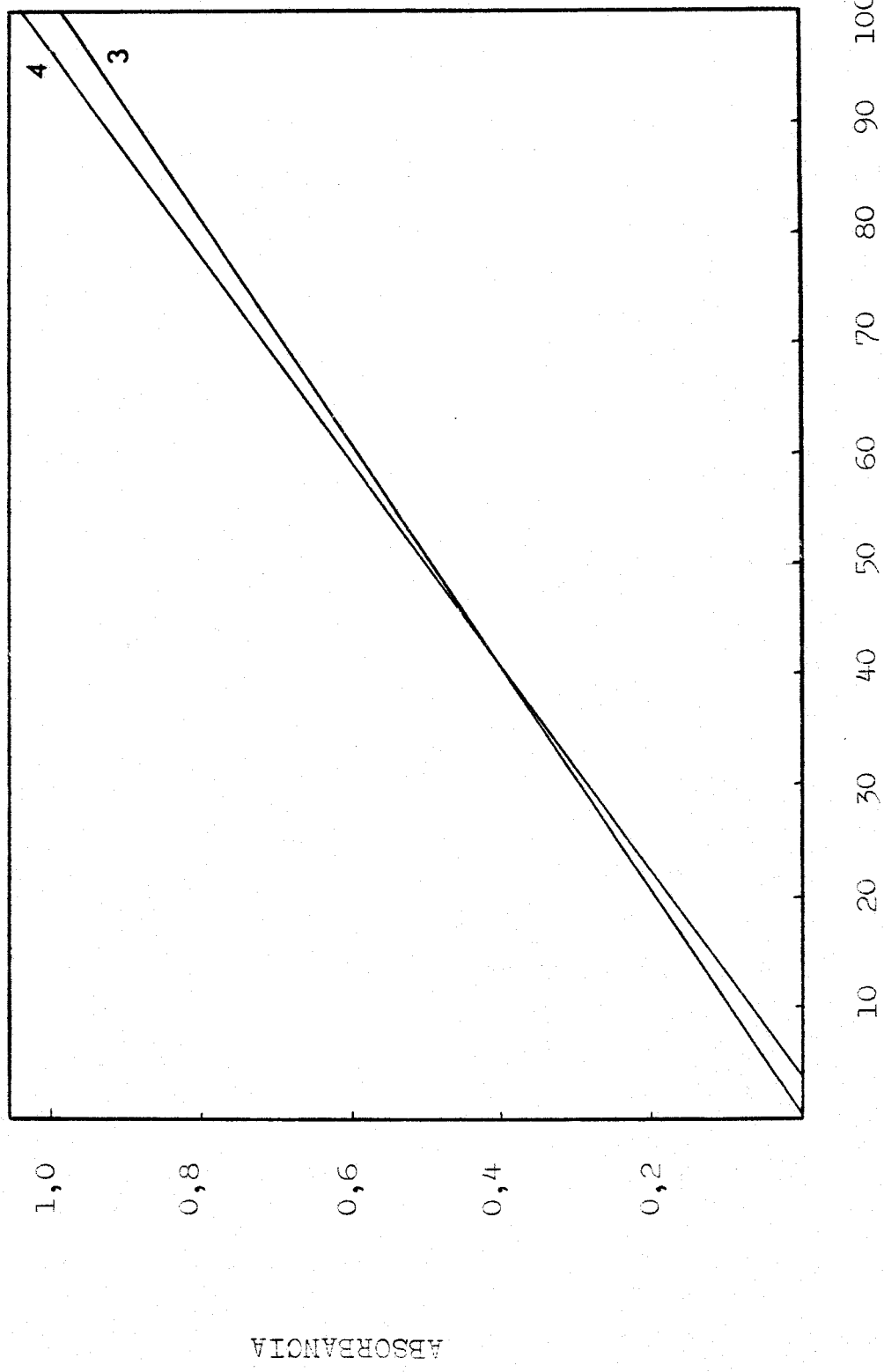
Curva de calibrado nº 4.- Se emplea en el análisis de la muestra K.

Las cantidades de glucosa que contienen las 9 disoluciones de referencia, así como los valores de absor-

bancia que resultan por aplicación del método enzimático - se exponen en la tabla XVII, construyéndose con dichos valores la curva de calibrado nº 4 (figura 7).

Tabla XVII

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Cantidad de glucosa en 1 ml, en microgramos.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	10	0,095
nº 2	20	0,190
nº 3	30	0,265
nº 4	40	0,380
nº 5	50	0,485
nº 6	60	0,590
nº 7	70	0,700
nº 8	80	0,790
nº 9	90	0,980



Microgramos de glucosa en 1 ml

Figura 7.

3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

A continuación se describe el proceso seguido con cada una de las muestras y los resultados obtenidos.

3.1. Muestra G.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 18-11-1977.

La estabilización y extracción se ha realizado como se indica en el apartado II.2.2.

Los extractos etanólicos procedentes de 25 g de -- pulpa fresca se evaporan en rotavapor con el fin de eliminar el etanol. El residuo se trata con agua como se indica en el apartado III.2.3. para pasar a disolución acuosa --- (100 ml) los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

En esta disolución acuosa cada ml corresponde a -- 250 mg de pulpa extraída.

Dos partes alicuotas de esta disolución (1 ml de -- cada una) se diluyen a 200 ml y 100 ml respectivamente obteniendo dos disoluciones que denominamos muestras G-1-1 y G-1-2, en las que cada ml corresponde a 1250 y 2500 microgramos de pulpa extraída.

El resto de la primera disolución acuosa se defeca con acetato neutro de plomo (apartado III.2.3.1.).

Una parte se diluye convenientemente obteniendo dos fracciones que denominamos muestras G-2-1 y G-2-2, en las que cada ml corresponde a 1250 y 2500 microgramos de pulpa extraída. Otra parte se pasa por dos columnas de resinas de cambio iónico, Amberlita IR-120 y IR-45 y se diluye convenientemente, obteniendo dos fracciones que denominamos muestras G-3-1 y G-3-2 en las que cada ml corresponde a 2000 y 3000 microgramos de pulpa extraída.

De cada una de estas disoluciones, se toma 1 ml y se le aplica el procedimiento analítico que se indica en el apartado IV.2.4.4, midiendo las absorbancias frente al blanco a 540 nm.

Los valores de absorbancia de las disoluciones que corresponden a las muestras G-1-1, G-1-2, G-2-1 y G-2-2 se llevan a la curva de calibrado nº 1 y los de las muestras G-3-1 y G-3-2 a la curva de calibrado nº 2. Se determinan de esta forma las cantidades de glucosa, en microgramos, que contienen dichas disoluciones.

Se calculan los porcentajes de glucosa de cada una de las disoluciones analizadas.

Los microgramos de pulpa extraída por 1 ml de disolución analizada, las absorbancias, los microgramos de glucosa por 1 ml y los tantos por ciento de glucosa en cada una de las muestras analizadas se indican a continuación.

Muestras	Microgramos de pulpa extraída por cada ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Glucosa %
G-1-1	1250	0,150	15	1,2
G-1-2	2500	0,275	26	1,0
G-2-1	1250	0,195	19	1,5
G-2-2	2500	0,350	33	1,3
G-3-1	2000	0,340	36	1,8
G-3-2	3000	0,545	57	1,9

3.2. Muestra J

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 20-11-1978

Se extraen los azúcares de la pulpa de aceitunas deshuesadas siguiendo el procedimiento descrito en el --- apartado II.2.2.

El extracto etanólico que se obtiene se pasa a di solución acuosa y se purifica mediante defecación con ace tato de plomo y posterior desmineralización con resinas - de cambio iónico tal como se ha indicado en el apartado - III.2.3.

A partir de este extracto se preparan dos disoluciones que denominamos muestras J-1 y J-2 que son las que se someten al procedimiento enzimático descrito.

Los valores de absorbancia de estas dos disoluciones se llevan a la curva de calibrado nº 3, conociéndose así las cantidades de glucosa que les corresponden a cada una de ellas.

Los resultados son los siguientes:

Muestra	Microgramos de pulpa extraída por cada ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Glucosa %
J-1	1610	0,270	28	1,7
J-2	4040	0,620	63	1,6

3.3. Muestra I.

Variedad: "gordal".

Fecha de la toma de muestra: 20-9-1977

Se extraen los azúcares de la pulpa como ya se ha indicado y se purifica el extracto acuoso por desionización con resinas de cambio iónico y posterior defecación con acetato neutro de plomo como se ha indicado anteriormente.

A partir de este extracto se preparan dos disoluciones que denominamos muestras I-1 y I-2, que se someten al procedimiento de determinación enzimática descrito.

Los valores de absorbancia de estas disoluciones se llevan a la curva de calibrado nº 2 y se conocen de es

ta forma las cantidades de glucosa que corresponden a cada una de ellas.

Los resultados son los siguientes:

Muestras	Microgramos de pulpa extraida por cada ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Glucosa %
I-1	1185	0,400	42	3,5
I-2	2370	0,800	82	3,5

3.4. Muestra K.

Variedad: "gordal".

Fecha de la toma de muestra: 20-11-1978

Se extraen los azúcares de la pulpa y se pasan a disolución acuosa como ya se ha indicado y el extracto -- acuoso se purifica por defecación con acetato neutro de plomo y mediante tratamiento con resinas de intercambio iónico.

A partir del extracto acuoso que resulta, se preparan dos disoluciones que denominamos muestras K-1 y K-2, que se analizan siguiendo el procedimiento indicado en el apartado IV.2.4.4., utilizando la curva de calibrado nº 4.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Muestras	Microgramos de pulpa extraída por cada ml de disolución.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Glucosa %
K-1	1620	0,285	30	1,9
K-2	2030	0,385	40	2,0

3.5. Resumen

En la tabla XVIII, se recopilan los valores obtenidos en estas determinaciones.

Tabla XVIII

Muestra	Tratamiento	Porcentaje de glucosa % de pulpa fresca
Muestra G-1	ninguno	1,1
Muestra G-2	a	1,4
Muestra G-3	a y b	1,9
Muestra J	a y b	1,7
Muestra I	a y b	3,5
Muestra K	a y b	2,0

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

El estudio comparado de estos resultados con los obtenidos por otros procedimientos se incluye en el apartado VIII.2.2.

V. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA

DE LA PULPA.

METODO DE LA CROMATOGRAFIA DE PAPEL.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La cromatografía cuantitativa sobre papel se ha -- utilizado con frecuencia en la determinación de azúcares -- de extractos de plantas desde la publicación original de -- Partridge aparecida en 1948 (15), .

El procedimiento más exacto es aquel en que los hi dratos de carbono se separan sobre el papel y posteriormente se extraen con agua del cromatograma y se determinan -- por una técnica espectrofotométrica (52). Los reactivos em pleados para valorarlos son muy diversos, siendo el de la antrona uno de los más utilizados (53,54).

La determinación de glucosa, fructosa y sacarosa -- en extractos de tejidos de plantas se ha descrito por Sunderwirth y col. (55). Recientemente Hehl (56), describe un procedimiento análogo, determinando la glucosa con el reacti vo antrona-ácido sulfúrico (48,57,58) y la fructosa y saca rosa con orcinol (59).

En relación con la determinación cuantitativa especi fica de azúcares en la pulpa de aceitunas, Sandret (9) -- estudia la determinación de glucosa y fructosa en la pulpa de tres variedades que se cultivan en Marruecos: la picholine marroqui o Zitoum, la hojiblanca y la gordal. Las deter minaciones las realiza por cromatografía de papel semicu antitativa midiendo las dimensiones e intensidades de -- las manchas que se originan al revelar con fosfato de --- p-anisidina, una vez desarrollado el cromatograma por los procedimientos usuales.

Este autor (9) establece que la relación glucosa a fructosa permanece sensiblemente constante en el curso de la maduración para las tres variedades analizadas: fructosa / azúcares reductores = 0,40-0,45.

Rágazzi y Veronese (11) hacen un estudio cuantitativo en el alpechín de aceitunas maduras. Aplican la cromatografía sobre papel determinando la glucosa por el método de Wilson (60) con ftalato ácido de anilina y la fructosa mediante el método de El Khadem (61) con molibdato.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Aceitunas

Las muestras utilizadas en estas determinaciones fueron recogidas en olivares de la provincia de Sevilla.

Muestras de "manzanilla":

Muestra F (20-9-1977).

Muestra G (18-11-1977).

Muestras de "gordal":

Muestra I (20-9-1977)

2.2. Extracción de mono y oligosacáridos

Se ha realizado de manera similar a como ya se ha indicado en el apartado II.2.2.

2.3. Tratamiento de purificación previo a las determinaciones cuantitativas.

Todas las muestras han sido defecadas con acetato neutro de plomo y tratadas con resinas de intercambio iónico siguiendo el procedimiento indicado en los apartados III.2.3.1. y III.2.3.2.

2.4. Técnica cromatográfica

El procedimiento que se utiliza es similar al de Gunther Hehl (56). Consiste en la separación de glucosa, fructosa y sacarosa en extractos de pulpa de aceitunas mediante la cromatografía de papel descendente y posteriormente la glucosa, fructosa y sacarosa extraídas del papel son determinadas cuantitativamente por el método colorimétrico de la antrona-ácido sulfúrico descrito por Roe.

El método antes citado ha sido aplicado en las de terminación cuantitativa de tres muestras de aceitunas, dos correspondientes a la variedad "manzanilla" y la otra de la variedad "gordal".

2.5. Ensayos cromatográficos previos

Se han ensayado papeles Whatman nº 1,3 y 3 MM y distintos desarrolladores con el fin de escoger el más adecuado.

En la tabla XIX se detallan algunos de los desarrolladores y papeles utilizados, así como los R_G de los

distintos azúcares que componen las muestras y los tiempos de elución necesarios.

Los tiempos de desarrollo necesarios para conseguir la máxima separación de los componentes de las muestras, dependen del tipo de papel y del desarrollador utilizado. Estas pruebas que se detallan en la tabla XIX se han hecho a temperaturas entre 20 y 22 °.

Después de haber hecho un estudio de los cromatogramas, en las condiciones que se explican en la tabla antes citada, llegamos a la conclusión de que el sistema -- acetato de etilo-piridina-agua (13:5:1), es el desarrollador que permite una mejor separación de la glucosa, fructosa y sacarosa en concentraciones análogas a las de las muestras que tenemos que analizar. El papel más adecuado es el Whatman nº 3, dándose en el un desarrollo más uniforme a una mayor concentración de las manchas y una buena separación entre las mismas.

Tabla XIX

Desarrollador	Papel	Tiempo de desarrollo	R_G		
			Gluc.	Fruct.	Sac.
Butanol-acetona-agua (2:7:1) (18,19)	W-1	32 horas	1,00	1,25	0,51
Butanol-acetona-agua (2:7:1)	W-3	24 horas	1,00	1,36	0,56
Acetato de etilo-ácido propanoico-acetona-agua- isopropanol-butanol. (4:3:3:2,5:2:1) (56)	W-3	16 horas	1,00	1,23	0,66
Acetato de etilo- piridina-agua. (3,6:1:1,15) (21)	W-1	45 horas	1,00	1,23	0,60
Acetato de etilo- piridina-agua. (3,6:1:1,15)	W-3	40 horas	1,00	1,25	0,64
Acetato de etilo- piridina-agua. (8:3:1) (62)	W-3	33 horas	1,00	1,36	0,48
Acetato de etilo- piridina-agua. (10:5:1)	W-3	27 horas	1,00	1,34	0,50
Acetato de etilo- piridina-agua. (13:5:1)	W-3	39 horas	1,00	1,43	0,41

2.6. Curvas de calibrado

2.6.1. Preparación y desarrollo de los cromatogramas

Para la construcción de las curvas de calibrado, que nos van a servir para realizar posteriormente el análisis de los diversos azúcares existentes en las muestras se preparan las hojas de papel Whatman nº 3, donde se va a efectuar la separación cromatográfica de los azúcares, de la siguiente manera:

Se dibujan en cada una de ellas cinco bandas longitudinales C,A,C,B y C en la forma y con las dimensiones que se detallan en el diseño, (figura 8), y se señalan -- los puntos a y b en la línea de base, donde se colocan -- los microlitros de las mezclas de azúcares que se van a -- separar en la cromatografía. Estas mezclas las denomina-- mos: disolución A y disolución B. La disolución A se pre-- para disolviendo glucosa (2,2 g), fructosa (1 g) y sacaro-- sa (0,7 g) en agua y diluyendo a 100 ml en un matraz afo-- rado. La disolución B se prepara disolviendo glucosa --- (0,4 g), fructosa (0,2 g) y sacarosa (0,2 g) en agua y di-- luyendo a 100 ml en un matraz aforado. Las disoluciones -- se preparan inmediatamente antes de su uso, con azúcares de pureza analítica y cromatográfica, haciendo las pesa-- das con un error de 0,0001 g.

Los microlitros colocados en cada uno de los cromatogramas se detallan en los apartados 2.7.1, 2.7.2. y 2.7.3 que corresponden a las distintas curvas de calibrado.

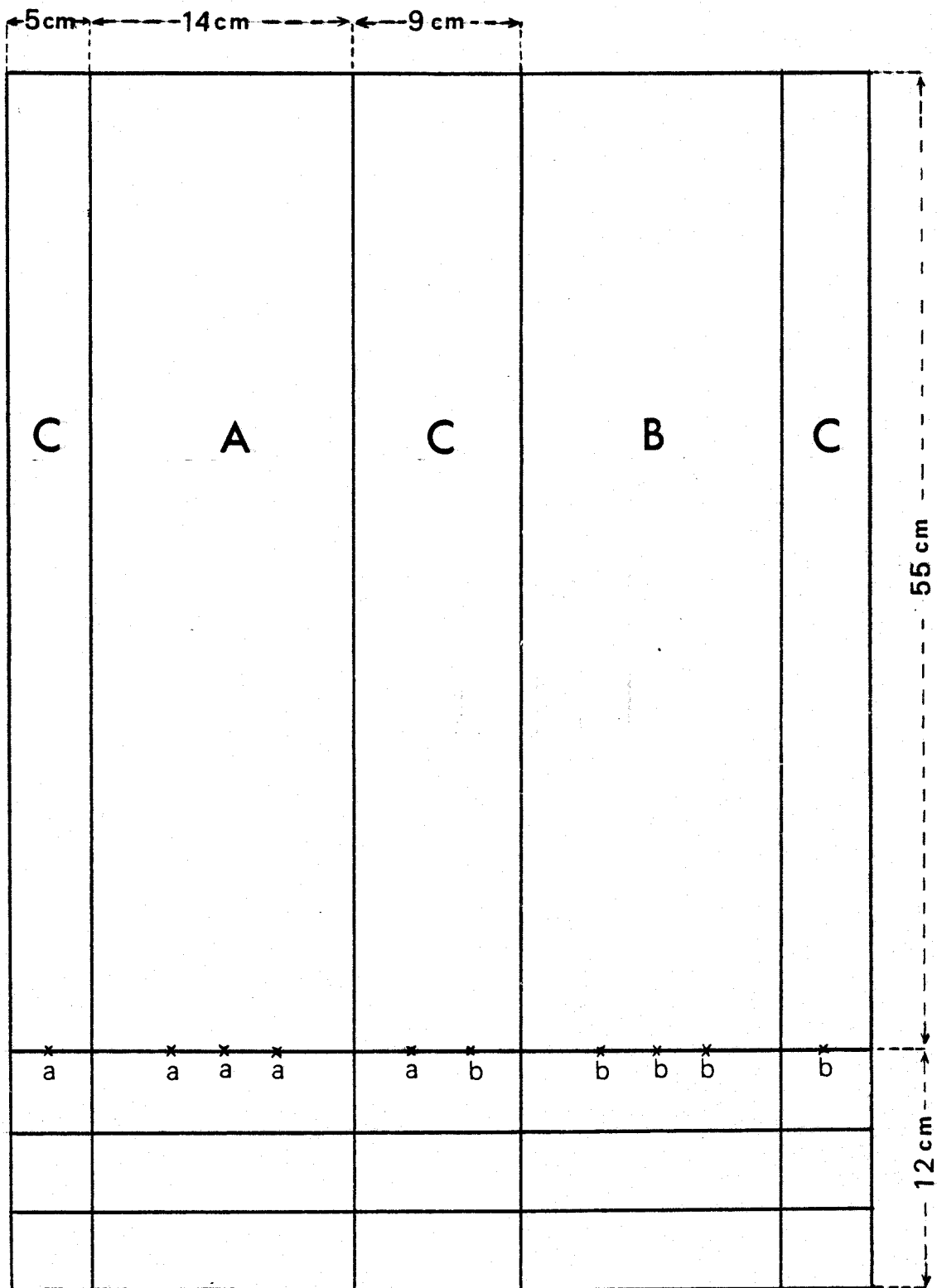


Figura 8.

El desarrollo de los cromatogramas se ha realizado por la técnica descendente, utilizando como desarrollador acetato de etilo-piridina-agua (13:5:1), un tiempo de desarrollo de 38 horas y a la temperatura de 16-17°.

2.6.2. Localización y extracción de los azúcares en los cromatogramas

Una vez desarrollados y secados los cromatogramas, las bandas C, separadas del resto, se revelan con objeto de saber a que altura del cromatograma quedan los distintos azúcares.

Para la localización de las posiciones de los hidratos de carbono en el papel, las tiras anteriormente citadas son reveladas con el reactivo difenilamina-urea y ácido fosfórico (29). La preparación y forma de uso de dicho reactivo revelador ha sido descrito en el apartado -- II.2.3.

A continuación se recompone el cromatograma y las tiras A y B se cortan transversalmente, guiándose por -- las manchas de las tiras reveladas, en bandas que tienen las siguientes dimensiones:

Para la glucosa: 12 x 14 cm.

Para la fructosa: 11 x 14 cm.

Para la sacarosa: 9 x 14 cm.

Estas bandas se cortan de tal forma que las manchas de los azúcares queden aproximadamente a la mitad -- del largo cortado.

La extracción de la glucosa y fructosa del papel se hace de la siguiente forma:

Se cortan las bandas en trozos pequeños y se ponen en un matraz con 30 ml de agua destilada. Se calienta el matraz en baño maría durante media hora a una temperatura de 90-95°.

Después de extraer la glucosa y la fructosa del papel, tal como se ha indicado, se filtra la disolución acuosa que la contiene a través de papel Whatman nº 3, con objeto de que la disolución no contenga trazas de papel que daría positiva la reacción con el reactivo-antrona-sulfúrico.

Se lavan los trozos de papel sobre el filtro con 40 ml de agua caliente. Se concentran en rotavapor y en el caso de la glucosa se lleva hasta un volumen de 10 ml en un matraz aforado con agua destilada. Cuando se trata de la fructosa se procede de la misma forma, excepto en que el volumen de la disolución final es de 5 ml.

El proceso seguido en la extracción de la sacarosa es similar al descrito anteriormente para la extracción de la glucosa y fructosa. La diferencia consiste en que tanto la extracción como el lavado posterior se efectúa con etanol-agua del 70% para evitar la posible hidrólisis de la sacarosa. El extracto etanólico se evapora a sequedad para eliminar el etanol y se lleva con agua a un volumen de 5 ml.

2.6.3. Determinación colorimétrica

Se emplea el método de la antrona-sulfúrico de -- Roe (48) en las determinaciones de glucosa, fructosa y sa- carosa extraídas de los cromatogramas desarrollados.

Se toma 1 ml de cada uno de los extractos indica- dos en el apartado anterior, correspondientes a la gluco- sa, fructosa y sacarosa, y se le aplica el procedimiento descrito (III.2.5.3.) midiendo las absorbancias frente al blanco a 620 nm en un espectrofotómetro Beckman Mod. --- G-2400.

Los blancos correspondientes a las determinacio-- nes de glucosa, fructosa y sacarosa se obtienen por ex--- tracción de las bandas transversales que se han indicado en el apartado V.2.6.2. de un cromatograma de análogas ca- racterísticas a las ya señaladas, que se ha desarrollado en idénticas condiciones y con el mismo desarrollador, pe- ro en el que no se han colocado azúcares.

Con estos datos se construyen las curvas de cali- brado que se han de emplear en las determinaciones de glu- cosa, fructosa y sacarosa presentes en los extractos de - las muestras que se analizan.

2.6.4. Curva de calibrado de la glucosa

Se ha construido la curva de calibrado al mismo - tiempo que se analizaban los extractos de las muestras de aceitunas.

Se han utilizado cuatro cromatogramas de papel -- Whatman nº 3, que denominamos: 1, 2, 3 y 4, con las dimensiones y divisiones en bandas como ya se ha indicado en el apartado V.2.6.1.

En el cromatograma nº 1, en cada uno de los puntos a se colocan 10 μ l de la solución A y en cada uno de los puntos b se colocan 10 μ l de la solución A y 10 μ l de la solución B. De esta manera quedan en los tres puntos a de la línea de base de la banda A 660 μ g de glucosa y en los tres puntos b de la banda B 780 μ g de glucosa.

En el cromatograma nº 2, en cada uno de los puntos a se colocan 10 μ l de la solución A y 20 μ l de la solución B. En los puntos b se colocan 10 μ l de la solución A y 30 μ l de la solución B. Quedando por lo tanto en la banda A 900 μ g de glucosa y en la banda B 1020 μ g de glucosa.

Se procede análogamente con el cromatograma nº 3. En los puntos a se colocan 10 μ l de la solución A y 40 μ l de la solución B. En los puntos b se colocan además de -- 10 μ l de la solución A 50 μ l de la solución B. Quedan en la banda A 1140 μ g de glucosa y en la B 1260 μ g de glucosa.

En el cromatograma nº 4, en cada uno de los puntos a se colocan 10 μ l de la solución A y 60 μ l de la solución B y en los puntos b se colocan 10 μ l de la solución A y 70 μ l de la solución B; quedando en la banda A -- 1380 μ g de glucosa y en la banda B, 1500 μ g de glucosa.

Una vez preparados los cromatogramas, éstos se desarrollan en la forma indicada en el apartado V.2.6.1., se dejan secar al aire y a continuación se cortan las tiras testigo (C), se revelan con el reactivo difenilamina-urea, se recompone el cromatograma y se cortan las bandas correspondientes a la glucosa. Estas bandas se extraen con agua según lo indicado en el apartado V.2.6.2., se toma 1 ml de cada uno de los extractos que resultan y se determinan colorimétricamente siguiendo lo indicado en el apartado V.2.6.3.

Los microlitros de la disolución A y de la disolución B puestos en los distintos cromatogramas, los microgramos de glucosa en 1 ml de cada uno de los extractos obtenidos, así como los valores medidos de absorbancia, se exponen en la tabla XX.

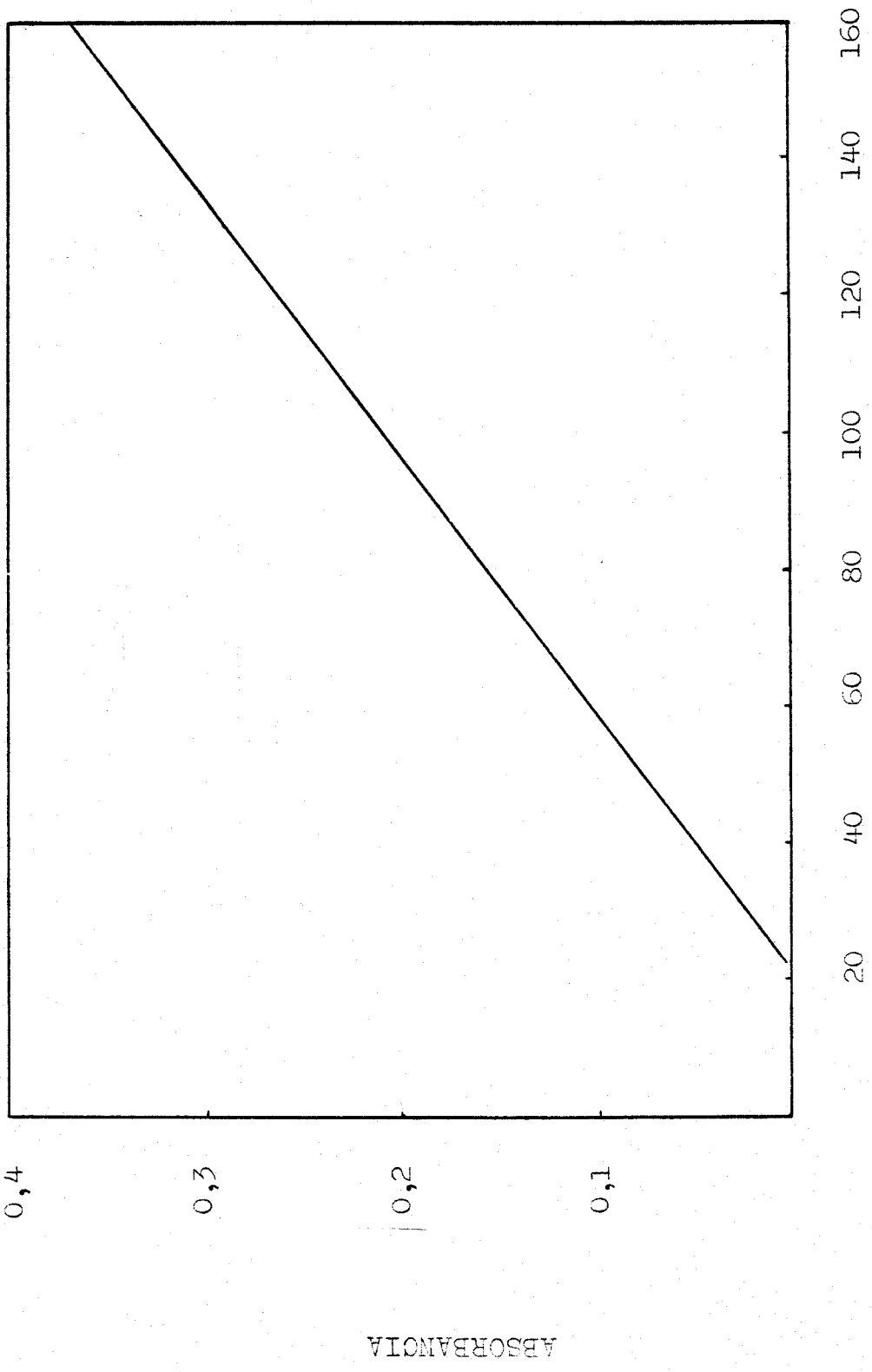
Con las cantidades de glucosa en 1 ml de extracto y los valores de absorbancia correspondientes se construye la curva de calibrado de la glucosa, que se representa en la figura 9.

2.6.5. Curva de calibrado de la fructosa

Para la construcción de la curva de calibrado de la fructosa se han utilizado los mismos cromatogramas que han sido empleados en la construcción de la curva de calibrado de la glucosa. Los volúmenes de las soluciones A y B puestos en la línea base (en los puntos a y b) han sido ya señalados en el apartado anterior. Por lo tanto, las -

Tabla XX

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Microlitros de la disolución A.</u>	<u>Microlitros de la disolución B.</u>	<u>Microgramos de glucosa en 1 ml del extracto.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	A	30	0	66	0,150
	B	30	30	78	0,135
nº 2	A	30	60	90	0,175
	B	30	90	102	0,185
nº 3	A	30	120	114	0,235
	B	30	150	126	0,265
nº 4	A	30	180	138	0,330
	B	30	210	150	0,360



Microgramos de glucosa en 1 ml

Figura 9.

cantidades de fructosa colocadas en las bandas A y B de los cuatro cromatogramas empleados son las siguientes:

Cromatograma nº 1 : banda A : 300 μg .

banda B : 360 μg .

Cromatograma nº 2 : banda A : 420 μg .

banda B : 480 μg .

Cromatograma nº 3 : banda A : 540 μg .

banda B : 500 μg .

Cromatograma nº 4 : banda A : 560 μg .

banda B : 620 μg .

Como se ha indicado en el apartado anterior los cromatogramas se desarrollan, se secan, se localizan los azúcares en las tiras empleadas como testigos (C), se compone el cromatograma, se cortan las bandas correspondientes a la fructosa y se extraen según lo indicado en el apartado V.2.6.2.

Se toma 1 ml de cada uno de los extractos que resultan y se determinan colorimétricamente por el método de la antrona-sulfúrico.

Los microlitros de las disoluciones A y B que han sido colocados en los distintos cromatogramas, los microgramos de glucosa en 1 ml de cada uno de los extractos obtenidos y los valores medidos de absorbancia, se exponen en la tabla XXI.

Tabla XXI

Cromatograma	Banda	Microlitros de la disolución A.	Microlitros de la disolución B.	Microlitros de fructosa en 1 ml de extracto.	Absorbancia
nº 1	A	30	0	60	0,200
	B	30	30	72	0,275
nº 2	A	30	60	84	0,250
	B	30	90	96	0,310
nº 3	A	30	120	108	0,325
	B	30	150	120	0,405
nº 4	A	30	180	132	0,490
	B	30	210	144	0,485

Con los microgramos de fructosa en 1 ml de extracto y los valores de absorbancia correspondientes, se construye la curva de calibrado para la fructosa que se representa en la figura 10.

2.6.6. Curva de calibrado de la sacarosa

Para construir dicha curva de calibrado se han -- utilizado los extractos acuosos de las bandas correspon-- dientes a los tres primeros cromatogramas, cuyas caracte-- rísticas han sido expuestas en el apartado V.2.6.4., ade-- más se ha empleado el extracto correspondiente a la banda B del cromatograma nº 4 y la banda A del cromatograma nº 5, cuya preparación ahora se expone: En los puntos a de di-- cha banda se colocan 10 μ l de la solución A y 240 μ l de -- la solución B. De esta manera quedan en los tres puntos a de la línea de base, en la banda A, 690 μ g de sacarosa.

Por lo tanto, las cantidades de sacarosa coloca-- das en las bandas de los distintos cromatogramas emplea-- dos en la construcción de la curva de calibrado de la sa-- carosa, son las siguientes:

Cromatograma nº 1 : banda A : 210 μ g.

banda B : 270 μ g.

Cromatograma nº 2 : banda A : 330 μ g.

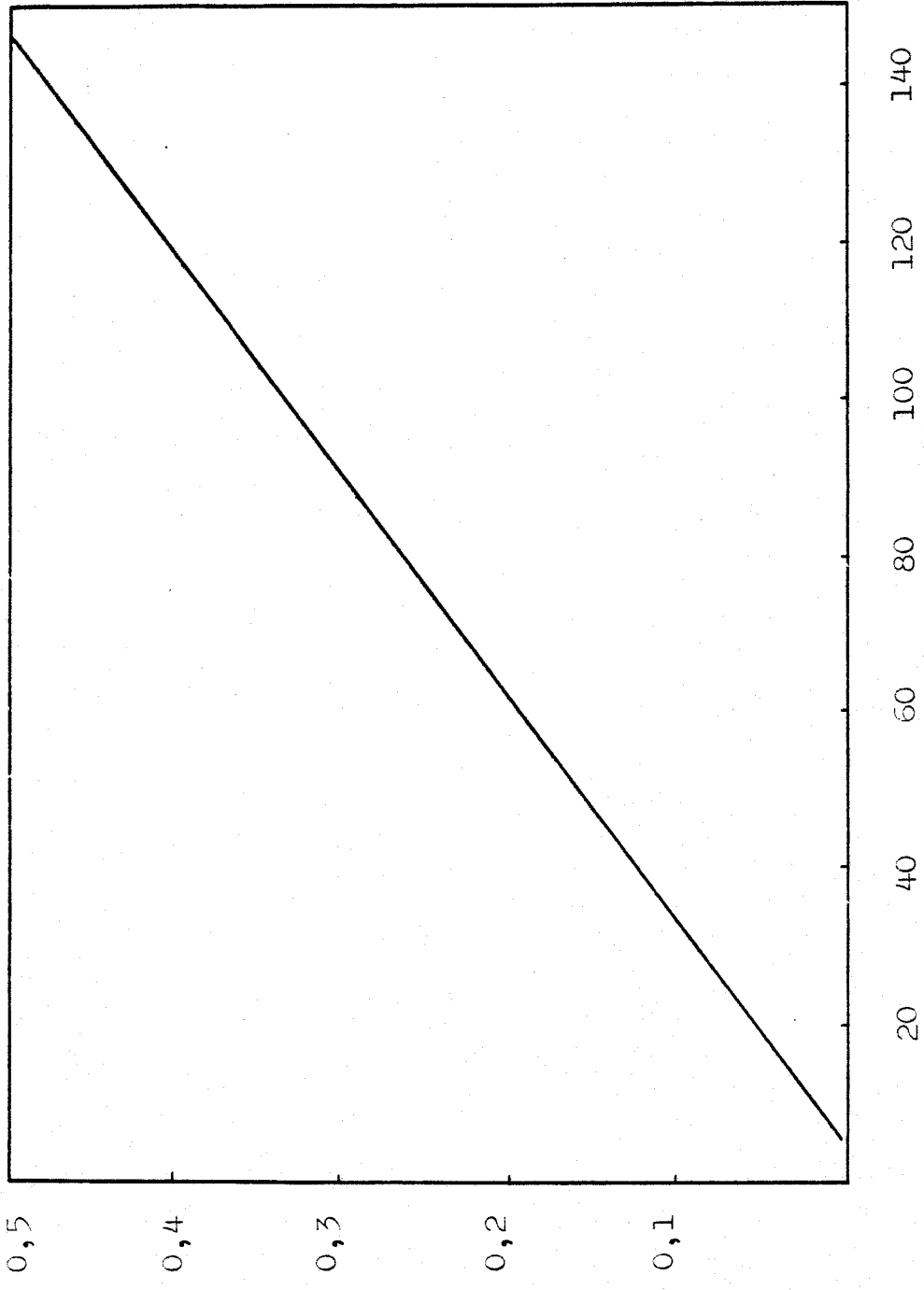
banda B : 390 μ g.

Cromatograma nº 3 : banda A : 450 μ g.

banda B : 510 μ g.

Cromatograma nº 4 : banda B : 630 μ g.

Cromatograma nº 5 : banda A : 690 μ g.



Microgramos de fructosa en 1 ml

Figura 10.

El proceso que se sigue con los cromatogramas se ha indicado en el apartado V.2.6.4.

Una vez cortadas las bandas correspondientes a la sacarosa, se extraen con etanol-agua del 70% (apartado V.2.6.2.), se toma 1 ml de cada uno de los extractos que resultan y se determinan colorimétricamente, al mismo tiempo que se analizan las muestras.

Los microlitros de las disoluciones A y B que se han colocado en los distintos cromatogramas, los microgramos de sacarosa en 1 ml de cada uno de los extractos y -- los valores medidos de absorbancia, se exponen en la tabla XXII.

Con los microgramos de sacarosa en 1 ml de extracto y los valores de absorbancia correspondientes se construye la curva de calibrado de la sacarosa, que se representa en la figura 11.

3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

A continuación se describe el proceso seguido con cada una de las muestras y se detallan los resultados obtenidos.

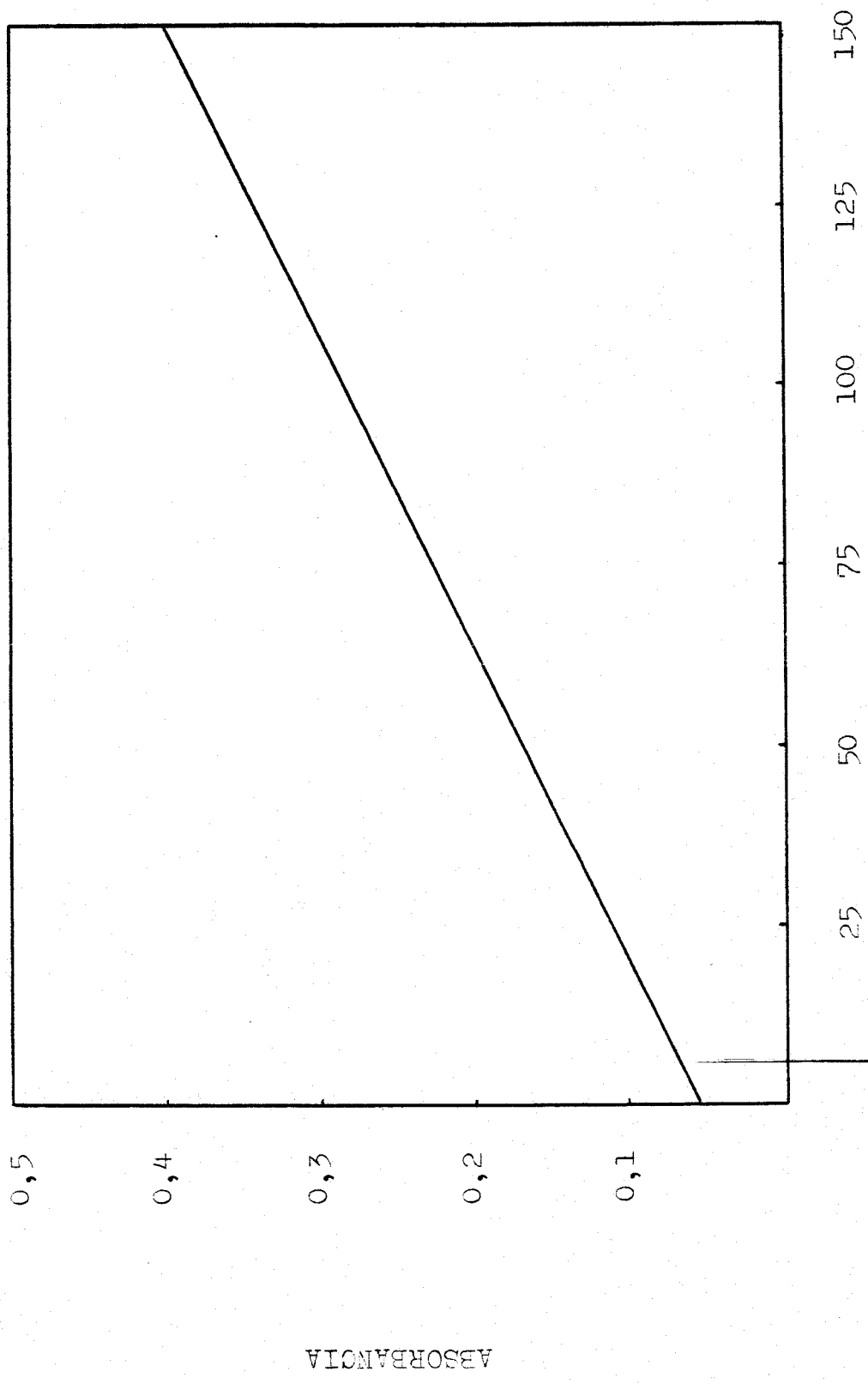
3.1. Muestra F.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 20-9-1977.

Tabla XXII

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Microlitros de la disolución A.</u>	<u>Microlitros de la disolución B.</u>	<u>Microgramos de sacarosa en 1 ml de extracto.</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	A	30	0	42	0,175
	B	30	30	54	0,195
nº 2	A	30	60	66	0,200
	B	30	90	78	0,210
nº 3	A	30	120	90	0,240
	B	30	150	102	0,265
nº 4	B	30	210	126	0,340
nº 5	A	30	240	138	0,405



Microgramos de sacarosa en 1 ml

Figura 11.

Los detalles correspondientes a la extracción de los azúcares de la pulpa, así como el proceso de purificación consistente en paso a través de resinas de intercambio iónico y defecación han sido expuestos en el apartado III.3.1.

A partir del líquido acuoso desionizado y defecado, se preparan dos disoluciones que se van a emplear en la preparación de los cromatogramas utilizados en el análisis de la glucosa, fructosa y sacarosa existentes en dicha muestra.

Los datos obtenidos tanto por los métodos volumétricos y colorimétricos (apartado III.3.) como por la comparación del tamaño e intensidad de las manchas de los componentes de las muestras con las manchas que producen cantidades conocidas de glucosa, fructosa y sacarosa, nos permiten poner los cromatogramas con las cantidades de muestra apropiada para que se encuentren dentro del intervalo de las referencias, que es el intervalo adecuado para la posterior aplicación del método colorimétrico y que las cantidades de muestra colocadas sean tales que se produzca un buen desarrollo de los cromatogramas y una adecuada separación de los azúcares componentes de dichas muestras.

Según lo indicado, se han preparado dos cromatogramas por cada una de las muestras. Uno de ellos se utiliza en la determinación de glucosa y fructosa, y el otro en el análisis de sacarosa. Pues cuando se

ponen cantidades de muestras tales que la sacarosa se encuentra dentro del intervalo de las referencias, las cantidades de fructosa y sobre todo de glucosa son muy elevadas, estando fuera del intervalo adecuado y no permiten la completa separación de dichas sustancias.

En la determinación de glucosa y fructosa se utiliza la disolución F-1, que se prepara de la siguientes manera: se concentra a pequeño volumen una fracción alícuota del extracto acuoso que corresponde a 6,4 g de pulpa, se lleva a un matraz aforado de 10 ml y se enrasa con agua destilada.

En la determinación de sacarosa se emplea la disolución F-2, que se prepara de la misma forma que la F-1, excepto que el volumen final de la disolución es de 5 ml en lugar de 10 ml.

Como se ha indicado anteriormente se emplean dos cromatogramas, uno en la determinación de glucosa y fructosa y el otro para la determinación de sacarosa.

El cromatograma que se utiliza en el análisis de glucosa y fructosa se prepara de la siguiente forma: en cada uno de los puntos a de la banda A se colocan 20 μ l de la disolución F-1 y en cada uno de los puntos b se colocan 30 μ l de la disolución F-1. De esta manera quedan en la línea base de las bandas A y B los azúcares correspondientes a un total de 38400 y 57600 microgramos de pulpa extraída respectivamente.

El cromatograma utilizado en el análisis de la sa carosa se prepara así: se colocan en cada uno de los puntos a 100 μ l de la disolución F-2 y en cada uno de los -- puntos b, 150 μ l de la disolución F-2; quedando por lo -- tanto en la base de las bandas A y B los azúcares corres-- pondientes a 384 y 576 mg de pulpa extraída respectivamen-- te.

Los dos cromatogramas se desarrollan según lo in-- dicado en el apartado V.2.6.1.

Se cortan las tiras testigo (C), se revelan, se -- recompone el cromatograma y se cortan las bandas corres-- pondientes a la glucosa y fructosa, en el cromatograma -- nº 1 y las de sacarosa en el cromatograma nº 2, resultan-- do dos bandas por cada una de las sustancias analizadas. Las bandas se extraen al mismo tiempo que aquellas utili-- zadas en la construcción de la correspondiente curva de -- calibrado. Todas estas operaciones se han realizado con-- forme a lo descrito en el apartado V.2.6.2.

a) Análisis de glucosa.- Se toma 1 ml de cada uno de los dos extractos obtenidos, ~~se les aplica el procedimiento~~ colorimétrico de la antrona-sulfúrico y se miden las ab-- sorbancias frente al blanco a 620 nm. Los valores medidos de absorbancia se llevan a la curva de calibrado de la -- glucosa (figura 9), conociéndose así los microgramos de -- glucosa existentes en 1 ml del extracto.

Los microlitros de la disolución F-1 que se han colocado en las dos bandas del cromatograma, los microgramos de pulpa extraída en 1 ml de cada uno de los extractos, los valores de absorbancia y los microgramos de glucosa que contiene 1 ml de cada uno de los extractos, se exponen a continuación:

Cromatograma	Banda	Microlitros de la disolución F-1	Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.
nº 1	A	60	3840	0,200	98
nº 1	B	90	5760	0,305	137

Como se conocen las cantidades de pulpa extraída y de glucosa correspondientes a 1 ml de extracto, se calculan los porcentajes de glucosa en cada uno de los extractos, expresados en tantos por ciento.

Cromatograma	Banda	Porcentaje % (glucosa)
nº 1	A	2,55
nº 1	B	2,38
<u>Valor medio</u>		<u>2,47</u>

b) Análisis de fructosa.- El proceso que se sigue es análogo al indicado anteriormente en el análisis de glucosa.

Los resultados se exponen a continuación:

Cromatograma.	Banda	Microlitros de disolución F-1.	Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.	Absorbancia.	Microgramos de fructosa en 1 ml.
nº 1	A	60	7680	0,275	83
nº 1	B	90	11520	0,435	128

Los porcentajes de fructosa en los dos extractos, expresados en tantos por ciento, son los siguientes:

Cromatograma	Banda	Porcentaje % (fructosa)
nº 1	A	1,08
nº 1	B	1,11
<u>Valor medio</u>		<u>1,10</u>

c) Análisis de sacarosa.- Las dos bandas que se cortan del cromatograma nº 2 se extraen con etanol-agua del 70% (apartado V.2.6.2.), los extractos se evaporan a sequedad, y se llevan a un volumen de 5 ml con agua destilada, determinándose la sacarosa mediante el método de la antrona-sulfúrico. Los valores medidos de absorbancia se llevan a la curva de calibrado de la sacarosa (figura 11), conociéndose así las cantidades de sacarosa existentes en 1 ml de cada uno de los extractos analizados.

Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

Cromatograma.	Banda	Microlitros de disolución F-2.	Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.	Absorbancia	Microgramo de sacarosa en 1 ml.
nº 2	A	300	76800	0,350	129
nº 2	B	450	115200	0,520	204

Los porcentajes de sacarosa, expresados en tantos por ciento, son los siguientes:

Cromatograma	Banda	Porcentaje % (Sacarosa)
nº 2	A	0,17
nº 2	B	0,18
<u>Valor medio</u>		<u>0,18</u>

3.2. Muestra G.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 18-11-1977.

La disolución acuosa de los extractos se ha purificado por defecación con acetato neutro de plomo y paso por resinas como se ha indicado en los apartados III.2.3.1. y III.2.3.2.

Para colocar la muestra G en los cromatogramas -- utilizados en la determinación cuantitativa de glucosa, -

fructosa y sacarosa en dicha muestra, se ha empleado la disolución G-1, que se prepara de la siguiente forma: se concentra en rotavapor a pequeño volumen una fracción alícuota del extracto acuoso que corresponde a 25 g de pulpa extraída, se lleva a un matraz aforado de 10 ml y se enrasa con agua destilada.

Como en la muestra F, se han utilizado dos cromatogramas, uno en la determinación de glucosa y fructosa y el otro en el análisis de sacarosa.

Cromatograma nº 1.- Se emplea en el análisis de -- glucosa y fructosa y se prepara de la siguiente forma: en cada uno de los puntos a de la banda A se colocan 10 μ l - de la disolución G-1 y en cada uno de los puntos b de la - banda B se colocan 20 μ l de la disolución G-1. De esta manera quedan en la línea base de las bandas A y B los azúcares correspondientes a un total de 75 y 150 mg de pulpa extraída respectivamente.

Cromatograma nº 2.- Se utiliza en el análisis de - sacarosa y se prepara como se indica a continuación: se colocan en ~~cada uno de los puntos a 80 μ l de la disolución -~~ G-1 y en cada uno de los puntos b, 120 μ l de la disolución G-1; quedando por lo tanto en la base de las bandas A y B los azúcares correspondientes a 600 y 900 mg de pulpa extraída respectivamente.

Los dos cromatogramas se desarrollan según lo indicado en el apartado V.2.6.1.

A continuación se procede de la misma forma que con la muestra F (apartado V.3.1.).

Los distintos detalles de las determinaciones efectuadas se exponen a continuación.

a) Análisis de glucosa:

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Microlitros de disolución G-1.</u>	<u>Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.</u>	<u>Absorbancia.</u>	<u>Microgramos de glucosa en 1 ml.</u>
---------------------	--------------	---------------------------------------	-----------------------------------------------	---------------------	----------------------------------------

nº 1	A	30	7500	0,350	154
nº 1	B	60	15000	0,760	307

Los porcentajes de glucosa en cada uno de los extractos, expresados en tantos por ciento, son los siguientes:

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Porcentaje % (glucosa)</u>
nº 1	A	2,05
nº 1	B	2,05
<u>Valor medio</u>		<u>2,05</u>

b) Análisis de fructosa:

<u>Cromatograma.</u>	<u>Banda</u>	<u>Microlitros de disolución G-1</u>	<u>Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.</u>	<u>Absorbancia.</u>	<u>Microgramos de fructosa en 1 ml.</u>
----------------------	--------------	--------------------------------------	-----------------------------------------------	---------------------	-----------------------------------------

nº 1	A	30	15000	0,215	66
nº 1	B	60	30000	0,445	131

Los porcentajes de fructosa en cada uno de los extractos, son los siguientes:

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Porcentaje % (fructosa)</u>
nº 1	A	0,44
nº 1	B	0,44
<u>Valor medio</u>		<u>0,44</u>

c) Análisis de sacarosa: Las dos bandas que se cortan del cromatograma nº 2, se extraen con etanol-agua del 70%, -- conforme a lo indicado en el apartado V.2.6.2. Los extractos se concentran a sequedad, y se llevan a un volumen de 5 ml, determinándose la sacarosa mediante el método colorimétrico de la antrona-sulfúrico. Los valores medidos de absorbancia se llevan a la curva de calibrado de la sacarosa (figura 11) y de esta forma se conocen las cantidades de sacarosa existentes en 1 ml de cada uno de los extractos analizados.

Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

<u>Cromatograma.</u>	<u>Banda</u>	<u>Microlitros de disolución G-1.</u>	<u>Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.</u>	<u>Absorbancia</u>	<u>Microgramos de sacarosa en 1 ml.</u>
nº 2	A	240	120000	0,390	147
nº 2	B	360	180000	0,580	231

Los porcentajes de sacarosa, expresados en tantos por ciento, son los siguientes:

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Porcentaje % (sacarosa)</u>
nº 2	A	0,12
nº 2	B	0,13
	<u>Valor medio</u>	<u>0,13</u>

3.3. Muestra I.

Variedad: "gordal".

Fecha de la toma de muestra: 20-9-1977

La estabilización y extracción se ha realizado como se indica en el apartado II.2.2.

La disolución acuosa de los extractos se ha purificado por tratamiento con resinas de intercambio iónico seguido de defecación con acetato neutro de plomo, como se indica en los apartados III.2.3.1. y III.2.3.2.

A partir del líquido acuoso, desionizado y defecado, se preparan dos disoluciones.

La disolución I-1 se prepara concentrando a pequeño volumen una fracción alícuota del extracto acuoso, que corresponde a 11,84 g de pulpa extraída, llevándola a un matraz aforado de 10 ml y enrasando a continuación con -- agua destilada.

La disolución I-2 se prepara de la misma forma -- que la I-1, pero el volumen final es de 5 ml en lugar de 10 ml.

La disolución I-1 se emplea en el análisis de glucosa y fructosa y la disolución I-2 en el de la sacarosa.

Como se ha indicado en los apartados anteriores -- se usan dos cromatogramas, uno para la determinación cuantitativa de glucosa y fructosa y el otro para la determinación de sacarosa. A continuación se describe la preparación de dichos cromatogramas:

Cromatograma nº 1.- En cada uno de los puntos a -- de la banda A se colocan 10 μ l de la disolución I-1 y en cada uno de los puntos b de la banda B se colocan 20 μ l de la disolución I-1; quedando en la línea base de las -- bandas A y B los azúcares correspondientes a un total de 35520 y 71040 microgramos de pulpa extraída respectivamente.

Cromatograma nº 2.- Se colocan en cada uno de los puntos a 40 μ l de la disolución I-2 y en cada uno de los puntos b, 60 μ l de la disolución I-2; quedando por lo tanto en la base de las bandas A y B los azúcares correspondientes a 284160 y 426240 microgramos de pulpa extraída -- respectivamente.

El proceso que se sigue a continuación es análogo al indicado para las muestras F y G.

Los resultados obtenidos, han sido los siguientes:

a) Análisis de glucosa.

Cromato grama.	Banda	Microlitros de disolu- ción I-1.	Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.
-------------------	-------	----------------------------------------	-------------------------------------------------	-------------	---------------------------------------

nº 1	A	30	3552	0,250	116
nº 1	B	60	7104	0,545	227

Los porcentajes de glucosa, expresados en tantos por ciento, son los siguientes:

Cromatograma	Banda	Porcentaje % (glucosa)
nº 1	A	3,26
nº 1	B	3,20
<u>Valor medio</u>		<u>3,23</u>

b) Análisis de fructosa:

Cromato grama	Banda	Microlitros de disolu- ción I-1.	Microgramos de pulpa extraída en 1 ml.	Absorban cia.	Microgramos de fructosa en 1 ml.
------------------	-------	----------------------------------------	-------------------------------------------------	------------------	----------------------------------------

nº 1	A	30	7104	0,150	47
nº 1	B	60	14208	0,280	84

Los porcentajes de fructosa en cada uno de los extractos, son los siguientes:

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Porcentaje % (glucosa)</u>
nº 1	A	0,66
nº 1	B	0,59
<u>Valor medio</u>		<u>0,63</u>

c) Análisis de sacarosa:

<u>Cromato</u> <u>grama.</u>	<u>Banda</u>	<u>Microlitros</u> <u>de disolu-</u> <u>ción I-2.</u>	<u>Microgramos</u> <u>de pulpa</u> <u>extraída en</u> <u>1 ml.</u>	<u>Absorban</u> <u>cia.</u>	<u>Microgramos</u> <u>de sacarosa</u> <u>en 1 ml.</u>
nº 2	A	120	56800	0,325	118
nº 2	B	180	85248	0,460	178

Los porcentajes de sacarosa, en tantos por ciento, se exponen a continuación:

<u>Cromatograma</u>	<u>Banda</u>	<u>Porcentaje % (sacarosa)</u>
nº 2	A	0,21
nº 2	B	0,21
<u>Valor medio</u>		<u>0,21</u>

3.4. Resumen

En la tabla XXIII se exponen los porcentajes - en tantos por ciento de pulpa fresca de glucosa, fructosa y sacarosa en las tres muestras analizadas.

A partir de estos valores se calculan los porcentajes de azúcares reductores (glucosa y fructosa), azúcares totales (glucosa, fructosa y sacarosa) y las relaciones: azúcares reductores/azúcares totales y fructosa/azúcares reductores; que también se exponen en la tabla XXIII.

En el apartado VIII.2 se hace un estudio comparado de los resultados obtenidos en la cromatografía sobre papel con los encontrados por los otros procedimientos.

Tabla XXIII

<u>Muestra</u>	<u>Glucosa</u>	<u>Fructosa</u>	<u>Sacarosa</u>	<u>Azúcares re- ductores</u>	<u>Azúcares totales</u>	<u>Azúcares reductores</u>	<u>Fructosa</u>
						<u>Azúcares totales</u>	<u>Az. reduc.</u>
Muestra F	2,47	1,10	0,18	3,57	3,75	0,95	0,31
Muestra G	2,05	0,44	0,13	2,49	2,62	0,95	0,18
Muestra I	3,23	0,63	0,21	3,86	4,07	0,95	0,16

VI. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA, FRUCTOSA,
SACAROSA Y MANITOL EN LA PULPA.

METODO DE LA CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO (1)

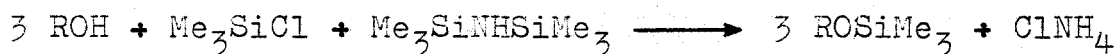
(1) En la realización de este apartado han colaborado los Licenciados D^a Teresa Pérez Romero y D. Antonio Gil Serrano.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Desde que los carbohidratos se pueden convertir -- fácil y cuantitativamente en derivados volátiles, que son rápidamente analizados por cromatografía gas-líquido, el uso de esta técnica ha tenido gran difusión en el análisis de mezclas complejas de azúcares.

Los derivados más frecuentemente empleados son -- los acetatos de alditol (63) y los trimetilsilil (TMS) -- éteres (64).

Sweeley y col. (64,65) introducen la trimetilsililación con hexametildisilazano y trimetilclorosilano en piridina según:



La reacción ocurre a temperatura ambiente y se -- completa en pocos minutos.

Con posterioridad al trabajo de Sweeley se han escrito varias monografías sobre el tema, destacando las de Bishop (66) y Sloneker (67).

También se han descrito diversos procedimientos -- para la trimetilsililación de carbohidratos, que incluyen modificaciones de los reactivos empleados por Sweeley --- (65) sin tener que emplear muestras secas. Brobst y Lott (68), emplean ácido trifluoracético como catalizador en -- lugar de trimetilclorosilano, lo que permite el uso de -- cantidades moderadas de agua.

Davison y Young (69) recomiendan la eliminación del agua de las muestras mediante evaporaciones con benceno que forma azeótropo con el agua y el empleo de exceso de reactivos. Aplican este procedimiento a la determinación cuantitativa de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en distintos extractos de plantas.

La precisión del método se discute en diversos trabajos (68,69,70,71). Normalmente el error que se comete, para cada uno de los componentes a separar de la mezcla, es menor del 5%.

2. MATERIAL Y METODOS

En este capítulo se estudia la determinación cuantitativa de los azúcares solubles, glucosa, fructosa, sacarosa y del manitol en los extractos de pulpa de aceitunas mediante la cromatografía gas-líquido.

2.1. Aceitunas

Las muestras utilizadas en estas determinaciones fueron recogidas en olivares de la provincia de Sevilla.

Muestras de "manzanilla":

Muestra H (10-8-1978)

Muestra J (20-11-1978)

Muestra de "gordal":

Muestra K (20-11-1978)

Muestra de "hojiblanca":

Muestra L (20-12-1978)

Muestra de "verdial":

Muestra LL (20-12-1978)

2.2. Extracción de mono y oligosacáridos

Se ha realizado de manera similar a como ya se ha indicado en el apartado II.2.2.

2.3. Tratamiento de purificación previo a las determinaciones cuantitativas

En la defecación de las muestras se ha seguido el procedimiento indicado en el apartado III.2.3.1.

El tratamiento de desionización de las muestras con resinas de intercambio iónico es análogo al descrito en el apartado III.2.3.2.

2.4. Método

Se sigue con algunas modificaciones el procedimiento de Davison y Young (69).

Las muestras que se van a determinar cuantitativamente por este método se analizan cualitativamente por cromatografía gas-líquido, detectándose glucosa, fructosa, sacarosa y manitol. El pico de esta última sustancia aparece entre los correspondientes a los anómeros α y β de la glucosa.

La presencia del manitol nos obliga a efectuar las determinaciones analíticas a temperatura constante.

De esta forma se puede conseguir una buena separación del pico del manitol de los otros dos correspondientes a los anómeros de la glucosa.

Se ha observado que aunque las condiciones cromatográficas se mantengan fijas, los tiempos de retención de las sustancias varían de un cromatograma a otro. Sin embargo, la relación entre el tiempo de retención de las distintas sustancias y el tiempo de retención del patrón interno se mantiene constante.

El uso de la temperatura programada produce una mayor variación en los tiempos de retención, lo cual nos obliga a introducir en el computador los factores de respuesta del detector para cada una de las sustancias analizadas, antes de cada determinación, disminuyendo la sencillez del método.

En resumen, el método que se sigue en la determinación cuantitativa de glucosa, fructosa, sacarosa y manitol en extractos de pulpa de aceitunas, consiste en la formación de los trimetilsilil derivados empleando el procedimiento de Davison y Young (69) y en la separación de dichos derivados utilizando condiciones isotérmicas de temperatura.

En primer lugar, se realiza la determinación de glucosa, fructosa y manitol; empleando inositol como patrón interno. Después se procede a la determinación de la sacarosa, siendo la trehalosa, el patrón interno elegido.

2.4.1. Procedimiento

Se sigue el procedimiento de Davison y Young, que se expone a continuación:

Los azúcares y el patrón interno (300-400 mg) se disuelven en 25 ml de agua y se dejan estar una noche. Se toma 1 ml de la disolución y se concentra a sequedad en rotavapor, adicionando benceno para que forme azeótropo con el agua. El residuo se disuelve en piridina y se le añade hexametildisilazano (0,3 ml) y a continuación trimetilclorosilano (0,3 ml). Se agita durante 5 minutos y se lleva a sequedad, se adiciona tetracloruro de carbono y se vuelve a concentrar. Esta operación se repite 4 ó 5 veces.

Por último, se adiciona de nuevo tetracloruro de carbono y, una vez que se elimina el sólido que sobrenada en la disolución, esta se puede inyectar en el cromatógrafo.

2.4.2. Instrumentación y condiciones cromatográficas.

Se ha utilizado un cromatógrafo Perkin-Elmer, --- Franktometer F-7, de ionización a la llama, equipado con un registrador-integrador Hewlett-Packard 3380 A (dotado de computador).

Se ha usado una columna de 183 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno con UCW-98 al 8% sobre Chromosorb W, AW-DMCS 80-100 mesh, condicionada 24 horas a 280 °. El

gas portador utilizado es N_2 con un flujo de 30 ml/min.

En la determinación de glucosa, fructosa y manitol, la temperatura de la columna se mantuvo a 170° , siendo las temperaturas del bloque de inyección y del detector, 240° y 270° respectivamente.

En el análisis de la sacarosa, la temperatura de la columna fué de 230° y las de los bloques de inyección y detección fueron de 260° y 300° .

2.4.3. Análisis previo

Antes de realizar la determinación cuantitativa de las muestras de aceituna, se han identificado los componentes de una de ellas por cromatografía gas-líquido.

Este estudio se descompone en dos partes:

a) Identificación de glucosa, fructosa y manitol: La muestra J-3-1 se somete al procedimiento general de formación de trimetilsilil derivados tal como se indica en el apartado VI.2.4.1. Se inyecta en el cromatógrafo a una temperatura de 170° y aparecen cuatro picos que se identifican por sus tiempos de retención con los que producen la glucosa (2 picos), la fructosa (1 pico) y el manitol (1 pico).

La mezcla de referencia ha sido preparada con productos comerciales que han sido secados previamente con pentóxido de fósforo y que ha sido sometida al procedimiento general de sililación.

Las condiciones cromatográficas han sido las mismas para las dos determinaciones.

Los dos cromatogramas obtenidos se pueden comparar en la figura 12.

b) Identificación de sacarosa: De la misma forma se procede a identificar la sacarosa. Para ello, se inyecta el trimethylsilyl derivado de la muestra J-3-2 a la temperatura de 230°, apareciendo un pico que se identifica con el que produce la sacarosa de referencia.

Los dos cromatogramas que resultan se comparan en la figura 13.

Las condiciones cromatográficas han sido las mismas en los dos análisis efectuados.

2.4.4. Calibrado

Los tiempos de retención, así como las áreas de los picos de los derivados (TMS) de las sustancias analizadas, se miden con un integrador electrónico.

De los distintos sistemas existentes para calcular los resultados cromatográficos, el método adecuado es el del patrón interno. A la muestra que se analiza se le añade el patrón interno, que además de servir para calcular exactamente los porcentajes, reduce errores por compensación de las pequeñas variaciones de la operación de la columna, ya que el patrón interno y la muestra están influenciados en el mismo grado.

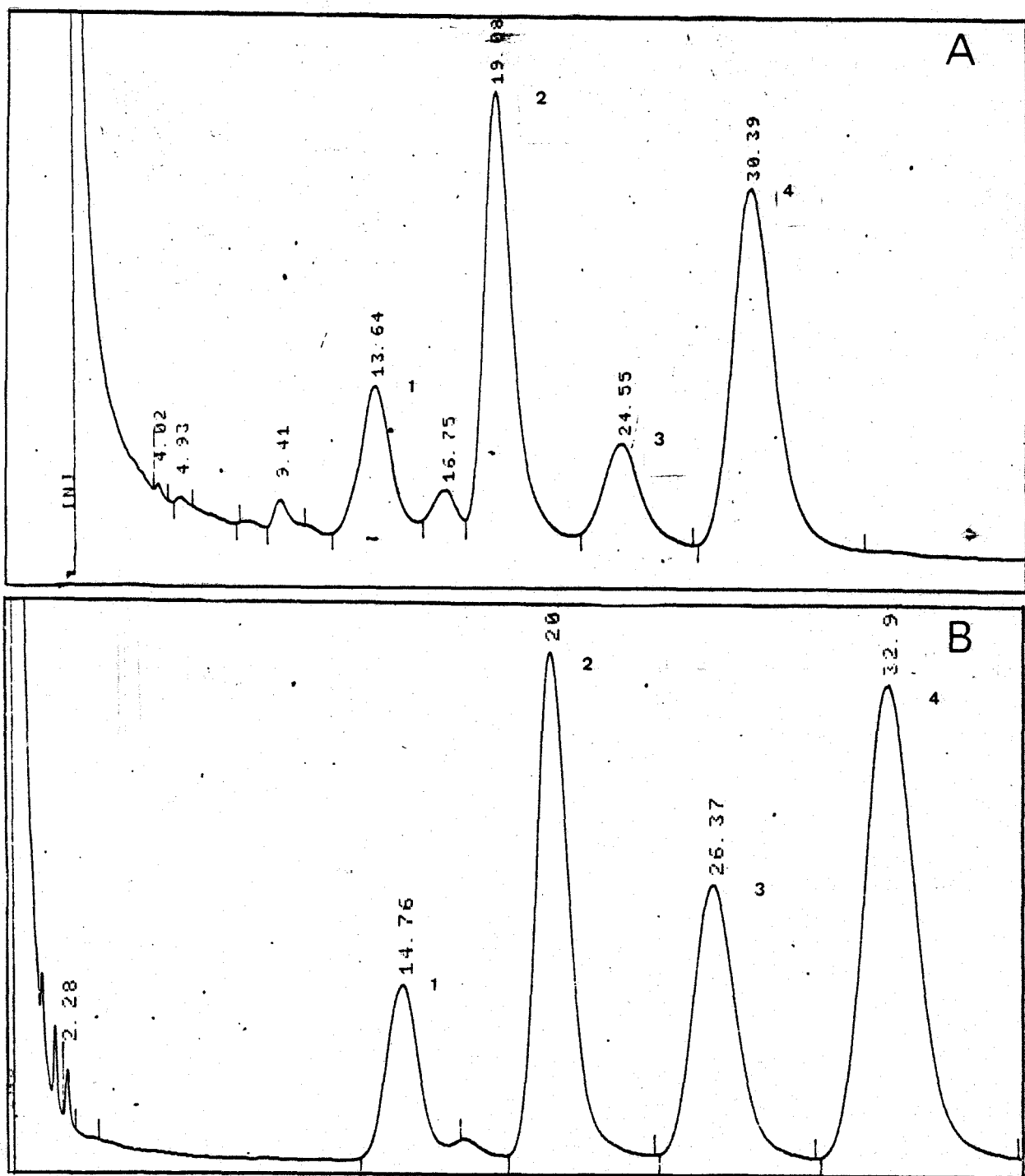


Fig. 12. Cromatograma gás-líquido de los TMS derivados: A) Muestra J-3-1 (variedad "manzanilla"). B) Mezcla de azúcares comerciales, 1, fructosa; 2, glucosa- α ; 3, manitol; 4, glucosa- β . Se utilizó una columna de 183 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno con UCW-98 al 8% sobre Chromosorb W. La temperatura era de 170 $^{\circ}$.

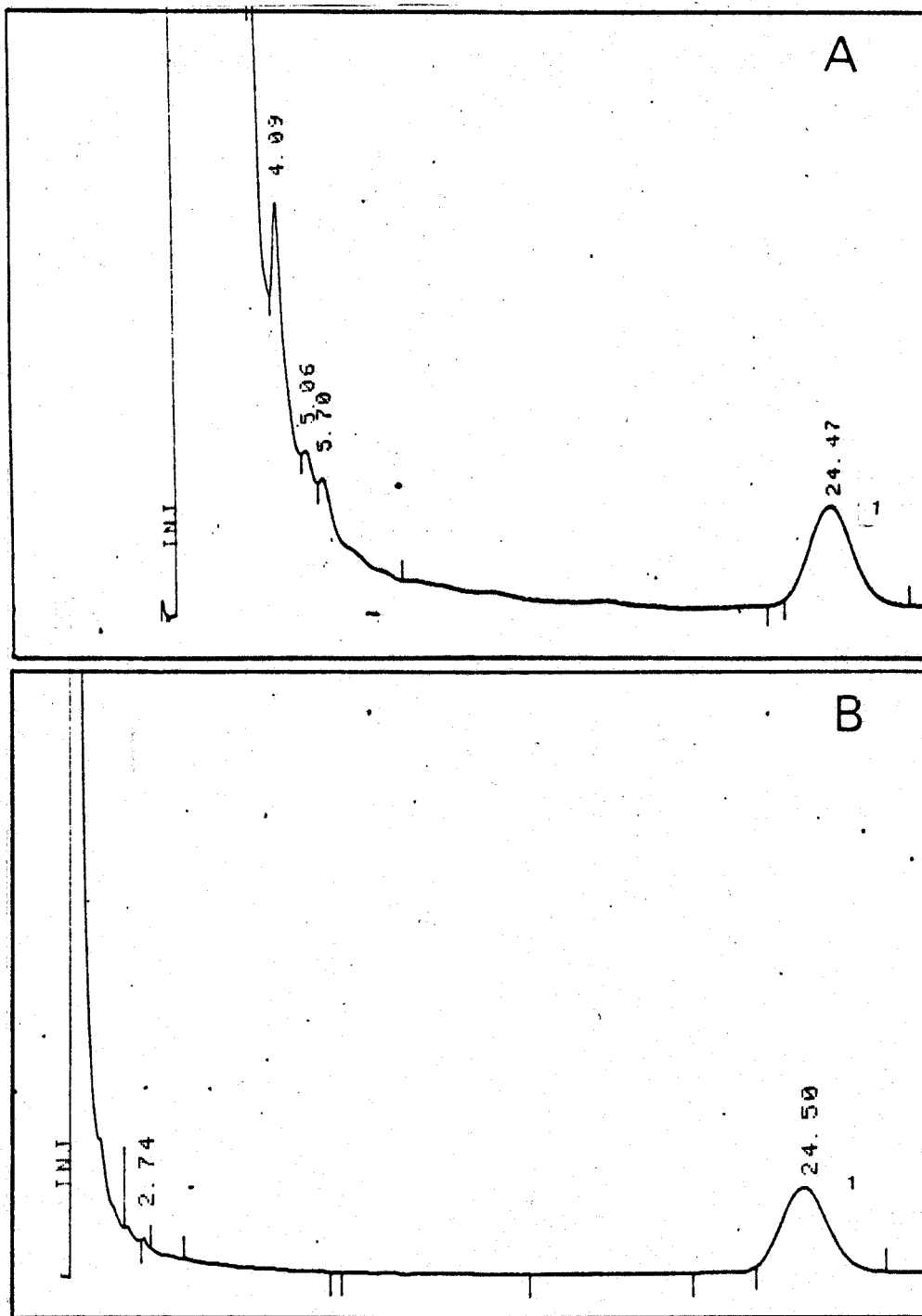


Fig. 13. Cromatogramas gas-líquido de los TMS derivados:
 A) Muestra J-3-2 (variedad "manzanilla"). B) Muestra de referencia. 1, sacarosa. Se utilizó una columna de 183 cm -
 de longitud y 3 mm de diámetro interno con UCW-98 al 8% -
 sobre Chromosorb W. La temperatura era de 250°.

El calibrado con patrón interno se lleva a cabo -- añadiendo una cantidad pesada o medida del mismo a una -- cantidad determinada de mezcla que contenga cantidades co -- nocidas de los componentes a analizar.

La mezcla resultante, después de someterse al pro -- cedimiento de formación del TMS derivado que se indica en el apartado VI.2.4.1., se inyecta en el cromatógrafo y se desarrolla el cromatograma. Se informa al computador de -- las cantidades de cada uno de los componentes analizados (incluida la del patrón interno) y este nos suministra -- los factores de respuesta del detector para cada una de -- las sustancias analizadas.

Cuando se quiere realizar la determinación cuanti -- tativa de los componentes de la muestra, esta se desarro -- lla y el computador, una vez conocido los factores de res -- puesta y la cantidad de patrón interno, nos proporciona -- las cantidades de cada una de las sustancias presentes en dicha muestra.

El proceso de cálculo de los factores de respues -- ta y comprobación del método empleado, se aplica indepen -- dientemente, por un lado al estudio de glucosa, fructosa y manitol; por otro lado al estudio de la sacarosa. Ambos se indican a continuación:

a) Estudio de glucosa, fructosa y manitol.

Para la realización de estas determinaciones se -- utiliza inositol como patrón interno, según indican Davi -- son y Young en su trabajo (69).

Se prepara una referencia que contiene cantidades conocidas de las tres sustancias y de inositol. Se forma el trimetilsilil (TMS) derivado que se inyecta en el cromatógrafo, previa filtración para evitar introducir alguna impureza en la columna que pueda afectar a la determinación.

Se hicieron varias pruebas a distintas temperaturas hasta conseguir un buen desarrollo del cromatograma, lo cual se logró a 170°. Se procede a la calibración informando al computador de las cantidades que cada componente tiene en la muestra, y este nos proporciona los factores de respuesta del detector para cada uno de los picos. Debido a que la glucosa presenta un pico para cada anómero (α y β), la cantidad total de este monosacárido es la suma de las que corresponden proporcionalmente a la glucosa α y β .

La comprobación del método se realiza aplicando los factores de respuesta anteriormente calculados, a nuevas muestras de referencia. Los análisis se dieron por terminados cuando se consiguieron determinaciones con un error menor del 5%, aunque en algunos casos la fructosa y el manitol (componentes minoritarios) presentaron un error algo superior al anteriormente indicado.

b) Estudio de la sacarosa:

Un procedimiento análogo se ha realizado para la determinación de sacarosa, sólo que ahora no se utiliza inositol como patrón interno.

El no poder emplear inositol se debe a lo siguiente:

Cuando las condiciones cromatográficas son las apropiadas para la separación de los picos correspondientes a la fructosa, glucosa y manitol, el pico de la sacarosa es achatado y pequeño. Esto se debe a que dicho pico en estas condiciones tiene un tiempo de retención muy alto y también a la pequeña proporción en que se encuentra la sacarosa en las muestras analizadas.

Al emplear temperaturas más elevadas con el fin de disminuir el tiempo de retención de la sacarosa, los picos de las otras sustancias analizadas no se separan entre sí, ni tampoco del pico correspondiente al inositol.

En consecuencia, hubo que probar con diversos azúcares de tiempo de retención superior al del inositol y elegir el más conveniente para este tipo de determinación.

Los tres azúcares que se escogieron para su posible utilización como patrón interno fueron: maltosa, melibiosa y trehalosa. Se prepararon sus correspondientes TMS derivados que se inyectaron, obteniéndose los cromatogramas que se representan en la figura 14.

Como se puede observar, tanto la maltosa como la melibiosa presentan más de un pico, lo cual implica los siguientes inconvenientes:

- 1.- La cantidad total de patrón interno no puede referirse a un único pico y por lo tanto no se pueden --

realizar las determinaciones cuantitativas.

2.- Cabe la posibilidad de solapación de algunos de los picos del patrón interno con el de la sacarosa.

Esto hizo que se empleara como patrón interno la trehalosa. Esta sustancia presenta un sólo pico cuyo tiempo de retención es superior al de la sacarosa, lo cual -- permite la separación entre ambas (figura 14).

Una vez elegido el patrón interno adecuado, se -- procede a la preparación de una muestra que contiene cantidades conocidas de sacarosa y trehalosa, a partir de la cual se calculan los factores de respuesta del detector -- que luego se emplean en el estudio de las muestras proble_{mas}. Se prepara el correspondiente derivado y se inyecta siendo las condiciones de trabajo: temperatura de la co-- lumna, 230° ; temperatura del bloque de inyección, 260° ; temperatura del detector, 300° ; y el flujo de gas portador (N₂) de 30 ml/min.

Los factores de respuestas obtenidos se aplican a dos nuevas disoluciones de referencia que contienen canti_{dades} conocidas de sacarosa y trehalosa.

Los análisis finalizaron cuando el error cometido en las determinaciones era inferior al 5%.

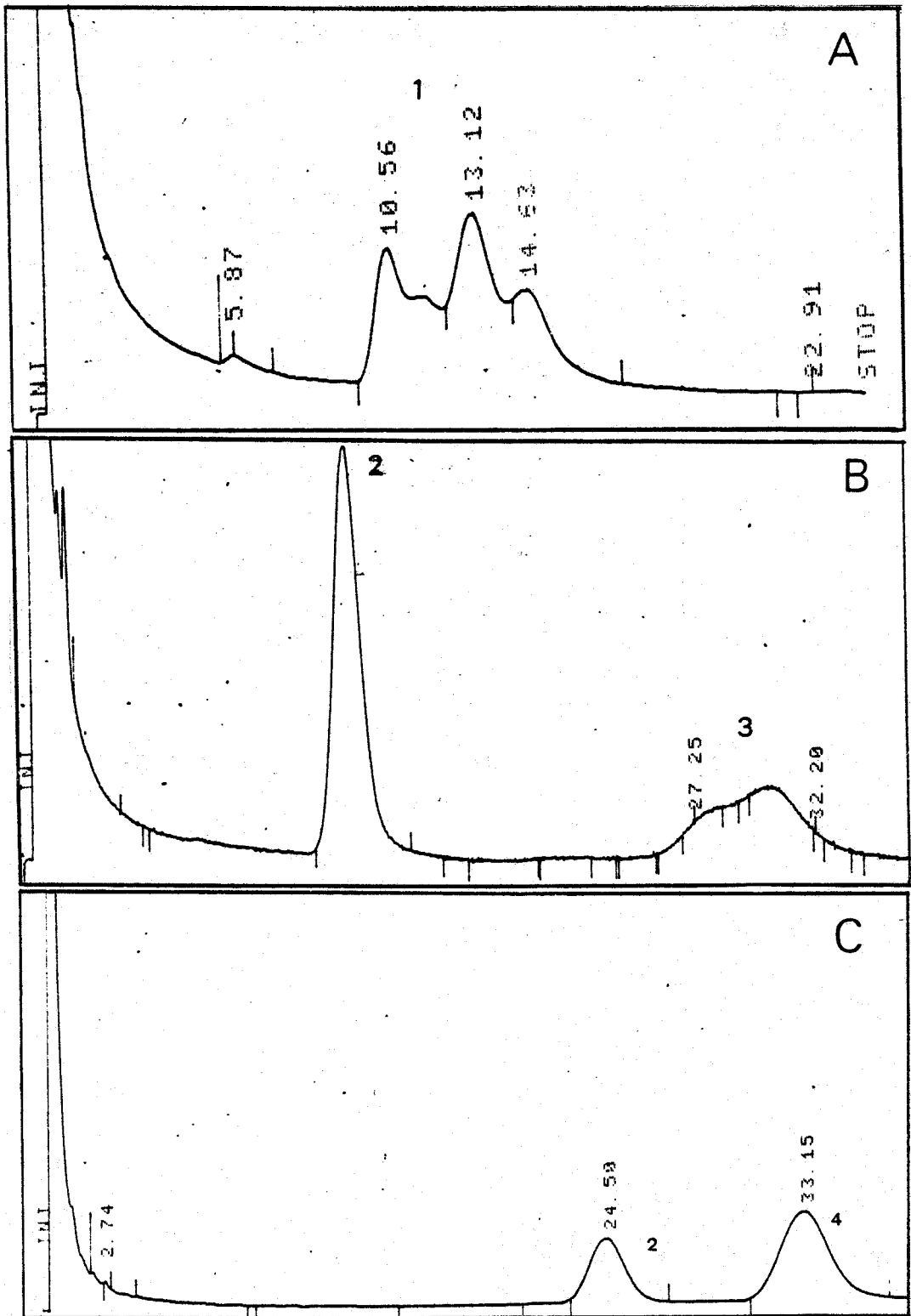


Fig. 14. Cromatogramas gas-líquido de los TMS derivados de las referencias. 1, maltosa; 2, sacarosa; 3, melibiosa; 4, trehalosa. Se utilizó una columna de 183 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno con UCW-98 al 8% sobre Chromosorb W. Las temperaturas empleadas fueron: A) 250°C; B) 240°C; C) 230°C.

3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

Tras haber sometido las muestras a los distintos procesos de estabilización y purificación, se realiza la determinación cuantitativa de los hidratos de carbono ya considerados.

Se preparan los trimetilsililderivados de cada muestra siguiendo el método de Davison y Young (69) indicado en el apartado VI.2.4.1. Se inyectan en el cromatógrafo, habiendo oscilado los volúmenes de inyección entre 0,4 y 1,5 microlitros.

Los cromatogramas se han realizado con una atenuación de 1 x 16, siendo la velocidad de la carta de 0,5 cm/min.

Se han empleado dos disoluciones de inositol y una de trehalosa. Las de inositol contenían 40 y 50 mg de dicha sustancia en 25 ml de agua destilada. La de trehalosa contenía 50 mg de dicha sustancia en 25 ml de agua.

Las condiciones específicas para la determinación de glucosa, fructosa y manitol, por un lado y de sacarosa por otro, se han indicado anteriormente en el apartado 2.4.4.

Los tiempos de retención relativos, es decir la relación T_r/T_r del patrón interno, permanecen constantes en todas las determinaciones realizadas; siendo los siguientes:

	<u>Tr/Tr inositol</u>	<u>Tr/Tr Trehalosa</u>
Fructosa	0,29	
Glucosa (α)	0,41	
Manitol	0,53	
Glucosa (β)	0,65	
Sacarosa		0,74

A continuación se describe el proceso seguido con cada una de las muestras y los resultados obtenidos.

3.1. Muestra H.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 10-8-1978

La estabilización y extracción se ha realizado como se indica en el apartado II.2.2.

Los extractos etanólicos procedentes de 50 g de pulpa fresca se evaporan en el rotavapor con el fin de --eliminar el etanol. El residuo se trata con agua como se indica en el apartado III.2.3 para pasar a disolución ---acuosa los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

El extracto acuoso que resulta se purifica, me---diante defecación con acetato neutro de plomo y paso por resinas de intercambio iónico Amberlita IR-120 y IR-45, según lo indicado en los apartados III.2.3.1 y III.2.3.2.

Se toma una fracción alícuota (25 ml) del extrac---to acuoso purificado correspondiente a 2,25 g de pulpa.

Se lleva a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con -- agua destilada.

A 20 ml de la disolución anterior, que correspon-- de a 450 mg, se le denomina muestra H-3 y ha sido utilizad-- da en la determinación cuantitativa de glucosa, fructosa y manitol.

A la muestra H-3 se le añade 2 ml de una disolu-- ción de inositol que contiene 5,7 mg de esta sustancia. -- Se deja estar una noche a temperatura ambiente y al día -- siguiente, se someten al procedimiento de formación de -- los trimetilsililderivados indicado en el apartado VI.2.4. 1.

El derivado se inyecta en el cromatógrafo y se -- realizan dos cromatogramas.

Cada azúcar presenta un pico cuyo área es propor-- cional a la cantidad de dicho azúcar en la muestra. Me--- diante el proceso de calibrado indicado en el apartado -- VI.2.4.4, se obtienen los factores de proporcionalidad -- existentes entre el área y la cantidad de los componentes a partir de mezclas de referencia que los contienen.

El integrador-computador, una vez que se le ha su-- ministrado dichos factores de respuesta para cada uno de los picos y la cantidad de inositol (patrón interno) que contiene la muestra, nos ofrece directamente las cantida-- des de los distintos componentes en la muestra analizada.

Los resultados han sido los siguientes:

<u>Muestra</u>	<u>Miligramos de pulpa extraída</u>	<u>Cromatograma</u>	<u>Miligramos de glucosa</u>	<u>Miligramos de fructosa</u>	<u>Miligramos de manitol</u>
H-3	450	nº 1	14,056	6,336	6,932
H-3	450	nº 2	12,709	5,661	5,753
Val.medio	450		13,383	5,999	6,343

<u>Compuesto</u>	<u>Porcentaje %</u>
Glucosa	2,97
Fructosa	1,33
Manitol	1,41

3.2. Muestra J

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 20-11-1978

La estabilización y extracción se ha realizado como se indica en el apartado II.2.2.

Los extractos etanólicos procedentes de 50 g de pulpa fresca se evaporan en el rotavapor con el fin de eliminar el etanol. El residuo se trata con agua como se indica en el apartado III.2.3 para pasar a disolución acuosa (500 ml) los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

Se toma una fracción (50 ml) de la disolución que resulta. En esta disolución cada ml corresponde a 100 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de esta fracción se le denomina muestra -- J-1-1 y corresponde a 400 mg de pulpa.

Como se indicó anteriormente quedaron 450 ml de - disolución acuosa que fueron a continuación defecadas con acetato neutro de plomo siguiendo lo expuesto en el apartado III.2.3.1.

De la disolución que resulta (250 ml), se toma -- una fracción de 25 ml y se lleva hasta un volumen de 50 ml con agua destilada. En esta disolución cada ml corresponde a 90 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de la fracción anterior se le denomina --- muestra J-2-1 y corresponde a 360 mg de pulpa.

De la disolución acuosa defecada quedan 225 ml, - que se pasan por resinas de intercambio iónico Amberlita IR-120 y IR-45 siguiendo lo indicado en el apartado III.2.3.2.

De la disolución que resulta (250 ml), se toma -- una fracción de 25 ml y se enrasa hasta 50 ml con agua -- destilada. En esta disolución cada ml corresponde a 81 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de la disolución anterior se le denomina - muestra J-3-1 y corresponde a 324 mg de pulpa.

El resto de la disolución (46 ml) se lleva hasta 50 ml con agua destilada. A 10 ml de esta disolución se le llama muestra J-3-2 y corresponde a 745,2 mg de pulpa.

a) Análisis de glucosa, fructosa y manitol.

A cada una de las muestras J-1-1, J-2-1 y J-3-1 se le añaden 2 ml de una disolución de inositol que contiene 2 mg de esta sustancia.

Las muestras y el patrón interno se dejan una noche a temperatura ambiente y al día siguiente se procede a la formación de los trimetilsililderivados siguiendo el procedimiento indicado en el apartado VI.2.4.1.

Una vez formado los derivados, se inyectan en el cromatógrafo. Por cada una de las muestras analizadas se desarrollan tres cromatogramas.

Como se ha indicado anteriormente, el computador después de haberle suministrado los factores de respuesta de los distintos picos y la cantidad de inositol presente en la mezcla, nos proporciona las cantidades de los distintos componentes presentes en dicha muestra.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla - XXIV.

b) Análisis de la sacarosa.

A la muestra J-3-2 se le añade 1 ml de la disolución de trehalosa que contiene 2 mg de esta sustancia.

Tabla XXIV

Muestra	Microgramos de pulpa extraída	Gramato-grama.	Miligramos de glucosa.	Miligramos de fructosa.	Miligramos de manitol.	Glucosa %	Fructosa %	Manitol %
J-1-1	400	nº 1	8,617	2,811	0,882			
J-1-1	400	nº 2	8,368	2,902	0,929			
J-1-1	400	nº 3	8,382	2,839	0,849			
Val.medio	400		8,456	2,851	0,887	2,11	0,71	0,22
J-2-1	360	nº 1	7,818	2,534	0,908			
J-2-1	360	nº 2	7,402	2,403	0,814			
J-2-1	360	nº 3	7,822	2,292	0,773			
Val.medio	360		7,681	2,410	0,832	2,13	0,67	0,23
J-3-1	324	nº 1	6,609	2,486	0,662			
J-3-1	324	nº 2	6,601	2,388	0,616			
J-3-1	324	nº 3	6,707	2,937	0,642			
Val medio	324		6,639	2,604	0,640	2,05	0,80	0,20

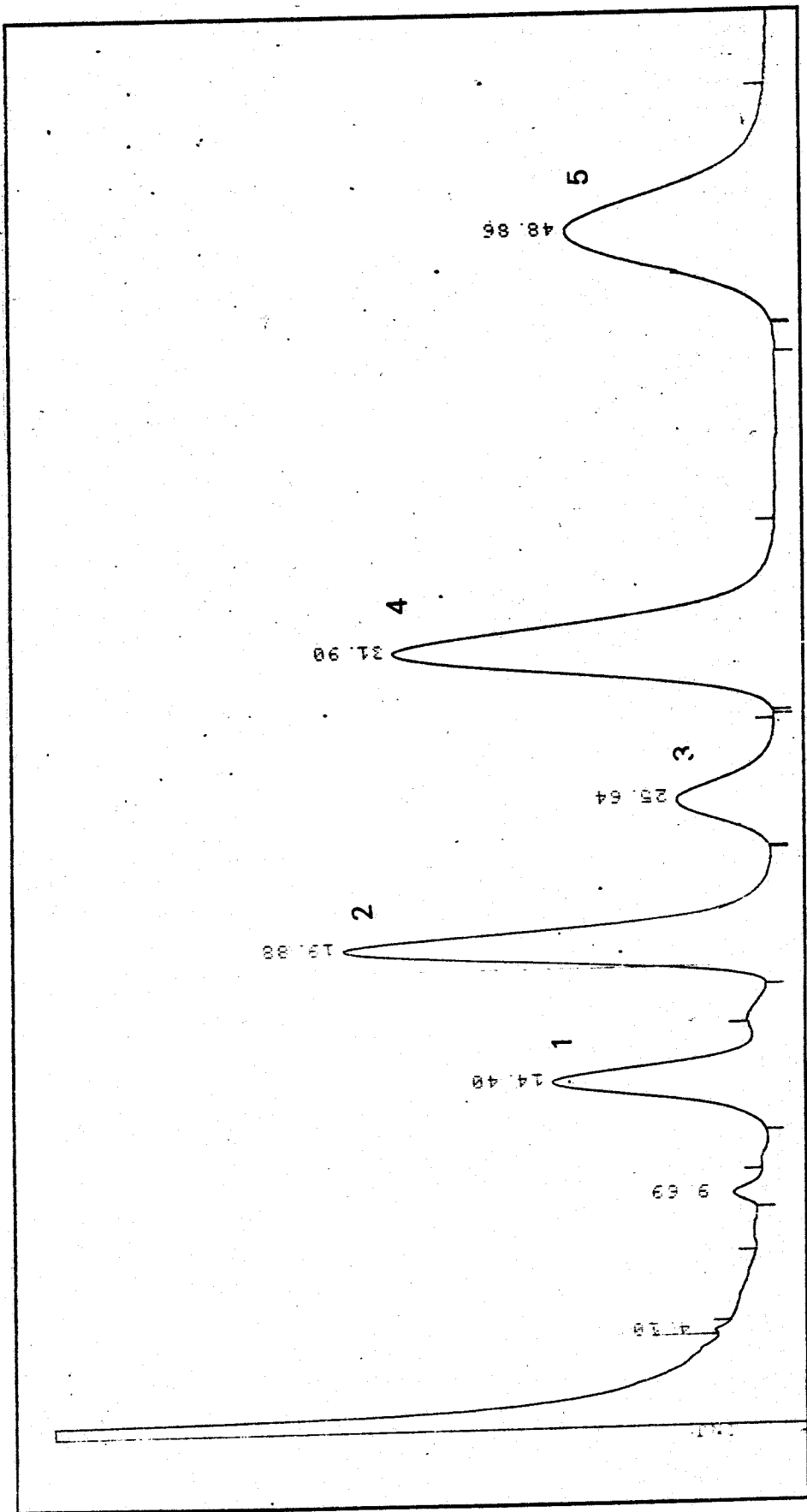


Fig. 15. Cromatograma gas-líquido de los TMS derivados de la muestra J-3-1 (variedad "manzanilla"). 1, fructosa; 2, glucosa- α ; 3, manitol; 4, glucosa- β ; 5, inositol -- (patrón interno). Se utilizó una columna de las características expuestas en la figura 12. La temperatura empleada fué de 170 $^{\circ}$.

Tabla XXV

<u>Muestra</u>	<u>Miligramos de pulpa extraída.</u>	<u>Cromatograma</u>	<u>Miligramos de Sacarosa</u>	<u>Sacarosa %</u>
J-3-2	745,2	nº 1	0,556	
J-3-2	745,2	nº 2	0,556	
J-3-2	745,2	nº 3	0,578	
Val.medio	745,2		0,563	0,08

Se procede de la misma forma que en el análisis - de la glucosa, fructosa y manitol.

Los resultados de esta determinación se exponen - en la tabla XXV.

3.3. Muestra K

Variedad: "gordal".

Fecha de la toma de muestra: 20-11-1978.

La estabilización y extracción se ha realizado co mo se indica en el apartado II.2.2.

Los extractos etanólicos procedentes de 50 g de - pulpa fresca se evaporan en el rotavapor con el fin de -- eliminar el etanol. El residuo se trata con agua como se indica en el apartado III.2.3 para pasar a disolución --- acuosa (500 ml) los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

Se toma una fracción (50 ml) de la disolución que resulta. En esta disolución cada ml corresponde a 100 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de esta fracción se le denomina muestra -- K-1-1 y corresponde a 400 mg de pulpa.

El resto de la disolución (46 ml) se enrasa hasta 50 ml con agua destilada. Se toman 10 ml, que es lo que - se denomina muestra K-1-2 y corresponde a 920 mg de pulpa.

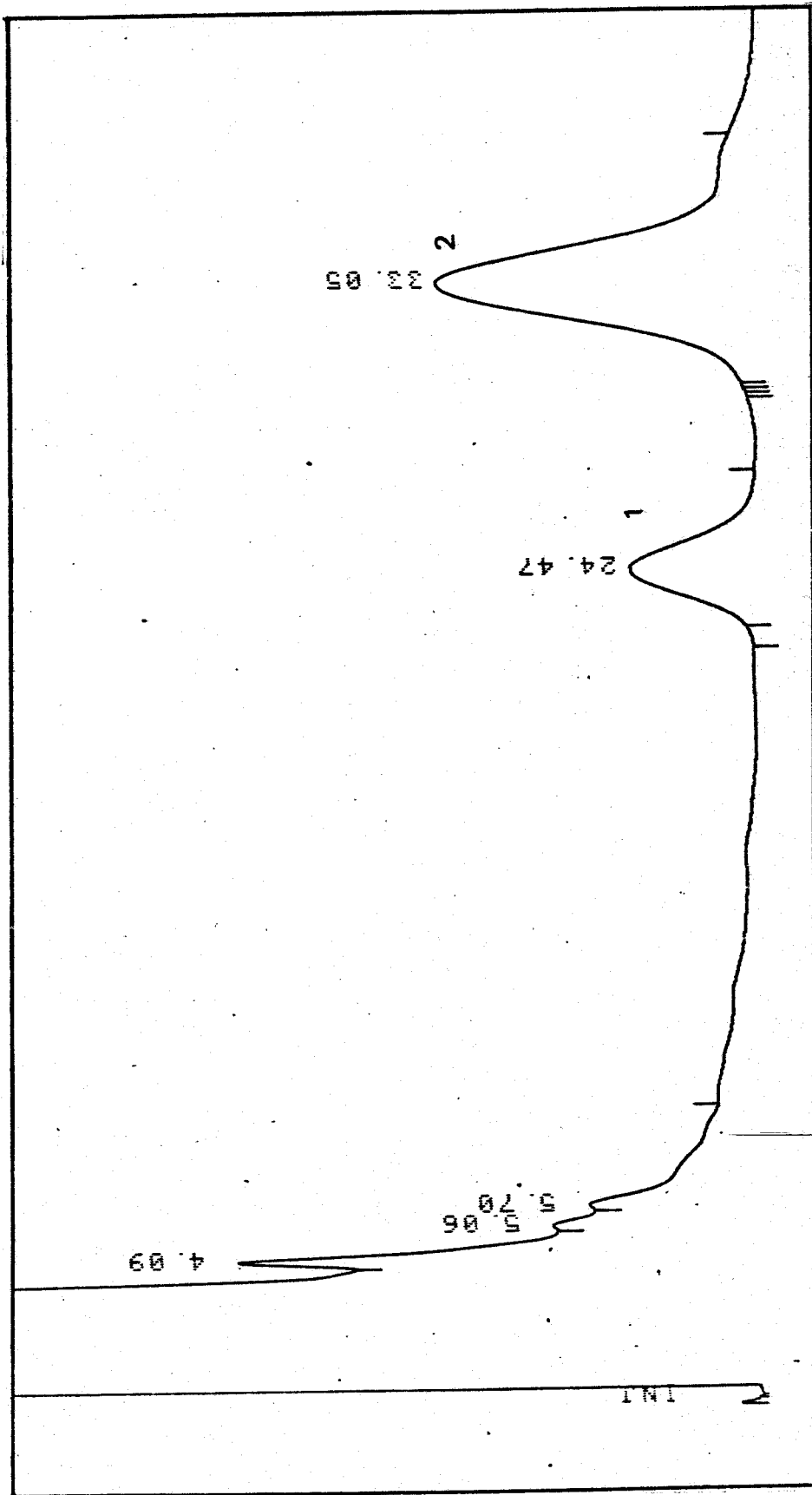


Fig. 16. Cromatograma gas-líquido de los TMS derivados de la muestra J-3-2 (variedad "manzanilla"). 1, sacarosa; 2, trehalosa (patrón interno). Las características de la columna han sido expuestas en la figura 13. Temperatura de la columna, 250°C.

Como se indicó anteriormente quedaron 450 ml de disolución acuosa que fueron a continuación defecadas con acetato neutro de plomo siguiendo lo indicado en el apartado III.2.3.1.

De la disolución que resulta (250 ml), se toma una fracción de 25 ml y se lleva hasta un volumen de 50 ml con agua destilada. En esta disolución cada ml corresponde a 90 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de la fracción anterior se le denomina muestra K-2-1 y corresponde a 360 mg de pulpa.

El resto de la disolución (46 ml) se enrasa a 50 ml con agua destilada. A 10 ml de esta disolución se le llama muestra K-2-2 y corresponde a 828 mg de pulpa.

De la disolución acuosa defecada quedan 225 ml, que se pasan por resinas de intercambio iónico Amberlita IR-120 y IR-45 siguiendo lo indicado en el apartado III.2.3.2.

De la disolución que resulta (250 ml), se toma una fracción de 25 ml y se enrasa hasta 50 ml con agua destilada. En esta disolución cada ml corresponde a 81 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de la disolución anterior se le denomina muestra K-3-1 y corresponde a 324 mg de pulpa.

El resto de la disolución (46 ml) se lleva hasta 50 ml con agua destilada. A 10 ml de esta disolución se le llama muestra K-3-2 y corresponde a 745,2 mg de pulpa.

a) Análisis de glucosa, fructosa y manitol:

A cada una de las muestras K-1-1, K-2-1 y K-3-1 - se le añaden 4, 3 y 3 ml de una disolución de inositol -- que contiene 6,4, 4,8 y 4,8 mg de esta sustancia respectivamente.

Las muestras y el patrón interno se dejan estar - una noche en disolución acuosa y al día siguiente se forman los trimetilsililderivados mediante el procedimiento que se indica en el apartado VI.2.4.1.

Se desarrollan tres cromatogramas por cada una de las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos en las determinaciones - realizadas se exponen en la tabla XXVI.

b) Análisis de sacarosa:

A cada una de las muestras K-1-2, K-2-2 y K-3-2 - se le añaden 1 ml de una disolución acuosa de trehalosa - que contiene 2 mg de esta sustancia.

Se procede de la misma forma que en el análisis - de la glucosa, fructosa y manitol.

Los resultados se recogen en la tabla XXVII.

Tabla XXVI

Muestra	Microgramos de pulpa extraída.	Cromato-grama.	Miligramos de glucosa.	Miligramos de Fructosa.	Miligramos de Manitol.	Glucosa %	Fructosa %	Manitol %
K-1-1	400	nº 1	6,257	0,411	0,638			
K-1-1	400	nº 2	6,534	0,437	0,711			
K-1-1	400	nº 3	6,359	0,435	0,503			
Val.medio	400		6,383	0,428	0,617	1,60	0,11	0,15
K-2-1	360	nº 1	5,804	0,417	0,392			
K-2-1	360	nº 2	5,761	0,375	0,368			
K-2-1	360	nº 3	5,791	0,407	0,351			
Val.medio	360		5,785	0,400	0,370	1,61	0,11	0,10
K-3-1	324	nº 1	5,143	0,448	0,298			
K-3-1	324	nº 2	5,304	0,443	0,314			
K-3-1	324	nº 3	5,237	0,465	0,306			
Val.medio	324		5,228	0,452	0,306	1,61	0,14	0,10

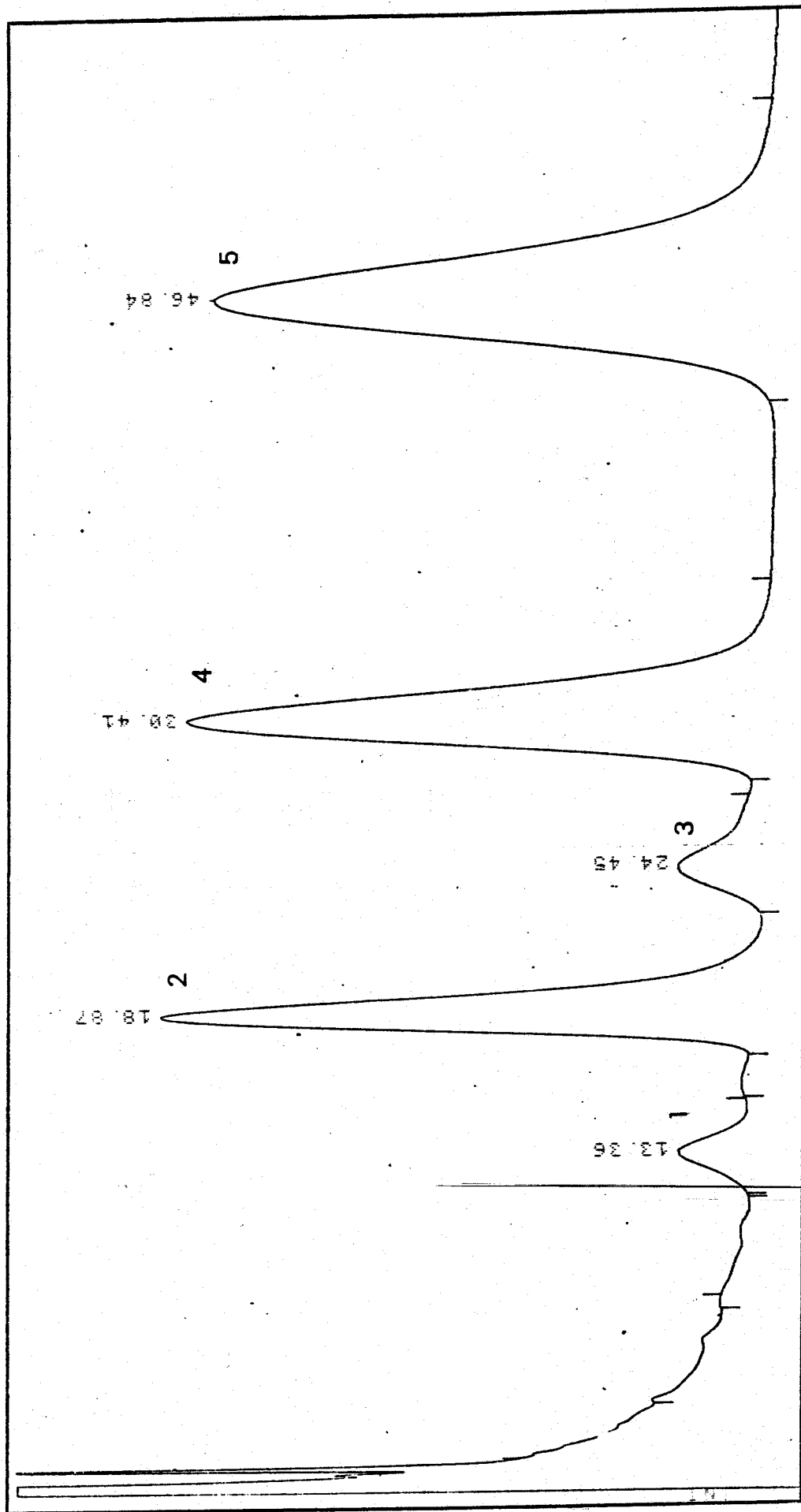


Fig. 17. Cromatograma gas-líquido de los TMS derivados de la muestra K-3-1 (variedad "gordal").
 1, fructosa; 2, glucosa- α ; 3, manitol; 4, glucosa- β ; 5, inositol (patrón interno). Se utilizó una columna de las características expuestas en la figura 12. La temperatura empleada fué -
 de 170°.

Tabla XVII

Muestra	Miligramos de pulpa extraída	Cromatograma	Miligramos de sacarosa.	Sacarosa %
K-1-2	920	nº 1	1,400	
K-1-2	920	nº 2	1,442	
K-1-2	920	nº 3	1,229	
Val. medio	920		1,357	0,15
K-2-2	828	nº 1	1,309	
K-2-2	828	nº 2	1,292	
K-2-2	828	nº 3	1,346	
Val. medio	828		1,316	0,16
K-3-2	745,2	nº 1	1,091	
K-3-2	745,2	nº 2	1,250	
K-3-2	745,2	nº 3	1,138	
Val medio	745,2		1,160	0,16

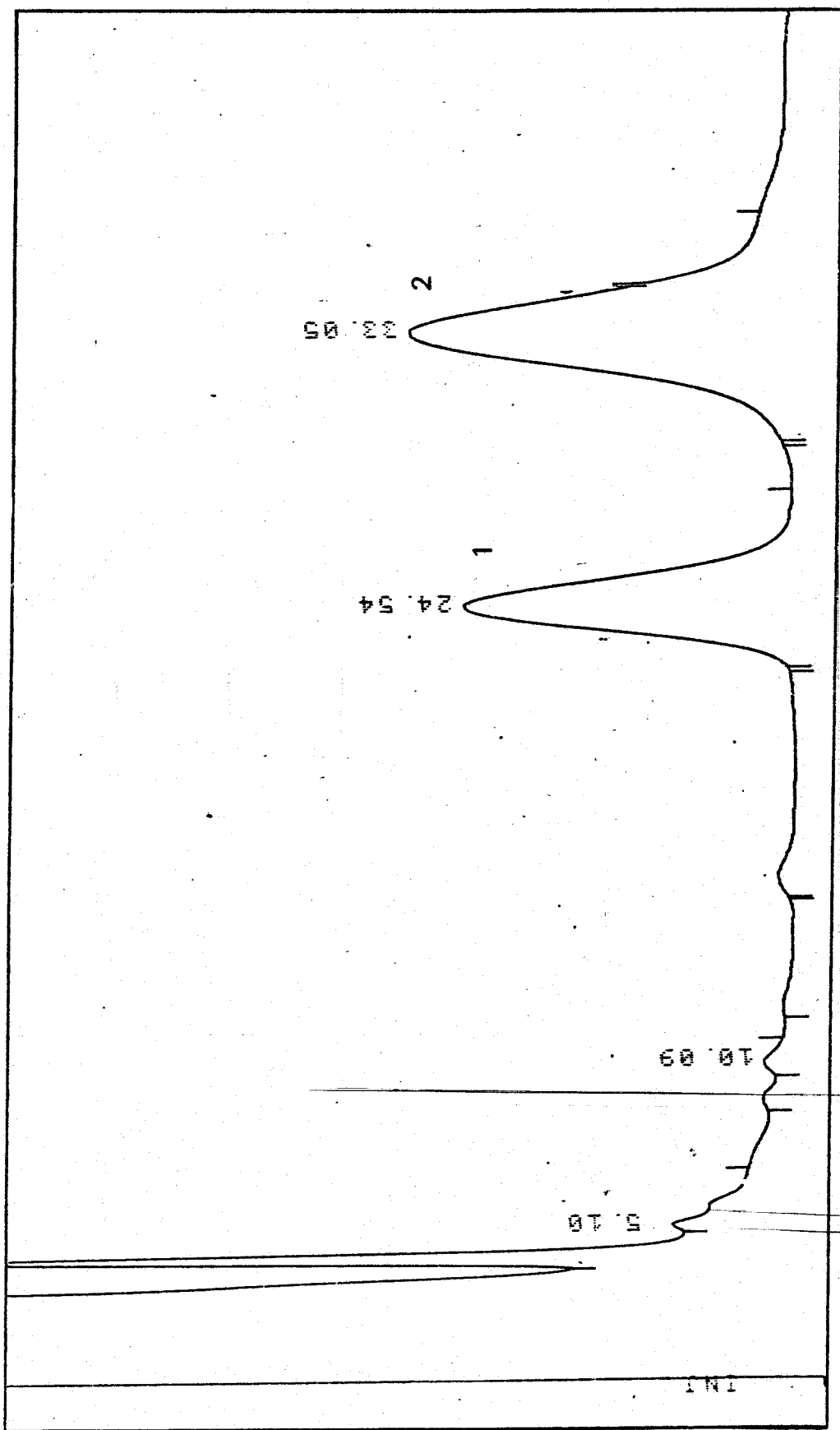


Fig. 18. Cromatograma gas-líquido de los TMS derivados de la muestra K-3-2 (variedad "gordal").
1, sacarosa; 2, trehalosa (patrón interno). Se utilizó una columna de las características ex-
puestas en la figura 13. Temperatura de la columna, 230º.

3.4. Muestra L

Variedad: "hojiblanca".

Fecha de la toma de muestra: 11-12-1978.

Los extractos etanólicos procedentes de 30 g de pulpa fresca se evaporan en el rotavapor con el fin de eliminar el etanol. El residuo se trata con agua como se indica en el apartado III.2.3. para pasar a disolución acuosa los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

El extracto acuoso que resulta se purifica mediante defecación con acetato neutro de plomo y paso por resinas de intercambio iónico Amberlita IR-120 y IR-45, siguiendo lo que se indica en los apartados III.2.3.1 y III.2.3.2.

Se toma una fracción alícuota del extracto acuoso purificado que corresponde a 6 g de pulpa, se lleva a un matraz aforado de 50 ml y se enrasa con agua destilada. En esta disolución cada ml corresponde a 120 mg de pulpa extraída.

A 4 ml de esta disolución se le denomina muestra L-3-1 y corresponde a 480 mg de pulpa.

Otra fracción de la disolución que corresponde a 2,76 mg de pulpa se diluye hasta 50 ml.

A 10 ml de esta disolución se le denomina muestra L-3-2 y corresponde a 552 mg de pulpa.

a) Análisis de glucosa, fructosa y manitol:

A la muestra L-3-1 se le añaden 2 ml de una disolución de inositol que contiene 3,2 mg de esta sustancia.

La muestra y el patrón interno se dejan estar una noche en disolución acuosa y al día siguiente se obtienen los trimetilsililderivados mediante el procedimiento que se indica en el apartado VI.2.4.1.

Se desarrollan tres cromatogramas, obteniéndose los resultados que se indican a continuación:

Muestra	Miligramos de pulpa extraída	Cromatograma.	Miligramos de glucosa.	Miligramos de fructosa	Miligramos de manitol.
L-3-1	480	nº 1	8,769	0,575	0,938
L-3-1	480	nº 2	8,846	0,556	0,869
L-3-1	480	nº 3	8,695	0,575	0,760
Val.medio	480		8,770	0,569	0,856

Compuesto	Porcentaje %
Glucosa	1,83
Fructosa	0,12
Manitol	0,18

b) Análisis de sacarosa:

A la muestra L-3-2 se le añade 1 ml de una disolución de trehalosa que contiene 2 mg de esta sustancia.

Se procede de la misma forma que en el análisis de la glucosa, fructosa y manitol.

En primer lugar se hicieron tres cromatogramas de la muestra empleando las condiciones cromatográficas indicadas en el apartado 2.4.3 y 2.4.4, con los siguientes resultados:

Muestra	Miligramos de pulpa extraída.	Cromatograma.	Miligramos de sacarosa	Sacarosa %
L-3-2	552	nº 1	1,388	
L-3-2	552	nº 2	1,371	
L-3-2	552	nº 3	1,414	
Val.medio	552		1,391	0,25

Como se observa en el cromatograma de la figura 20 aparece un pico que solapa con el de la trehalosa. Esto hizo que se repitieran las determinaciones, en este caso los cromatogramas se desarrollaron empleando como temperatura de la columna 220º en lugar de 230º, consiguiendo de esta forma la separación de la trehalosa del componente presente en esta muestra como se puede ver también en la figura 20.

Los resultados han sido los siguientes:

Muestra	Miligramos de pulpa extraída	Cromatograma	Miligramos de sacarosa	Sacarosa %
L-3-2	552	nº 1	1,115	
L-3-2	552	nº 2	1,158	
L-3-2	552	nº 3	1,183	
Val.medio	552		1,152	0,21

3.5. Muestra LL.

Variedad: "verdial".

Fecha de la toma de muestra: 20-12-1978

Los extractos etanólicos procedentes de 35,28 g de pulpa fresca se evaporan en el rotavapor con el fin de eliminar el etanol. El residuo se trata con agua como se indica en el apartado III.2.3. para pasar a disolución acuosa los azúcares y demás componentes hidrosolubles.

El extracto acuoso que resulta se purifica mediante defecación con acetato neutro de plomo y paso por resinas de intercambio iónico Amberlita IR-120 y IR-45 según lo indicado en los apartados III.2.3.1 y III.2.3.2.

El líquido obtenido se lleva a un volumen de 100 ml. En esta disolución cada ml corresponde a 352,8 mg de pulpa extraída.

A 2 y 10 ml de la disolución anterior se le denominan muestras LL-3-1 y LL-3-2 y corresponden a 705,6 y 1764 mg de pulpa extraída respectivamente.

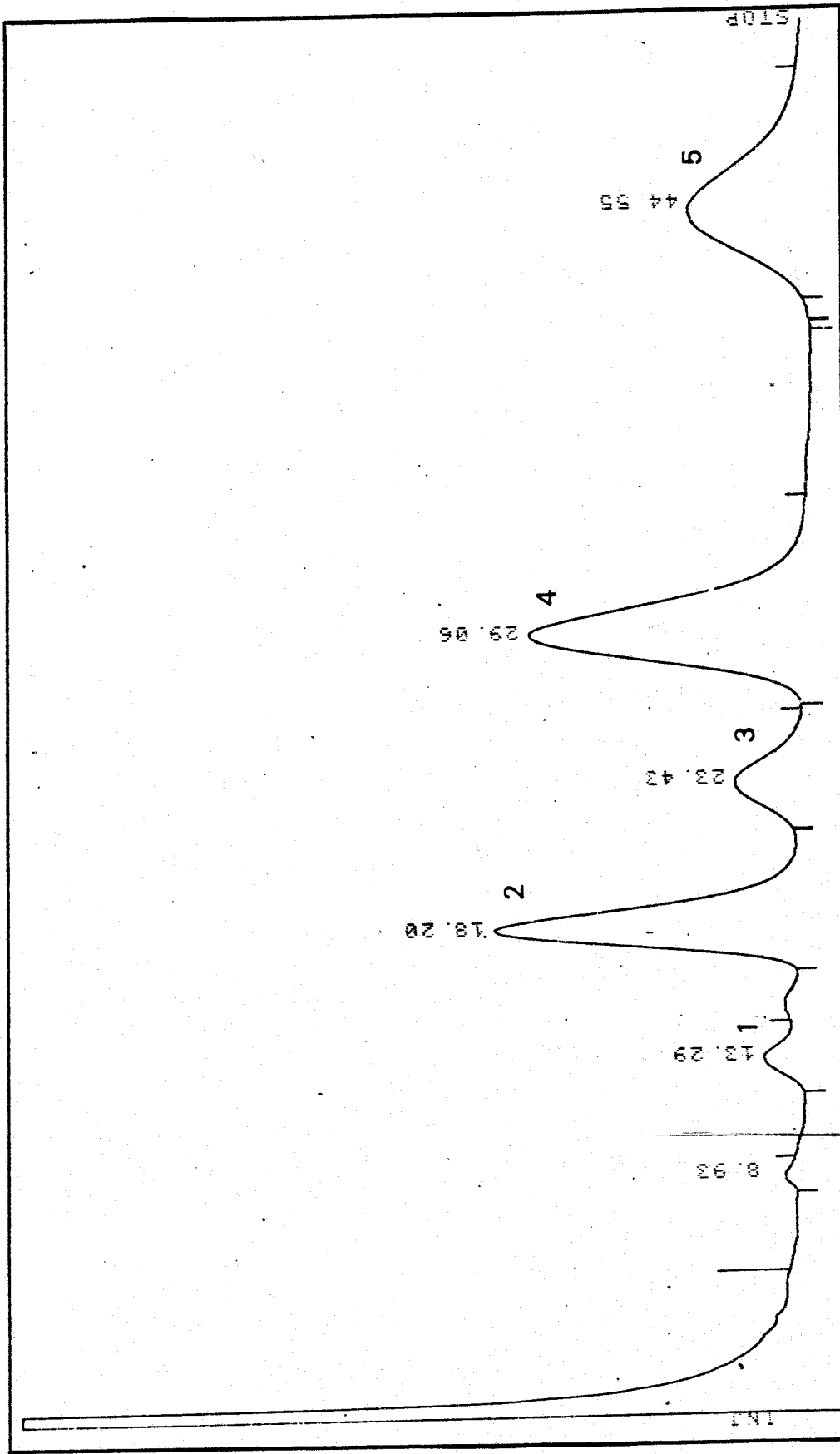


Fig. 19. Cromatograma gas-líquido de los TMS derivados de la muestra L-3-1 (variedad "hoji-blanca"). 1, fructosa; 2, glucosa- α ; 3, manitol; 4, glucosa- β ; 5, inositol (patrón inter-no). Se utilizó una columna de las características expuestas en la figura 12. La temperatura empleada fué de 190°.

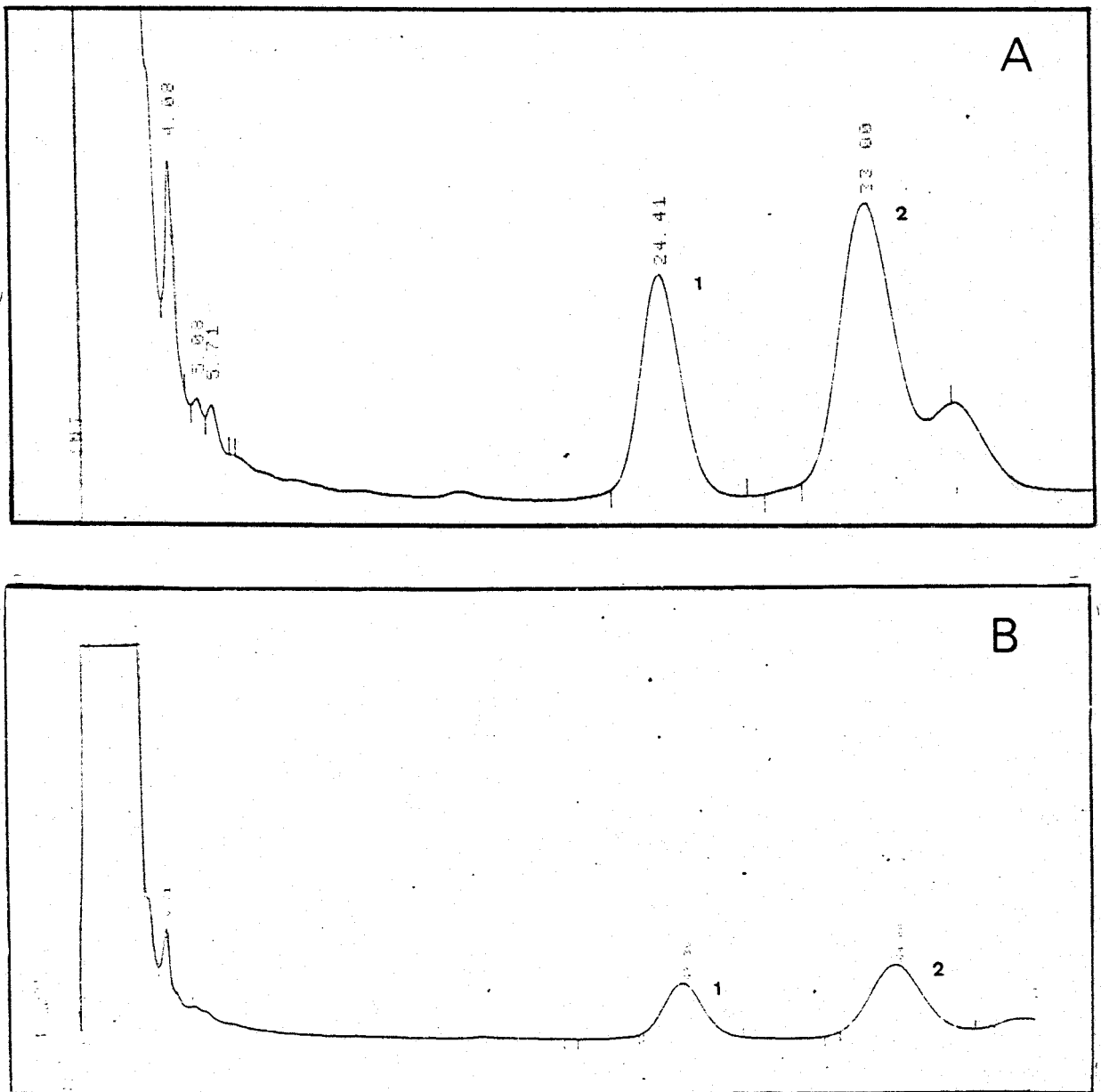


Fig. 20. Cromatogramas gas-líquido de los TMS derivados de la muestra L-3-2 (variedad "hojiblanca"). 1, sacarosa; 2, trehalosa (patrón interno). Se utiliza una columna de las características expuestas en la figura 13. A) Cromatograma desarrollado a 230°. B) La temperatura empleada fué de 220°.

La primera de las muestras se utiliza en la determinación cuantitativa de glucosa, fructosa y manitol y la segunda en la determinación de sacarosa.

a) Análisis de glucosa, fructosa y manitol:

A la muestra LL-3-1 se le añaden 3 ml de una disolución de inositol que contiene 4,8 mg de esta sustancia.

El proceso empleado con esta muestra es análogo - al seguido con las muestras anteriores, obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Miligramos de pulpa extraída.	Cromato- grama.	Miligra- mos de glucosa.	Miligra- mos de fructosa	Miligra- mos de manitol.
LL-3-1	705,6	nº 1	10,348	0,965	1,370
LL-3-1	705,6	nº 2	10,755	0,943	1,463
LL-3-1	705,6	nº 3	10,230	0,976	1,385
Val.medio	705,6		10,444	0,961	1,406

Compuesto	Porcentaje %
Glucosa	1,48
Fructosa	0,14
Manitol	0,20

b) Análisis de sacarosa:

A la muestra LL-3-2 se le añade 1 ml de una disolución de trehalosa que contiene 2 mg de esta sustancia.

Se sigue el mismo procedimiento que con las muestras anteriores, obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Miligramos de pulpa extraída.	Cromatograma.	Miligramos de sacarosa.	Sacarosa %
LL-3-2	1764	nº 1	2,131	
LL-3-2	1764	nº 2	2,100	
LL-3-2	1764	nº 3	2,184	
Val.medio	1764		2,138	0,12

También en los cromatogramas correspondientes a esta muestra aparece un hombro en el pico de la trehalosa -- (figura 22) aunque en este caso es menos intenso que en la muestra anterior.

Por lo dicho anteriormente se hacen nuevas determinaciones a 220º consiguiendo la separación del pico correspondiente a la trehalosa del otro perteneciente a la muestra analizada (figura 22) con los resultados siguientes:

Muestra	Miligramos de pulpa extraída.	Cromatograma.	Miligramos de sacarosa.	Sacarosa %
LL-3-2	1764	nº 1	1,904	
LL-3-2	1764	nº 2	1,839	
LL-3-2	1764	nº 3	1,978	
Val.medio	1764		1,907	0,11

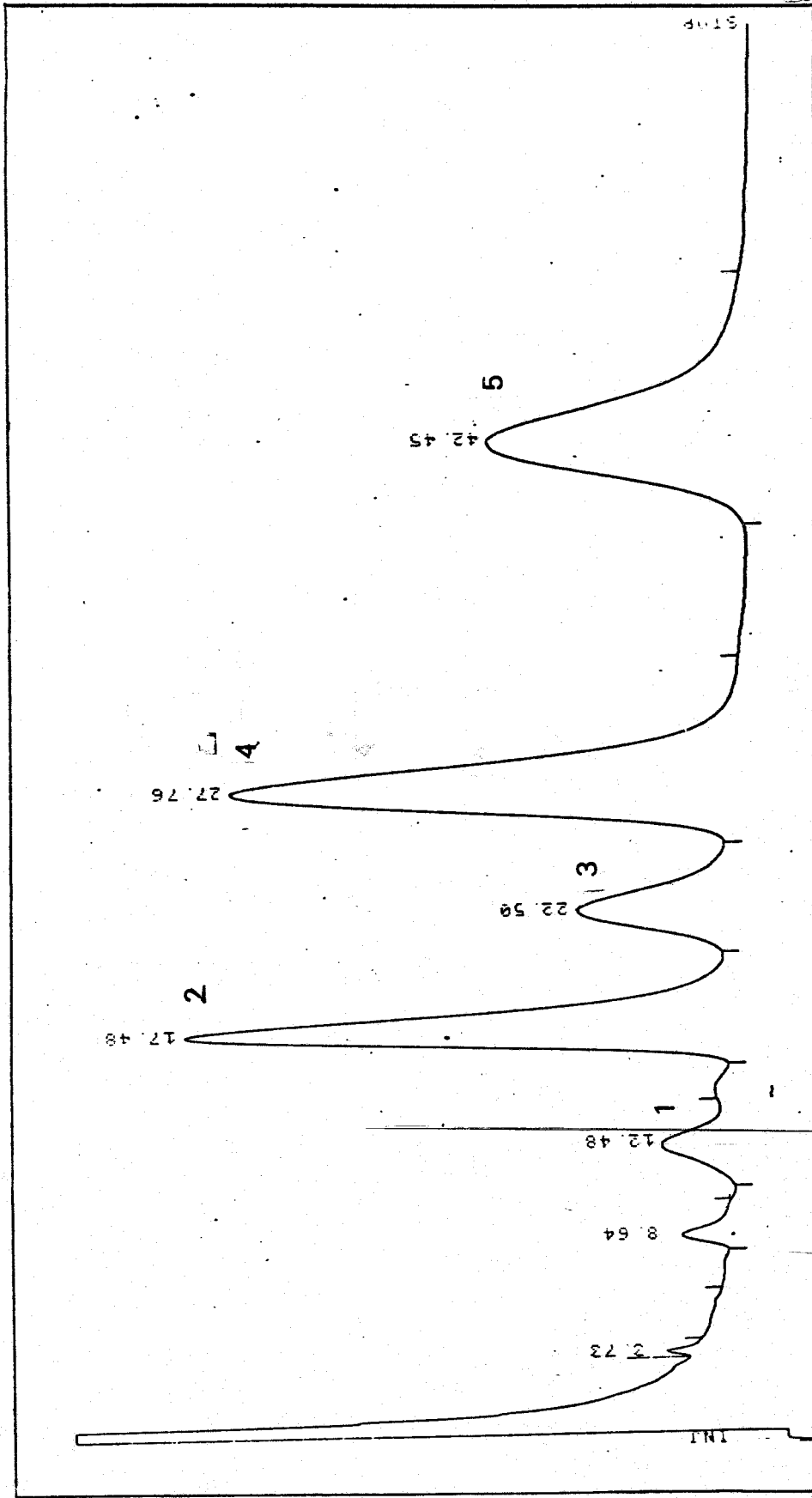


Fig. 21. Cromatograma gas-líquido de los TMS derivados de la muestra III-3-1 (variedad "verdial"). 1, fructosa; 2, glucosa- α ; 3, manitol; 4, glucosa- β ; 5, inositol (patrón interno). Se utilizó una columna de las características expuestas en la figura 12. La temperatura empleada fué de 170 $^{\circ}$.

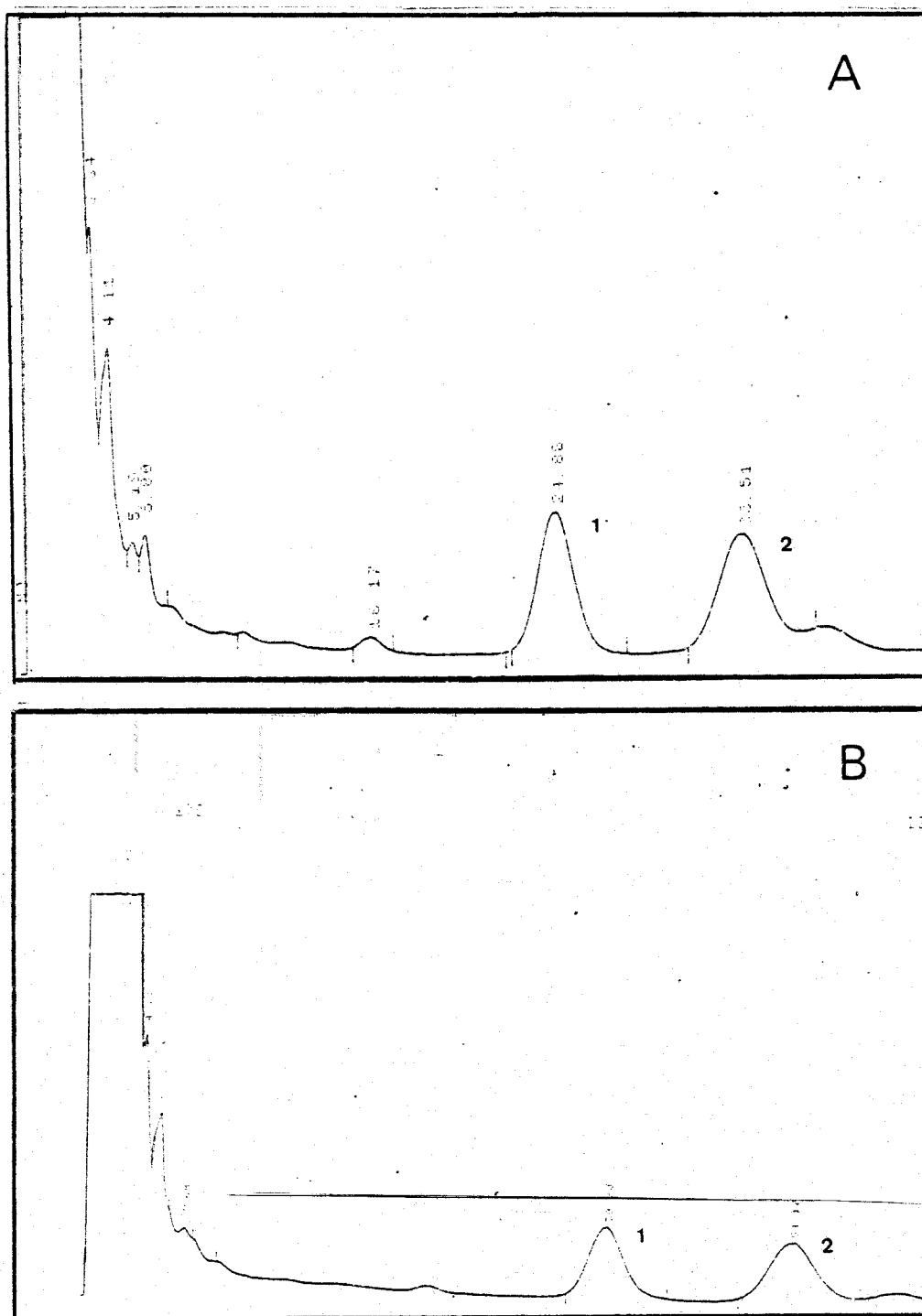


Fig. 22. Cromatogramas gas-líquido de los TMS derivados - de la muestra LL-3-2 (variedad "verdial"). 1, sacarosa; - 2, trehalosa (patrón interno). Se utilizó una columna de las características expuestas en la figura 13. A) Cromatograma desarrollado a 230°. B) La temperatura empleada fué de 220°.

3.6. Resumen

Los porcentajes de glucosa, fructosa, manitol y sacarosa obtenidos en las determinaciones cuantitativas de las distintas muestras analizadas se recogen en la tabla XXVIII.

Igualmente los porcentajes de azúcares reductores, azúcares totales y las relaciones azúcares reductores/azúcares totales y fructosa/azúcares reductores se exponen en la tabla XXIX.

Tabla XXVIII

Muestra	Tratamiento	Porcentaje % de pulpa fresca			
		Glucosa	Fructosa	Manitol	Sacarosa
H	a y b	2,97	1,33	1,41	
J-1	ninguno	2,11	0,71	0,22	
J-2	a	2,13	0,67	0,23	
J-3	a y b	2,05	0,80	0,20	0,08
K-1	ninguno	1,60	0,11	0,15	0,15
K-2	a	1,61	0,11	0,10	0,16
K-3	a y b	1,61	0,14	0,10	0,16
L	a y b	1,83	0,12	0,18	0,21
LL	a y b	1,48	0,14	0,20	0,11

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

Variedad: "manzanilla", muestras H, J-1, J-2 y J-3; "gordal", muestras K-1, K-2 y K-3; "hojiblanca", muestra L; "verdial", muestra LL.

Tabla XXIX

<u>Muestra</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Az.reduct.</u>	<u>Az.totales</u>	<u>Az.red.</u> <u>Az.tot.</u>	<u>Fructosa</u> <u>Az.red.</u>
H	a y b	4,30			0,71
J-1	ninguno	2,82			0,5
J-2	a	2,80			0,24
J-3	a y b	2,85	2,93	0,97	0,28
K-1	ninguno	1,71	1,86	0,92	0,06
K-2	a	1,72	1,88	0,92	0,06
K-3	a y b	1,75	1,91	0,92	0,08
L	a y b	1,95	2,16	0,90	0,06
LL	a y b	1,62	1,73	0,94	0,09

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

En el apartado VIII.2 se hace un estudio comparado de los resultados obtenidos por el método de la cromatografía gas-líquido con los obtenidos por los otros procedimientos analíticos.

VII. DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE
AZUCARES EN HIDROLIZADOS DE PULPA.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

El único trabajo en el que se hace un estudio de los monosacáridos en hidrolizados de pulpa de aceitunas - se debe a Petruccioli (10).

Este autor estudia los hidrolizados de pulpa de las siguientes variedades italianas: "canino", "carboncella", "frantoio", "leccino", "maurino", "moraiolo" y "morchiaio". En ellos identifica mediante cromatografía sobre papel: - arabinosa, xilosa, fructosa, glucosa, galactosa y manosa. Los mismos azúcares que este autor encuentra en los ex---tractos acuosos de la pulpa.

Rágazzi y Veronese (11) estudian el alpechín de - aceitunas maduras, En el hidrolizado de dicho alpechín -- han identificado y determinado cuantitativamente mediante la cromatografía sobre papel los siguientes monosacáridos: glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ramnosa.

2. MATERIAL Y METODOS

En este capítulo se determinan los monosacáridos que se encuentran en la pulpa de aceitunas en forma combi nada, esto es formando polisacáridos. Se utiliza para ello el material insoluble que queda al extraer la pulpa con - etanol acuoso al 80% y posteriormente con hexano y aceto- na. Este tratamiento elimina los azúcares libres y otros componentes de pequeño peso molecular, así como los lípi- dos y sustancias análogas.

El material pulverulento que resulta después de las extracciones se hidroliza con ácido sulfúrico. En el hidrolizado se determinan cualitativamente los monosacáridos presentes mediante la cromatografía de papel descendente y la cromatografía gas-líquido.

Posteriormente se determinan cuantitativamente los azúcares presentes de forma global por el método colorimétrico de la antrona-sulfúrico de Roe e individualmente por cromatografía gas-líquido como acetatos de los correspondientes alditoles.

Las determinaciones analíticas se han realizado en muestras de las variedades "manzanilla" y "gordal".

2.1. Aceitunas

Se han utilizado aceitunas de las variedades "manzanilla" y "gordal" recogidas en olivares de la provincia de Sevilla.

Variedad "manzanilla": Muestra M (20-10-1976).

Variedad "gordal": Muestra N (25-10-1976).

2.2. Tratamiento de purificación previo a las determinaciones analíticas

El fruto deshuesado y triturado, conteniendo aproximadamente un 60% de agua, se estabiliza con etanol acuoso del 80%. Para ello, se le añade la cantidad necesaria de etanol del 96% hasta llegar a la composición deseada y se calienta a ebullición durante tres horas y media.

La estabilización se efectúa el mismo día de la recogida de la muestra.

A continuación se procede de la siguiente forma: la pulpa fresca una vez estabilizada, se filtra y se deja secar. El sólido se extrae en Soxhlet con etanol acuoso del 80%. De esta manera se eliminan la glucosa, fructosa, sacarosa y manitol que existen en forma libre en la pulpa de aceitunas en cantidades apreciables. Mediante este tratamiento, también se eliminan sustancias glicosídicas y componentes fenólicos.

La pulpa se seca y se somete a una extracción continua con hexano y acetona con el objeto de eliminar fundamentalmente los lípidos. En la purificación de la muestra de la variedad "manzanilla" sólo se ha empleado la extracción con hexano.

Sobre este material que queda en forma pulverulenta se realizan las hidrólisis correspondientes.

2.3. Hidrólisis ácida

La hidrólisis de polisacáridos usando ácidos minerales ha sido muy empleada en el estudio estructural de dichas sustancias.

La resistencia de estos compuestos a romperse, liberando los monosacáridos que lo constituyen, es muy variable y depende fundamentalmente de los monosacáridos que lo forman, del tipo de anillo de dicho monosacárido y de la configuración de los enlaces glicosídicos existentes entre ellos.

Los ácidos minerales empleados con este fin han sido muy diversos. Los más frecuentemente utilizados son los ácidos clorhídrico, fórmico, trifluoracético y sulfúrico.

Los procedimientos consisten en el calentamiento del polisacárido con uno de estos ácidos durante un determinado periodo de tiempo. La concentración del ácido utilizado, así como el tiempo y la temperatura de calentamiento van siendo mayores a medida que aumenta la resistencia del polisacárido a la hidrólisis. No obstante, cuando las condiciones de hidrólisis son enérgicas, los monosacáridos liberados pueden ser degradados.

Saeman y col. (72) proponen un procedimiento para hidrolizar celulosa y otras D-hexoglicanas que son insolubles en agua ó en ácidos diluidos.

Consta de dos partes, en la primera se solubiliza el polisacárido con ácido sulfúrico del 72% calentando a 30° durante 45 minutos. En la segunda se efectúa una hidrólisis secundaria con ácido sulfúrico del 3% calentando a ebullición durante 4 horas y media. Después se neutraliza la disolución con carbonato cálcico y se analiza por el método de Somogyi.

Blake y Richards (73) utilizan el método de Saeman y col. en la hidrólisis de hemicelulosa B del spear grass (*heteropogon contortus*). Comprueba que el periodo de calentamiento en la fase secundaria deja de ser crítico

después de las tres horas, de aquí que sea éste el periodo de calentamiento empleado. Comprueba también la exactitud del método empleado, analizando celulosa microgranular mediante el procedimiento general, con la excepción de -- que en la fase de digestión emplea 1 ml de ácido sulfúrico del 72% por cada 100 mg de celulosa. Los resultados obtenidos dan una composición de glucosa del 96%, con trazas de arabinosa y xilosa. En la neutralización emplea hidróxido bórico 0,25 M.

En este trabajo, se ha empleado el procedimiento de Blake y Richards (73) para conseguir la hidrólisis total de los polisacáridos presentes en la pulpa de aceitunas, determinándose a continuación de forma cualitativa y cuantitativa los azúcares neutros que resultan.

Al sólido (1,2 g) se le añaden 7 ml de una disolución de ácido sulfúrico del 72% y se agita con una varilla de vidrio para facilitar la disolución, calentándose al mismo tiempo a 30°. Una hora después se da por terminada esta operación, se le añade agua destilada (200 ml) y se calienta en baño con agua a ebullición durante 3 horas. Se pasa a un matraz y se agita al mismo tiempo que se le añade carbonato bórico. Cuando la disolución está neutra, el contenido del matraz junto con el agua de lavado de este recipiente se filtra sobre papel Whatman nº 1. Se lava el precipitado con agua destilada (100 ml) y el filtrado junto con los líquidos de lavado se concentran en rotavapor hasta un volumen aproximado de 100 ml.

A continuación se hace pasar la disolución por -- dos columnas que contienen resinas de intercambio iónico Amberlita IR-120 H⁺ (20 ml) y IR-45 OH⁻ (30 ml). Para -- que los azúcares no queden retenidos en las resinas se la van éstas con un volumen de agua destilada aproximadamen-- te igual a 15 veces el volumen de su lecho.

La disolución incolora que resulta y que contiene los azúcares neutros es la que se emplea en el estudio -- analítico.

2.4. Identificación de azúcares por cromatografía so-- bre papel.

La técnica utilizada ha sido la descendente mono-- dimensional. El papel ha sido Whatman nº 1 y 3. El siste-- ma desarrollador empleado ha sido acetato de etilo-piridi-- na-agua (8:3:1). Las proporciones indicadas se refieren a volúmenes.

La cromatografía descendente se ha realizado so-- bre hojas de papel de 58 cm de longitud y 46 cm de ancho, habiendo dejado 2,5 cm de intervalo y 3 cm del borde del papel.

Las disoluciones de referencia se han preparado -- al 2% con muestras puras de kilosa, arabinosa, manosa, -- glucosa y galactosa.

Las manchas de azúcares se revelan por inmersión del cromatograma, después de haber sido desarrollado y --

secado al aire, en el reactivo difenilamina-urea y ácido fosfórico (29). Se ha empleado la disolución reveladora - para aldosas. La preparación de este reactivo y el procedimiento de revelado ha sido descrito en el apartado II. 2.3.

Con objeto de conseguir una mayor separación se ha dejado salir el disolvente desarrollador, midiéndose los valores R_G en lugar de los correspondientes R_F .

Los datos cromatográficos correspondientes a las referencias se exponen a continuación:

Compuesto	R_G		color
	(1)	(2)	
Xilosa	1,84	1,83	rosa
Arabinosa	1,53	1,48	rosa
Manosa	1,31	1,26	rosa-brillante
Glucosa	1,00	1,00	rosa-brillante
Galactosa	0,80	0,80	rosa-brillante

(1) Papel Whatman nº 3; tiempo de desarrollo, 24 horas; temperatura, 19°.

(2) Papel Whatman nº 1; tiempo de desarrollo, 18 horas; temperatura, 21°.

2.5. Determinación espectrofotométrica

En la determinación cuantitativa directa de los azúcares totales existentes en hidrolizados de pulpa se ha

empleado el método colorimétrico de la antrona-sulfúrico - de Roe (48).

El procedimiento utilizado se ha descrito en el - apartado III.2.5.3.

Para conocer la concentración de los azúcares --- existentes (referidos a glucosa) en las muestras analiza- das, a partir de los valores de absorbancia obtenidos ex perimentalmente, es necesario construir una curva de cali- brado.

Para la construcción de ésta curva de calibrado - se preparan 10 disoluciones de referencia cuyas concentra- ciones en glucosa van desde 18 a 180 $\mu\text{g/ml}$. Se toma 1 ml de cada una de estas disoluciones y se someten al procedi- miento descrito en el apartado III.2.5.3., midiendo las - absorbancias frente al blanco a 620 nm.

Las cantidades de glucosa que contienen las diso- luciones de referencia así como los valores de absorban- cia que resultan se exponen en la tabla XXX.

La línea de calibrado se obtiene al poner ~~en abs-~~ cisas los microgramos de glucosa en 1 ml de disolución y en ordenadas los correspondientes valores medidos de ab- sorbancia (figura 23).

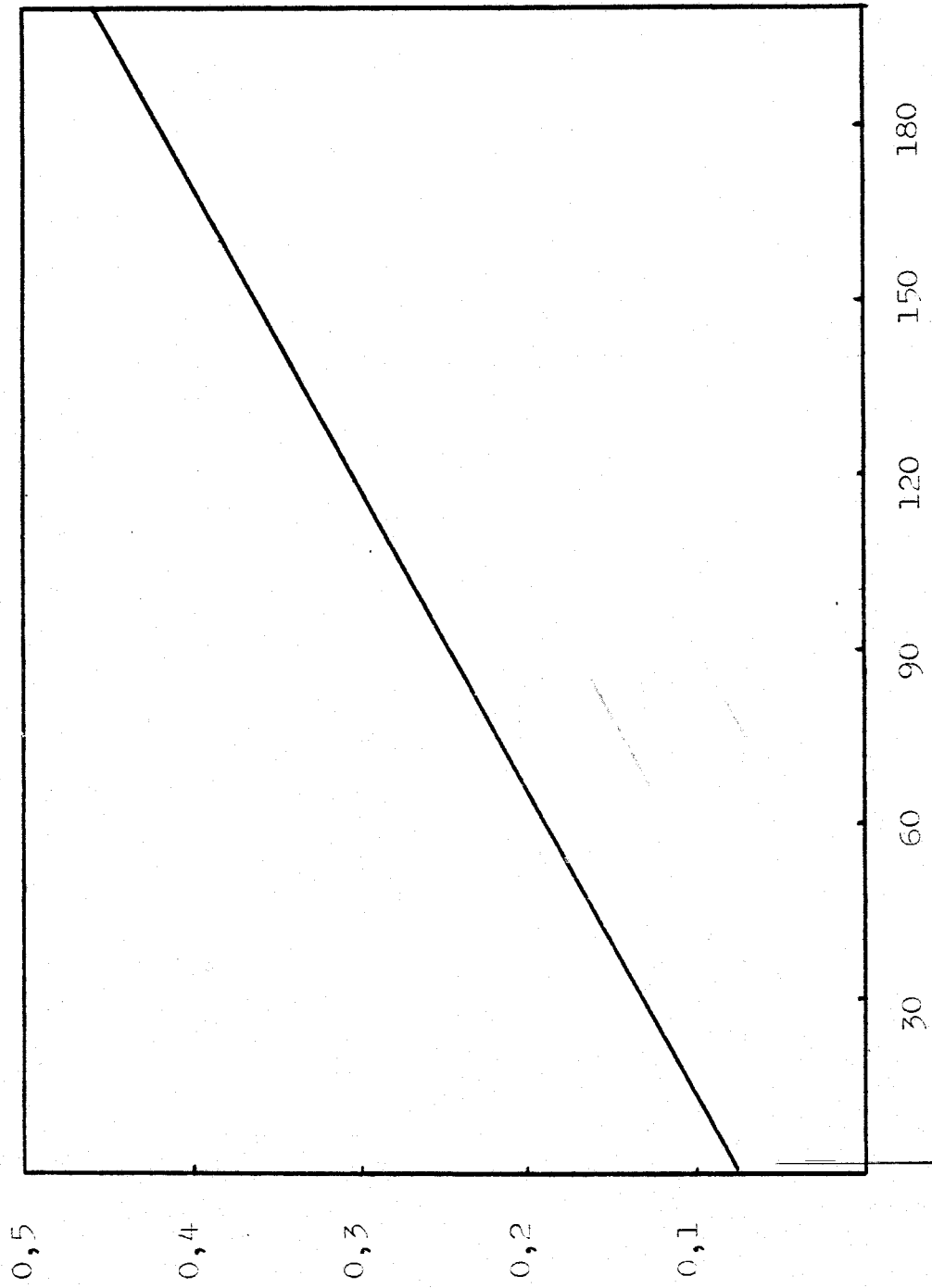
Se preparan dos disoluciones con diferentes con- centraciones de azúcares de cada una de las muestras ana- lizadas. A estas disoluciones se les aplica el procedi---

miento analítico al mismo tiempo que a las disoluciones de referencia y al blanco. De esta forma, tanto las muestras como las referencias se someten a las mismas condiciones experimentales.

Los valores de absorbancia obtenidos se llevan a la curva de calibrado de la figura 23, conociéndose así las cantidades de azúcares (referidos a glucosa) existentes en cada una de estas disoluciones.

Tabla XXX

<u>Disoluciones de referencia</u>	<u>Microgramos de glucosa en 1 ml</u>	<u>Absorbancia</u>
nº 1	18	0,050
nº 2	36	0,095
nº 3	54	0,135
nº 4	72	0,190
nº 5	90	0,230
nº 6	108	0,275
nº 7	126	0,315
nº 8	144	0,355
nº 9	162	0,390
nº 10	180	0,450



Microgramos de Glucosa en 1 ml

Figura 23.

2.6. Identificación y determinación cuantitativa de los azúcares por cromatografía gas-líquido.

Dado que los hidratos de carbono no son volátiles para su determinación por cromatografía gas-líquido, se requiere la preparación de derivados volátiles.

Sweeley y col. (63) introducen los trimetilsilil-derivados. Desde entonces muchos autores lo han aplicado al análisis cuantitativo de monosacáridos (74,75) y a los hidrolizados de polisacáridos (76,77). El problema más importante que presentan estos derivados es el que un mismo azúcar da lugar a una multiplicidad de picos correspondientes a sus formas anómeras en equilibrio, lo cual dificulta su separación y su posterior determinación. Este problema puede ser eliminado por la reducción de las aldosas a alditoles y formación de los acetatos correspondientes.

Gunner y col. (78,79) demostraron la posibilidad de utilizar estos derivados en el análisis cuantitativo de mezclas de monosacáridos, pero hasta que Sawardeker y col. (63) no introducen como fase líquida en la separación de estos compuestos la ECNSS-M, el método no fué ampliamente aceptado. Posteriormente ha sido aplicado a la determinación cuantitativa de azúcares neutros componentes de la pulpa de madera (80,81).

Sloneker (82) y Blake y Richards (73) efectúan algunas modificaciones sobre el procedimiento de Sawardeker

y lo aplican a la determinación cuantitativa de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida de polisacáridos en tejidos de plantas.

La técnica cromatográfica empleada en este trabajo es similar a la de estos dos últimos autores y se describe a continuación.

2.6.1. Procedimiento

El procedimiento empleado en la preparación de los acetatos de alditoles es el siguiente:

A 5 ml de la disolución acuosa de los azúcares (20 a 40 mg) se le añade 1 ó 2 ml de una disolución de inositol que se utiliza como patrón interno y que contiene 2 ó 4 mg de esta sustancia.

A esta disolución se le adicionan 2 ml de otra preparada disolviendo 50 mg de borohidruro sódico en 10 ml de agua destilada. Después de estar 3 horas a temperatura ambiente, se destruye el exceso de reactivo con unas gotas de ácido acético (hasta que cese el desprendimiento de burbujas). La eliminación del ~~cación Na⁺~~ se realiza pasando la disolución por una columna con resina Amberlita IR-120 H⁺ (3 ml). Para que no queden retenidos los alditoles en la columna, se lava ésta con 45 ml de agua destilada. El líquido eluido de la columna se concentra en rotavapor hasta sequedad y se evapora de nuevo a sequedad 5 veces con 5 ml de metanol para eliminar el exceso de ácido bórico en forma de borato de metilo.

Finalmente los alditoles son acetilados con 2 ml de anhídrido acético-piridina (1:1, v:v) dejándolo toda la noche a temperatura ambiente.

Para el buen desarrollo de los cromatogramas es conveniente eliminar el exceso de estos dos últimos reactivos. Esto se consigue concentrando a sequedad 5 ó 6 veces con 5 ml de cloroformo.

Los alditoles acetilados disueltos en cloroformo se inyectan en el cromatógrafo.

2.6.6. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Los análisis se han realizado en un cromatógrafo Perkin-Elmer, Franktometer F-7, de ionización a la llama, equipado con un registrador-integrador Hewlett-Packard -- 3380 A (dotado de un computador).

Se ha empleado una columna de 2 m de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro externo, conteniendo ECNSS-M al 3% sobre Gas-Chrom Q, 100-120 mesh.

El gas portador utilizado es N_2 con un flujo de 30 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 190°, siendo las temperaturas del bloque de inyección y del detector de 260° y 300° respectivamente.

Los volúmenes de inyección han oscilado entre --- 0,4 y 1,2 microlitros. Los cromatogramas se han realizado con una atenuación de 1 x 64 y 1 x 128, siendo la velocidad de la carta de 0,5 cm/min.

2.6.3. Análisis previo

Antes de realizar la determinación cuantitativa - de los monosacáridos en los hidrolizados, se han identifi cado los componentes de una de las muestras por cromato-- grafía gas-líquido.

La muestra M-1 se somete al procedimiento general de formación de los acetatos de alditol tal como se indi- ca en el apartado VII.2.6.1. Se inyecta en el cromatógra- fo y aparecen 6 picos que se identifican por sus tiempos de retención con los que producen la ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

La mezcla de referencia ha sido preparada con pro ductos comerciales secados previamente con pentóxido de - fósforo y sometida al procedimiento general de formación de derivados.

Las condiciones cromatográficas han sido las mis- mas en las dos determinaciones. Los cromatogramas obteni- dos se pueden comparar en la figura 24.

Aunque el tiempo de retención de un mismo pico ~~---~~ puede variar de un cromatograma a otro, los tiempos de re tención relativos, es decir la relación T_r / T_r del patrón interno, permanece constante en todas las determinaciones realizadas; siendo los siguientes:

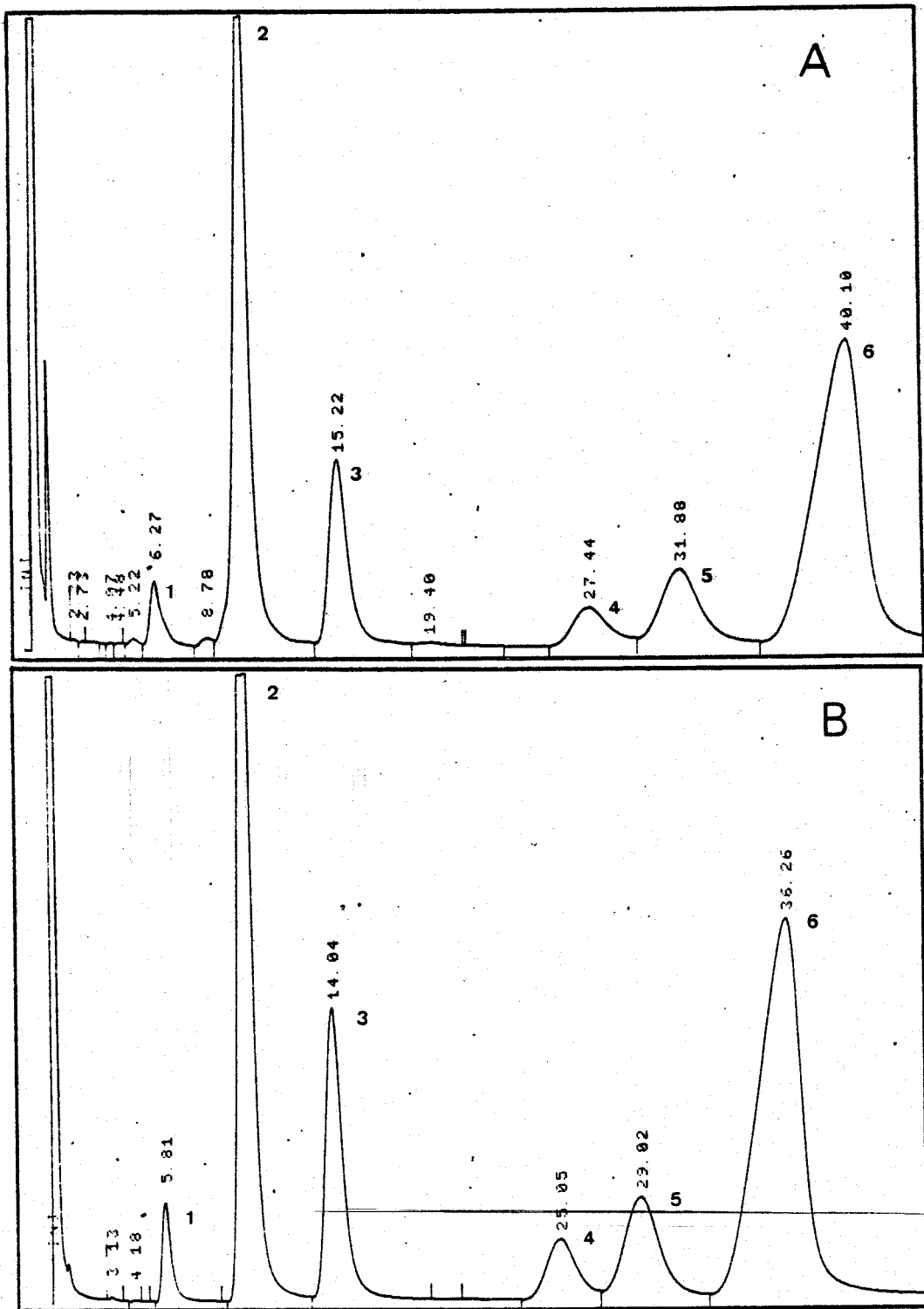


Fig. 24. Cromatogramas gas-líquido de los acetatos de alditol: A) Muestra M-1 (variedad "manzanilla"). B) Mezcla de azúcares comerciales. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, manosa; 5, galactosa; 6, glucosa. Se utilizó una columna de 2 m de longitud y 1/8 " de diámetro externo -- con ECNSS-M al 3% sobre Gas-Chrom Q. Temperatura de la columna, 190°.

<u>Compuesto</u>	<u>Tr/Tr inositol</u>
Ramnosa	0,13
Arabinosa	0,21
Xilosa	0,30
Manosa	0,54
Galactosa	0,62
Glucosa	0,77

2.6.4. Calibrado

El calibrado se efectúa siguiendo lo indicado en el apartado VI.2.4.

El método empleado en los cálculos cromatográficos es el del patrón interno, habiéndose escogido para este fin al inositol cuyo pico no coincide con ninguno de los picos presentes en los cromatogramas de las muestras.

La exactitud y precisión del método ha sido estudiado exhaustivamente por Blake y Richards (73). Los errores que se cometen por término medio para las distintas sustancias analizadas son inferiores al 5%.

En primer lugar se han calculado los factores de respuesta del detector para cada una de las sustancias analizadas. Para ello se prepara una muestra de referencia que contiene cantidades conocidas de los distintos azúcares analizados y se le añade una cantidad conocida del patrón interno. Se obtienen los acetatos de alditol -

correspondientes y se desarrolla el cromatograma. Se ha procurado que las proporciones de los distintos azúcares en esta mezcla sean similares a las de dichos azúcares en las muestras analizadas.

Se le informa al computador de dichas cantidades y éste nos suministra los factores de respuesta del detector para cada una de las sustancias analizadas.

La comprobación del método se realiza aplicando los factores de respuesta anteriormente calculados a nuevas mezclas de referencia. Los resultados de estas pruebas indicaron un error medio inferior al 5%.

Cuando se quiere efectuar la determinación cuantitativa de una muestra, ésta se desarrolla y el computador, una vez conocido los factores de respuesta y la cantidad de patrón interno, nos proporciona las cantidades de cada una de las sustancias presentes en dicha muestra.

3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

A continuación se describe el proceso seguido con cada una de las muestras y se detallan los resultados obtenidos.

3.1. Muestra M.

Variedad: "manzanilla".

Fecha de la toma de muestra: 20-10-1976

El fruto deshuesado y triturado (5000 g) se estabiliza con etanol acuoso del 80% según se indica en el -- apartado VII.2.2.

El resto insoluble se extrae en Soxhlet sucesivamente con etanol-agua del 80% y hexano.

El material residual (257 g), que queda en forma pulverulenta y que va a ser la base de nuestro estudio, - representa un 5,14% de la pulpa fresca inicial.

A 1,2 g de este sólido que se hidroliza siguiendo el procedimiento indicado en el apartado VII.2.3, se le - denomina muestra M-1.

La muestra M-1 se hidroliza con ácido sulfúrico, se neutraliza con carbonato bórico y a continuación se -- desioniza pasándola por columnas con Amberlita IR-120 y IR-45. Para ello, se sigue lo indicado en el apartado --- VII.2.3.

Esta muestra se lleva a un matraz aforado de 100 ml enrasándose con agua destilada. De esta disolución (M-1) se toman ~~distintas fracciones alícuotas~~ que se emplean en las determinaciones analíticas que a continuación se indican.

a) Identificación de los azúcares por cromatografía de pa-
nel

Se toman 20 ml de la disolución M-1 y se concen-- tran en rotavapor hasta pequeño volumen (1 ml aproximada-

mente). En el concentrado se identifican los monosacáridos por cromatografía sobre papel siguiendo el procedimiento indicado en el apartado VII.2.4. El cromatograma se revela con difenilamina-urea y ácido fosfórico detectándose manchas con los siguientes valores R_G : 1,83 (rosa), 1,52 (rosa), 1,29 (rosa-brillante), 1,00 (rosa-brillante) y 0,79 (rosa-brillante); que se corresponden con los azúcares: xilosa, arabinosa, manosa, glucosa y galactosa de acuerdo con las mezclas de referencia.

No se ha identificado la ramnosa por los siguientes motivos: 1) que dicha sustancia da una coloración más débil con el reactivo revelador empleado, lo cual hace -- que cuando esté presente en una muestra en pequeña proporción no se detecte. 2) para conseguir una buena separación de los demás azúcares analizados es necesario aumentar el tiempo de desarrollo, saliéndose la ramnosa del -- cromatograma.

b) Determinación colorimétrica

Con objeto de conocer de forma aproximada las cantidades de azúcares en las muestras analizadas, se ha hecho una determinación global de azúcares totales referidos a glucosa. Para ello, se ha aplicado el método colorimétrico de la antrona-sulfúrico de Roe (48).

En primer lugar se preparan las distintas muestras que van a ser analizadas por el método anteriormente citado.

Se toman 2 ml de la disolución M-1 y se lleva a un matraz aforado de 50 ml, enrasándose con agua destilada. A 1 ml de esta disolución que corresponde a 480 microgramos de sólido se le denomina muestra M-1-1.

Se toman 3 ml de la disolución M-1, se lleva a un matraz aforado de 50 ml y se enrasa con agua destilada. A 1 ml de esta disolución que corresponde a 720 microgramos de sólido insoluble se le denomina muestra M-1-2.

Las muestras M-1-1 y M-1-2 se someten al procedimiento colorimétrico indicado en el apartado III.2.5.3. - Los valores medidos de absorbancia se llevan a la curva de calibrado de la figura 23, obteniéndose las correspondientes cantidades de glucosa. A continuación se calculan los porcentajes de azúcares referidos a glucosa. Todos estos datos se exponen a continuación.

Muestra	Microgramos de sólido en 1 ml.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales % (glucosa)
M-1-1	528	0,165	47	8,9
M-1-2	720	0,215	73	10,1
	<u>Valor medio</u>			9,5

c) Determinación cuantitativa por cromatografía gas-líquido

En primer lugar se han identificado por cromatografía gas-líquido los monosacáridos componentes en hidro

lizados de pulpa de aceitunas. Para ello se ha seguido lo indicado en el apartado VII.2.6.

Como se conoce de forma aproximada las cantidades de azúcares existentes en la muestra M-1, se procede a la formación de los acetatos de alditol de dicha muestra.

Se toman 20 ml de la disolución M-1 que corresponde 240 mg de sólido insoluble. Se concentra en un rotavapor hasta un volumen de unos cinco mililitros, se le --añaden 2 ml de una disolución de inositol que contiene --4 mg de esta sustancia y se somete al procedimiento general de formación de derivados descrito en el apartado ---VII.2.6.1.

Los derivados disueltos en cloroformo son inyectados en el cromatógrafo, desarrollándose tres cromatogramas.

A partir de los datos obtenidos en los cromatogramas realizados, los cuales se exponen en la tabla XXXI, -se calculan los porcentajes de los distintos azúcares en la muestra analizada. Estos son:

<u>Compuesto</u>	<u>Porcentaje</u>	
	<u>% de sólido residual</u>	<u>% de pulpa fresca</u>
Ramnosa	0,36	0,02
Arabinosa	5,04	0,25
Xilosa	1,72	0,09
Manosa	0,69	0,04
Glucosa	7,55	0,38
Galactosa	1,49	0,08
<u>Azúcares totales</u>	<u>16,85</u>	<u>0,86</u>

Tabla XXXI

Muestra	Miligramos de sólido insoluble	Cromato-grama.	Miligramos de ramnosa	Miligramos de arabi-nosa.	Miligramos de xilosa	Miligramos de manosa	Miligramos de galac-tosa.	Miligramos de glucosa
M-1	240	nº 1	0,855	11,760	3,917	1,611	3,525	17,860
M-1	240	nº 2	0,882	12,220	4,231	1,671	3,613	18,060
M-1	240	nº 3	0,889	12,290	4,263	1,671	3,614	18,470
Valor medio			0,875	12,090	4,137	1,651	3,584	18,130

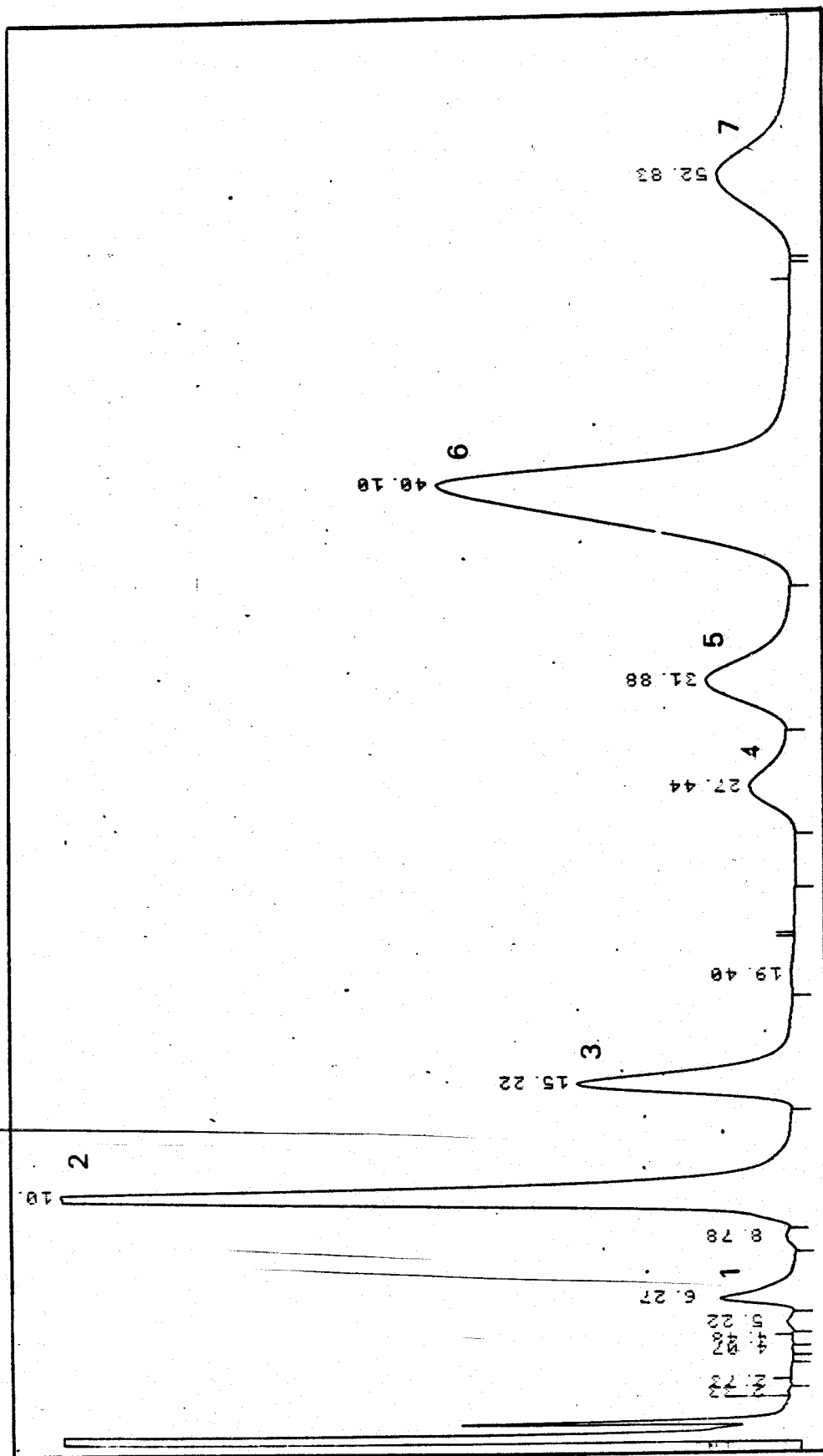


Fig. 25. Cromatograma gas-líquido de los acetatos de alditol de la muestra M-1 (variedad "manzanilla"). 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, manosa; 5, galactosa; 6, glucosa; 7, inositol (patrón interno). Se utilizó una columna de las características expuestas en la figura 24. Temperatura de la columna, 190°.

3.2. Muestra N.

Variedad: "gordal".

Fecha de la toma de muestra: 25-10-1976.

El fruto deshuesado y triturado (7300 g) se estabiliza con etanol-acuoso del 80% según se ha indicado en el apartado VII.2.2.

El resto insoluble se extrae en Soxhlet sucesivamente con etanol-agua del 80%, hexano y acetona.

El material residual (323 g) que queda en forma pulverulenta y es la base de nuestro estudio, representa un 4,42% de la pulpa fresca inicial.

A 1,2 g de este sólido que se hidroliza siguiendo el procedimiento que se indica en el apartado VII.2.3, se le denomina muestra N-1.

La muestra N-1 se hidroliza con ácido sulfúrico, se neutraliza con carbonato bórico y se desioniza por el paso a través de resinas de intercambio iónico. Todas estas operaciones se realizan tal como se indica en el apartado VII.2.3.

La disolución que resulta se lleva a un matraz aforado de 100 ml enrasándose a continuación con agua destilada. De esta disolución (N-1) se toman las fracciones alícuotas que se emplean en las determinaciones analíticas que a continuación se exponen.

a) Identificación de los azúcares por cromatografía de --
papel

Se toman 20 ml de la disolución N-1, se concentra en rotavapor hasta un volumen de 1 ml aproximadamente. En el concentrado se identifican los monosacáridos por cromatografía de papel (Whatman nº 1) siguiendo lo indicado en el apartado VII.2.4. Se detectan las manchas, cuyos valores R_G y colores con el reactivo revelador difenilamina-urea y ácido fosfórico son los siguientes: 1,86 (rosa), 1,49 (rosa brillante), 1,27 (rosa brillante), 1,00 (rosa brillante) y 0,81 (rosa brillante). Se identifican por lo tanto los siguientes azúcares: ramnosa, arabinosa, manosa, glucosa y galactosa de acuerdo con las mezclas de referencia.

Las razones por la que no se ha identificado la ramnosa son las mismas que se han expuesto anteriormente en el análisis por cromatografía de papel de la muestra M-1.

b) Determinación colorimétrica

Como en la muestra de "manzanilla" se han determinado de forma global los azúcares totales referidos a glucosa por el método colorimétrico de ~~la entrona-sulfúrico~~ de Roe (48).

Se toman 2 y 3 ml de la disolución N-1 y se llevan a dos matraces aforado de 50 ml, enrasándose con agua

destilada. A 1 ml de cada una de las disoluciones que resultan y que corresponden a 480 y 720 microgramos de sólido insoluble, se les denomina muestras N-1-1 y N-1-2.

La muestra N-1-1 y N-1-2 se someten al procedimiento indicado en el apartado III.2.5.3. Los valores medidos de absorbancia se llevan a la curva de calibrado de la figura 23, obteniéndose las correspondientes cantidades de glucosa. A continuación se calculan los porcentajes de azúcares referidos a glucosa de las muestras analizadas. Estos datos se exponen a continuación.

Muestra	Microgramos de sólido en 1 ml.	Absorbancia	Microgramos de glucosa en 1 ml.	Azúcares totales %(glucosa)
N-1-1	480	0,180	54	11,3
N-1-2	720	0,255	93	12,9
	<u>Valor medio</u>			12,1

c) Determinación cuantitativa por cromatografía gas-líquido

Una vez que se han identificado por cromatografía gas-líquido los componentes de las muestras, como se conoce de forma aproximada las cantidades en que se encuentran dichos azúcares en la muestra analizada, se procede a la formación de los derivados, es decir de los acetatos de alditol de la muestra N-1.

Se toman 20 ml de la disolución N-1 que corresponden a 240 mg de sólido insoluble. Se concentra en un rota

vapor hasta 5 ml aproximadamente, se le añaden 2 ml de -- una disolución de inositol que contiene 4 mg de esta sustancia y se somete al procedimiento general de formación de derivados descrito en el apartado VII.2.6.1.

Los derivados disueltos en cloroformo son inyectados en el cromatógrafo, desarrollándose tres cromatogramas.

A partir de los datos obtenidos en los cromatogramas realizados y que se exponen en la tabla XXXII, se calculan los porcentajes de los distintos azúcares en la --- muestra analizada, siendo estos los siguientes:

<u>Compuesto</u>	<u>Porcentaje</u>	
	<u>% de sólido residual</u>	<u>% de pulpa fresca</u>
Ramnosa	0,25	0,01
Arabinosa	4,29	0,19
Xilosa	2,96	0,13
Manosa	0,57	0,03
Glucosa	9,23	0,41
Galactosa	1,17	0,05
<u>Azúcares totales</u>	<u>18,46</u>	<u>0,82</u>

3.3. Resumen

Se ha realizado un estudio cualitativo y cuantitativo de los monosacáridos en hidrolizados de pulpa de aceitunas de las variedades "manzanilla" y "gordal", determinándose los siguientes azúcares: ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

Tabla XXXII

Muestra	Miligramos de sólido insoluble	Cromato grama.	Miligramos de rannosa	Miligramos de arabi-nosa.	Miligramos de xilosa.	Miligramos de manosa.	Miligramos de galacto-sa.	Miligramos de glucosa
N-1	240	nº 1	0,615	10,350	7,152	1,381	2,817	22,390
N-1	240	nº 2	0,608	10,400	7,147	1,376	2,794	22,030
N-1	240	nº 3	0,591	10,110	6,989	1,369	2,783	22,040
Valor medio			0,605	10,287	7,096	1,375	2,798	22,154

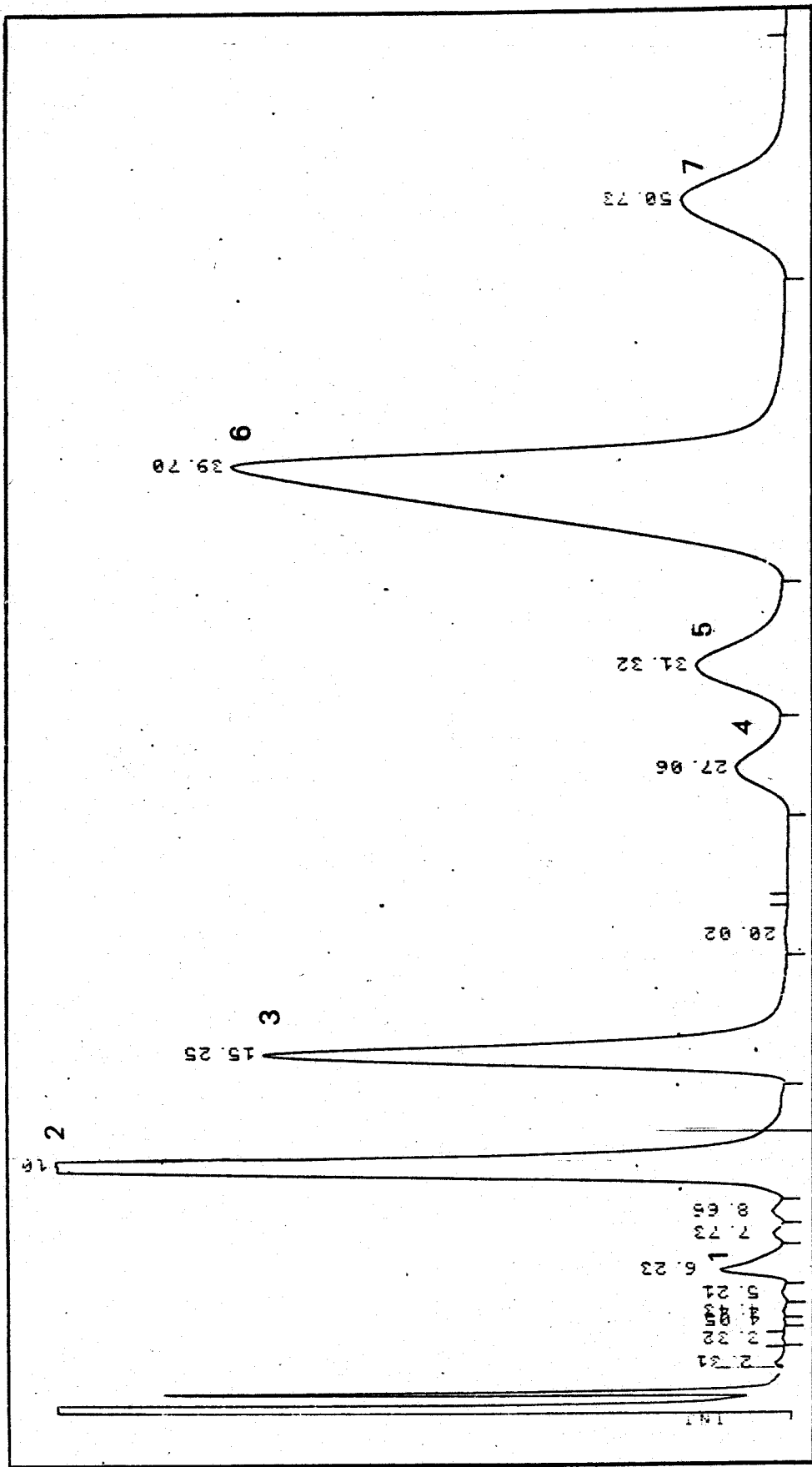


Fig. 26. Cromatograma gas-líquido de los acetatos de alditol de la muestra N-1 (variedad "gordal"). 1, ramosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, manosa; 5, galactosa; 6, glucosa; 7, inositol (patrón interno). Las características de la columna son las expuestas en la figura 24. Temperatura de la columna, 190º.

VIII. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

1. Identificación de azúcares en la pulpa de aceitunas

Hemos hecho un estudio analítico cualitativo, mediante cromatografía de papel, de los monosacáridos y disacáridos existentes en extractos de pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla". Las muestras corresponden a aceitunas verdes recogidas en los meses de agosto a noviembre.

En todos los extractos se han identificado: glucosa, fructosa, manitol y sacarosa, que se encuentran en cantidades apreciables.

Para identificar con precisión los azúcares que se encuentran en cantidades pequeñas fué necesario fraccionar los extractos concentrados mediante cromatografía sobre columnas de celulosa. De esta manera se han podido identificar en todas las muestras xilosa, dando como probable la existencia de ramnosa. También se han detectado algunos oligosacáridos.

Posteriormente se ha procedido a la identificación de los monosacáridos presentes en la pulpa en forma combinada, esto es formando parte de los polisacáridos. Este estudio se ha realizado por cromatografía de papel y ~~cromatografía gas-líquido~~ en los hidrolizados de la pulpa de aceitunas verdes de las variedades "manzanilla" y "gordal", previamente extraída con etanol acuoso al 80% y posteriormente con hexano y acetona. La cromatografía gas-líquido se ha efectuado mediante los acetatos de alditoles obteni-

dos previa reducción de los azúcares a polioles con boro--hidruro de sodio. El empleo de estos derivados fué posible al no existir fructosa en los hidrolizados de pulpa.

De esta manera se han identificado en las dos muestras analizadas los mismos monosacáridos: ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, glucosa y galactosa.

Nuestros resultados están de acuerdo con los obte--nidos por Sandret (9) que solo ha detectado la presencia -de glucosa, fructosa, manitol y sacarosa en aceitunas ver--des o poco maduras de las variedades "picolin marroquí", -"hojiblanca" y "gordal". Sin embargo están en desacuerdo -con los obtenidos por Petruccioli (10) que identifica en -aceitunas verdes de las variedades "canino", "carboncella", "frantoio", "leccino", "maurino", "moraiolo" y "morchiaio", además de estos azúcares, arabinosa, xilosa, manosa y ga--lactosa.

Estos monosacáridos, como se ha indicado anterior--mente, están presentes en la pulpa en cantidades aprecia--bles, pero no en forma libre, sino formando parte de los -polisacáridos, como este mismo autor también ha señalado -al detectarlos en los hidrolizados de la pulpa.

~~Es probable que las condiciones de estabilización~~
y extracción empleados por este autor hayan producido de--gradaciones en los polisacáridos, y por tanto la libera---ción de dichos monosacáridos.

La facilidad en la degradación de parte de los po--lisacáridos de la pulpa puede explicar que diversos auto--

res hayan detectado algunos de estos monosacáridos al trabajar con frutos muy maduros ó con alpechines (4, 6).

2. DETERMINACION ANALITICA DE LOS AZUCARES LIBRES Y DEL MANITOL EN EXTRACTOS DE PULPA DE ACEITUNAS.

2.1. Preparación de las muestras para su determinación cuantitativa

En los productos naturales se encuentran sustancias que pueden interferir la determinación de los azúcares. Esto hace necesario purificar previamente los extractos en los que se van a hacer las determinaciones analíticas. Numerosos autores aconsejan hacerlo mediante tratamiento con resinas de intercambio iónico.

En las aceitunas se encuentran muchas sustancias de caracter fenólico que pueden interferir los procedimientos volumétricos y colorimétricos, que se basan en reacciones de reducción. Para conseguir la eliminación de estas sustancias se aconseja la defecación con acetato neutro de plomo (83).

Nosotros hemos estabilizado y extraído la pulpa de las aceitunas deshuesadas por calentamiento con etanol acuoso al 80%. Posteriormente el etanol se elimina por evaporación, el residuo se trata con agua y se filtra para eliminar impurezas insolubles. El filtrado, en el que se encuentran los azúcares libres que se van a cuantificar, se purifica por defecación con acetato neutro de plomo y mediante tratamiento con resinas de intercambio iónico.

No se producen pérdidas de los azúcares cuando las muestras se han sometido a defecación con acetato neutro de plomo y cuando además se pasan a través de resinas Amberlita IR-120 H⁺ y IR-45 OH⁻ que posteriormente se lavan con un volumen igual a 15 veces el volumen del lecho. Esto se ha comprobado en las determinaciones efectuadas por cromatografía gas-líquido, descritas en el apartado VI, en las que no se observa variación de los porcentajes de los azúcares dentro de los límites admitidos.

Tabla XXXIX

Muestra Variedad Tratamiento Porcentajes en % de pulpa fresca

			<u>Glucosa</u>	<u>Fructosa</u>	<u>Manitol</u>	<u>Sacarosa</u>
J-1	"manzanilla"	ninguno	2,11	0,71	0,22	--
J-2	"	a	2,13	0,67	0,23	--
J-3	"	a y b	2,05	0,80	0,20	
K-1	"gordal"	ninguno	1,60	0,11	0,15	0,15
K-2	"	a	1,61	0,11	0,10	0,16
K-3	"	a y b	1,61	0,14	0,10	0,16

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

La tabla anterior también nos indica que en el método de la cromatografía gas-líquido los resultados no están influidos por el tratamiento de purificación utilizado.

Si se comparan los valores obtenidos por aplicación de métodos volumétricos, colorimétricos y enzimáticos (métodos globales), con los obtenidos por aplicación de los métodos de la cromatografía de papel y gas-líquido, observamos una mayor concordancia cuando las muestras han sido purificadas mediante defecación con acetato neutro de plomo y tratamiento con resinas de intercambio iónico.

Muestra	Tratamiento	Az. reduct.		Az. totales		Fructosa
		(1)	(2)	(1)	(3)	(4)
I-1	a	4,5	6,1	5,1	5,8	0,8
I-2	a y b	4,3	4,2	4,8	4,5	0,8

(1) Método de Lane-Eynon.

(2) Método de las sales de tetrazolio.

(3) Método del fenol-ácido sulfúrico.

(4) Método de la cisteina-ácido sulfúrico.

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

Los resultados obtenidos por cromatografía sobre papel son los siguientes:

Muestra	Tratamiento	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Az. red.	Az. Tot
I-2	a y b	3,23	0,63	0,21	3,86	4,07

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

La influencia del tratamiento es mayor cuando se emplea el método enzimático de la glucosa-oxidasa.

Muestra Tratamiento Porcentaje de glucosa, en % de pulpa fresco

		<u>Mét. enzimático</u>	<u>Met. cromatog.en pape</u>
G-1	ninguno	1,1	
G-2	a	1,4	
G-3	a y b	1,9	2,05

Tratamiento: a, defecación; b, paso por resinas.

2.2. Estudio comparativo entre los métodos globales y - cromatográficos

2.2.1. Azúcares reductores y azúcares totales

Los métodos estudiados por nosotros han sido: el método de Lane-Eynon, el de la antrona-ácido sulfúrico, el del fenol-ácido sulfúrico y el de las sales de tetrazolio. Los resultados que se recogen en la tabla XIII indican que los dos primeros son los que dan resultados más concordantes, y es por ello por lo que se analizan a continuación.

En la tabla XL se exponen los valores obtenidos empleando los métodos de Lane-Eynon y de la antrona-sulfúrico y se comparan con aquellos otros obtenidos por cromatografía de papel y cromatografía gas-líquido. Todas las muestras han sido previamente defecadas y tratadas con resinas de intercambio iónico.

De dichos valores se deduce que el método de Lane-Eynon no se puede emplear en la determinación de azúcares

Tabla XI

Muestra	Variedad	Porcentajes, en % de pulpa fresca			
		<u>Azúcares reductores</u>	<u>Azúcares totales</u>	<u>(1)</u>	<u>(2)</u>
F	"manzanilla"	3,8	3,57	--	3,8
G	"manzanilla"	3,2	2,49	--	3,2
H	"manzanilla"	4,4	--	4,30	4,4
I	"gordal"	4,3	3,86	--	4,8

(1) Método de Lane-Eynon.

(2) Método de la cromatografía de papel.

(3) Método de la cromatografía gas-líquido.

(4) Método de la antrona-ácido sulfúrico.

no reductores (sacarosa) pues los errores del método son del mismo orden que las proporciones en que se encuentra la sacarosa.

Para la determinación de sacarosa es necesario la separación de los componentes de las muestras y su posterior análisis cuantitativo (métodos de la cromatografía de papel y de la cromatografía gas-líquido).

Los porcentajes de azúcares reductores (método de Lane-Eynon), azúcares totales (método de la antrona-sulfúrico) concuerdan con los dados por los métodos cromatográficos.

El método de la antrona-sulfúrico aventaja al método de Lane-Eynon por su gran sensibilidad, ya que extractos de pulpa que correspondan a decenas de miligramos de pulpa pueden ser determinados por este método y también por la facilidad del procedimiento, que permite su automatización y utilización en el análisis rutinario.

2.2.2. Determinación de fructosa

Se ha utilizado el método de la cisteina-sulfúrico que determina la fructosa total, es decir la fructosa libre y la que se libera por hidrólisis de la sacarosa. Como en la pulpa de la aceituna la sacarosa se encuentra en pequeña proporción, este método se puede emplear en la determinación cuantitativa de la fructosa libre con ligeros errores por exceso.

En la tabla XLI se comparan favorablemente los resultados obtenidos por este método con aquellos otros que -

resultan al aplicar los métodos cromatográficos. Todas las muestras han sido previamente defecadas con acetato neutro de plomo y tratadas con resinas de intercambio iónico.

Tabla XLI

Muestra	Variedad	Porcentaje de fructosa en % de pulpa fresca.		
		(1)	(2)	(3)
F	"manzanilla"	1,2	1,10	-
G	"	0,5	0,44	-
H	"	1,4	-	1,33
I	"gordal"	0,8	0,63	-

(1) Método de la cisteína-sulfúrico.

(2) Método de la cromatografía sobre papel.

(3) Método de la cromatografía gas-líquido.

2.2.3. Determinación de glucosa

La determinación cuantitativa de glucosa en los extractos de pulpa sin una previa separación de dicha sustancia se ha realizado mediante la aplicación del método enzimático de la glucosa-oxidasa (50).

En la tabla XLIII se comparan los valores obtenidos con aquellos otros que resultan cuando se aplican los métodos cromatográficos, considerándolos bastante satisfactorios.

Las muestras han sido purificadas mediante defecación con acetato neutro de plomo y desionización con resinas de intercambio iónico.

Tabla XLIII

Muestra	Variedad	Porcentaje de glucosa, <u>en % de pulpa fresca.</u>		
		<u>(1)</u>	<u>(2)</u>	<u>(3)</u>
G	"manzanilla"	1,9	2,05	-
J	"	1,7	-	2,05
I	"gordal"	3,5	3,23	-
K	"	2,0	-	1,61

(1) Método enzimático de la glucosa-oxidasa.

(2) Método de la cromatografía de papel.

(3) Método de la cromatografía gas-líquido.

2.3. Resultados obtenidos por aplicación de los métodos cromatográficos a extractos de pulpa de aceitunas.

Como se ha indicado anteriormente mediante los métodos globales de la antrona-sulfúrico, de la cisteina-sulfúrico y de la glucosa-oxidasa se pueden determinar los azúcares totales, la fructosa y la glucosa respectivamente en extractos de pulpa de aceitunas. Es decir se analizan los azúcares totales y las dos sustancias que se encuentran en dichos extractos en cantidades considerables.

Para analizar la sacarosa es necesario el empleo de un método cromatográfico. Tanto la cromatografía de papel --

como la cromatografía gas-líquido son métodos apropiados en el análisis de dicha sustancia.

En el análisis de manitol, poliol que se encuentra en los extractos de pulpa en cantidades considerables, el método de la cromatografía de papel no se puede aplicar, ya que con la mayoría de los desarrolladores empleados en el análisis de azúcares, el manitol no se separa de la glucosa.

Con el desarrollador nitrometano-etanol-ácido acético-agua saturada de ácido bórico (8:1:1:1), donde se consigue la separación de dichas sustancias, el manitol tiene un avance cromatográfico similar al de la fructosa, sustancia también presente en los extractos de pulpa.

En resumen, el método de la cromatografía de papel se aplica favorablemente en la determinación cuantitativa de glucosa, fructosa y sacarosa en extractos de pulpa. Mientras que por cromatografía gas-líquido de los trimetilsilil derivados se pueden determinar además de estas sustancias el manitol.

En las tablas XLIII y XLIV se exponen los resultados obtenidos al aplicar los métodos de la cromatografía sobre papel y cromatografía gas-líquido a extractos de pulpa que han sido previamente defecados y desionizados.

De dichos resultados se deduce lo siguiente:

1.- La sacarosa aunque disminuye con el desarrollo y maduración del fruto, se encuentran en todo momento en pe

Tabla XLIII

Muestra	Variedad	Fecha de la toma de muestra.	Método cromato-gráfico empleado.	Porcentajes en tantos por ciento de pulpa fresca.			
				Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Manitol
H	"manzanilla"	10-8-1978	(1)	2,97	1,33	--	1,41
F	"	20-9-1977	(2)	2,47	1,10	0,18	--
J	"	20-11-1978	(1)	2,05	0,80	0,08	0,20
G	"	20-11-1977	(2)	2,05	0,44	0,13	--
I	"gordal"	20-9-1977	(2)	3,23	0,63	0,21	--
K	"	20-11-1978	(1)	1,61	0,14	0,16	0,10
L	"hojiblanca"	20-12-1978	(1)	1,83	0,12	0,21	0,18
LL	"verdial"	20-12-1978	(1)	1,48	0,14	0,11	0,20

(1) Método de la cromatografía gas-líquido.

(2) Método de la cromatografía sobre papel.

Tabla XLIV

Muestra	Porcentajes, en tantos por ciento de pulpa fresca.	Azúcares reductores		Fructosa
		Azúcares reductores	Azúcares totales	
H	4,30	--		0,31
F	3,57	3,75	0,95	0,31
J	2,85	2,93	0,97	0,28
G	2,49	2,62	0,95	0,18
I	3,86	4,07	0,95	0,16
K	1,75	1,91	0,92	0,08
L	1,95	2,16	0,90	0,06
II	1,62	1,73	0,94	0,09

queña proporción. Sus proporciones son de alrededor del 0,1 a 0,2% de pulpa fresca.

2.- Tanto la glucosa como la fructosa, azúcares mayoritarios en la pulpa de aceitunas, disminuyen al madurar el fruto. No obstante, la fructosa se encuentra en menor -- proporción que la glucosa y su disminución es más intensa a medida que el fruto se va acercando a su madurez.

La relación fructosa a azúcares reductores (fructosa/glucosa + fructosa) depende de la variedad y del desarrollo del fruto, lo cual está en desacuerdo con la constancia dada para esta relación por Sandret (9), que indicaba que -- estaba comprendida entre 0,40 y 0,45.

Estos resultados justifican el predominio de la -- glucosa dado por Marcelet (4) y el que Núñez y Spiteri (6) -- no encontraran fructosa en alpechines de aceitunas muy maduras.

3.- El manitol se encuentra en la pulpa de aceitunas antes de su maduración (en el momento del cambio del color verde a púrpura) en proporciones más bajas que las descritas en la literatura (9,12). Dichas proporciones son similares a las de la fructosa y sacarosa.

Es interesante señalar que la proporción de mani--tol en una muestra de la variedad "manzanilla" recogida el 10-8-1978 es del 1,4%, siendo la de la fructosa para esta -- misma muestra del 1,33%.

Todos estos datos apoyan la participación del manitol en la formación del aceite. Sandret (9) indicaba que dicha sustancia se transformaba previamente en fructosa ó manosa.

Parece posible la participación del manitol en la lipidogénesis mediante su transformación en fructosa.

4.- Los porcentajes de azúcares reductores y azúcares totales, en tantos por ciento de pulpa fresca, disminuyen progresivamente con el desarrollo del fruto. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Rodríguez de la Borbolla y col. (12).

5.- La relación azúcares reductores a azúcares totales es prácticamente constante para las variedades analizadas en los distintos momentos del desarrollo del fruto.

Los valores obtenidos para esta relación se encuentran alrededor de 0,95, algo superiores a los valores obtenidos por Sandret (9), que también indicaba que dicha relación se mantenía constante. Estos resultados también están de acuerdo con los de Petruccioli (10) y en desacuerdo con los obtenidos por Donaire y col. (34).

6.- En resumen, los frutos en el momento de su recolección para el aderezo contienen fundamentalmente glucosa (1,5 a 2,0%) y pequeñas cantidades de fructosa, sacarosa y manitol (sus proporciones son aproximadamente del 0,1 al 0,2%).

3. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS MONOSACARIDOS EN
HIDROLIZADOS DE PULPA

Como ya se ha indicado en el apartado VIII.1., se han estudiado los monosacáridos existentes en la pulpa - en forma combinada, esto es formando polisacáridos. Estos - se encuentran en el producto insoluble que queda al extraer la pulpa húmeda con etanol acuoso al 80% y posteriormente - con hexano y acetona. Este producto se hidroliza con ácido sulfúrico y en el hidrolizado se identifican los siguientes monosacáridos: ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

El único trabajo realizado sobre dichos hidrolizados se debe a Petruccioli (10). Este autor identifica directamente por cromatografía sobre papel en la pulpa de diversas variedades italianas los siguientes monosacáridos: arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa y fructosa.

El proceso que se ha seguido es el siguiente:

La pulpa de aceitunas se extrae sucesivamente con etanol acuoso al 80% y con hexano. En el caso de la muestra de la variedad "gordal" además ha sido extraída con acetona.

El material pulverulento que resulta después de -- las extracciones se hidroliza con ácido sulfúrico y en dicho hidrolizado se determinan cualitativa y cuantitativamente los monosacáridos.

La identificación se realiza en primer lugar mediante la cromatografía de papel descendente. Al no haberse detectado la presencia de fructosa se procede a la formación de los acetatos de los alditoles correspondientes siguiendo el procedimiento de Blake y Richards (73).

Estos derivados se emplean en la identificación y en la determinación cuantitativa de los monosacáridos en los hidrolizados de pulpa.

Los resultados de estas determinaciones son los siguientes:

Compuesto	<u>Porcentaje % de pulpa fresca</u>	
	<u>Muestra M</u> <u>"manzanilla"</u>	<u>Muestra N</u> <u>"gordal"</u>
Ramnosa	0,02	0,01
Arabinosa	0,25	0,19
Xilosa	0,09	0,13
Manosa	0,04	0,03
Galactosa	0,08	0,05
Glucosa	0,38	0,41
Azúcares neutros totales	0,86	0,82

Es decir los azúcares neutros totales en los hidrolizados de pulpa de aceitunas para las variedades "manzanilla" y "gordal" suponen el 0,86 y 0,82% de pulpa fresca respectivamente.

Los monosacáridos que forman parte de los polisacáridos de la pulpa son los mismos para las dos variedades -- analizadas y prácticamente se encuentran en las mismas cantidades, aunque se presentan pequeñas fluctuaciones en las proporciones de algunos de los monosacáridos analizados, -- siendo la ramnosa el que se encuentra en los hidrolizados -- en menor proporción.

IX. RESUMEN

En esta tesis se ha hecho un estudio cualitativo y cuantitativo de los azúcares que existen libres en la aceituna y de los monosacáridos que se encuentran en forma combinada como componentes de los polisacáridos.

En nuestro estudio se han utilizado muestras de aceitunas verdes de las variedades "manzanilla", "gordal", "hojiblanca" y "verdial" y las determinaciones se han realizado en distintas etapas del desarrollo del fruto.

Para poder realizar este estudio ha sido necesario perfeccionar las técnicas analíticas empleadas anteriormente e introducir otras de mayor precisión.

En el aspecto cualitativo se han estudiado la cromatografía sobre papel y la cromatografía de partición sobre columnas de celulosa, lo que ha permitido la identificación de componentes minoritarios.

En el aspecto cuantitativo se han puesto a punto los métodos fotolorimétricos de la antrona-ácido sulfúrico de Roe, del fenol-ácido sulfúrico y el del trifenilmetrazolio para la determinación de los azúcares totales y azúcares reductores.

También se han puesto a punto el método fotolorimétrico de la cisteina-ácido sulfúrico para la determinación de fructosa y el método enzimático de Hough-Jones para la cuantificación de glucosa.

En todos estos métodos se ha estudiado la influencia que tiene el tratamiento de purificación previo al que

se someten los extractos antes de ser analizados, comparándose los resultados que se obtienen con los que resultan cuando se emplean métodos más precisos, como son los de la cromatografía sobre papel y la cromatografía gas-líquido.

Se han puesto a punto métodos específicos, como son los de la cromatografía sobre papel y la cromatografía gas-líquido, que han sido utilizados por primera vez en la cuantificación de los azúcares presentes en los extractos de pulpa.

El método de la cromatografía sobre papel se ha aplicado a la determinación cuantitativa de glucosa, fructosa y sacarosa.

La cromatografía gas-líquido, empleando la trimetilsililación, se ha aplicado a la determinación de la glucosa, fructosa, sacarosa y manitol.

También se ha hecho un estudio cualitativo y cuantitativo de los monosacáridos existentes en los hidrolizados de pulpa de aceitunas de las variedades "manzanilla" y "gordal", previamente extraída con etanol acuoso al 80%, hexano y acetona. Este estudio se ha realizado por cromatografía gas-líquido utilizando el método de los acetatos de alditoles.

X. CONCLUSIONES

- 1º. Se han identificado en la pulpa de aceitunas de la variedad "manzanilla", glucosa, fructosa, manitol, -sacarosa, xilosa y ramnosa y se han detectado varios di y trisacáridos.
- 2º. Un estudio comparativo de los resultados obtenidos por los diferentes métodos utilizados demuestra:
- a) Que el método colorimétrico de la antrona-ácido sulfúrico de Roe es el más adecuado para la determinación de azúcares totales en extractos de pulpa.
 - b) Que el método fotocolorimétrico de la cisteina-ácido sulfúrico y el enzimático de Hough-Jones son específicos en la determinación de fructosa y glucosa respectivamente, sin que sea necesaria una separación previa de los componentes de la mezcla de azúcares.
 - c) Que para obtener resultados concordantes cuando se emplean los métodos fotocolorimétricos, el método volumétrico de Lane-Eynon y el enzimático de Hough-Jones, es necesario una purificación preliminar de los extractos que se analizan mediante defecación y tratamiento con resinas de cambio iónico.
- 3º. Un estudio comparativo de los resultados obtenidos mediante la cromatografía de papel y la cromatografía gas-líquido demuestra que el contenido en glucosa y fructosa disminuye al madurar el fruto. La fructosa se

encuentra en menor proporción que la glucosa y su disminución es más rápida a medida que el fruto se acerca a su madurez. La sacarosa disminuye también con el desarrollo del fruto y se encuentra siempre en pequeña proporción ($\approx 0,2\%$).

Las aceitunas en el momento de su recolección - para el aderezo contienen en su pulpa: glucosa (1,5 a 2%) y pequeñas cantidades de fructosa, manitol y sacarosa - ($\approx 0,1$ a $0,2\%$).

- 4º. Los porcentajes de azúcares reductores y azúcares totales disminuyen progresivamente con el desarrollo del fruto.

La relación de azúcares reductores a azúcares totales es prácticamente constante para las distintas variedades y etapas del desarrollo del fruto. Los valores obtenidos para esta relación están comprendidos entre 0,90 y 0,95. En cambio la relación fructosa a azúcares reductores no es constante, pues depende de la variedad y el grado de desarrollo del fruto.

- 5º. Se han identificado en los hidrolizados de pulpa de aceitunas de las variedades "manzanilla" y "gordal", previamente extraída con etanol acuoso al 80%, hexano y acetona, los siguientes monosacáridos: ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

6º. Se han determinado cuantitativamente los monosacáridos que se indican en el apartado anterior, mediante la cromatografía gas-líquido utilizando los acetatos de los correspondientes alditoles. Los porcentajes de los monosacáridos en una muestra de la variedad "manzanilla" son: ramnosa (0,02%), arabinosa (0,25), xilosa (0,09), manosa (0,04), galactosa (0,08) y glucosa (0,38).

Los porcentajes en una muestra de la variedad "gordal" son: ramnosa (0,01), arabinosa (0,19), xilosa (0,13), manosa (0,03), galactosa (0,05) y glucosa (0,41).

XI. BIBLIOGRAFIA

- (1) A. Vázquez; Grasas y aceites, 16, 292 (1965).
- (2) M.J. Fernández-Diez; "The Olive". Capítulo de la obra "The Biochemistry of fruits and their Products". Volumen nº 2, Academic Press, New York (1971).
- (3) E. Parisi y G. de Vito; Ann. chim. appl., 21, 323 (1931); Ibid, 24, 20 (1934).
- (4) H. Marcellet; Compt. rend., 207, 869 (1938).
- (5) R. Nuccorini; Ann. chim. appl., 20, 535 (1930); Ann. Sper. agrar. Roma, 17, 21 (1934).
- (6) G. Núñez y J. Spiteri, Bull. soc. chim. biol., 34, 904 (1952).
- (7) P.F. Nichols; J. Agr. Research, 41, 89 (1930).
- (8) G. Leoncini y F. Rogai; Boll. Ist. super. agrar., Pisa 8, 763 (1932); 10, 369 (1934); Ann. Sper. Agrar., Roma 17, 121 (1935).
- (9) F.G. Sandret; Oléagineux, 13, 459 (1958).
- (10) G. Petruccioli; Olearia, 19 (1-2), 5 (1965).
- (11) E. Ragazzi y G. Veronese; Ann. Chim. (Roma), 57 (11), 1386 (1967).
- (12) J. M^a Rodríguez de la Borbolla, M.J. Fernández-Diez y F. González Pellissó; Grasas y aceites, 6, 5 (1955).
- (13) E. Lederer y M. Lederer; "Chromatography", Elsevier Publishing Co., New York, 1957.
- (14) R. J. Block, E.L. Durrum y G. Zweig; "A manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", Academic Press. Inc., New York, 1964.

- (15) S.M. Partridge; *Biochem. J.*, 42, 238 (1948).
- (16) K. Paech y M.V. Tracey; "Modern Methods of Plant Analysis", Vol. 2, Springer-Verlang, Berlin (1955).
- (17) A. Jeanes, C.S. Wise y R.J. Dimler; *Anal. Chem.*, 23, 415 (1951).
- (18) K. V. Giri y V.N. Nigan; *J. Indian Inst. Sci.*, 36, 1 (1954).
- (19) P.A. García Ruiz, A. Soler y F. Barba; *An. Quim.*, 71, 391 (1975).
- (20) J.F. Robyt; *Carbohydr. Res.*, 40, 373 (1975).
- (21) P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini y A. Sartori; *J. Chromatog.*, 3, 343 (1960).
- (22) D.A.T. Southgate; "Determination of food carbohydrates" Applied Science Publishers Ltd., London, 1976.
- (23) J.K.N. Jones; *J. Chem. Soc.*, 1672 (1953).
- (24) W.E. Trevelyan, D.P. Procter y J.S. Harrison; *Nature*, 166, 444 (1950).
- (25) N. Albon y D. Gross; *Analyst*, 57, 554 (1950).
- (26) S.M. Partridge; *Nature*, 164, 443 (1949).
- (27) R.W. Bailey y E.J. Bourne; *J. Chromatog.*, 4, 206 (1960).
- (28) J.L. Buchan y R.I. Savage, *Analyst*, 77, 401 (1952).
- (29) R.W. Bailey; *J. Chromatog.*, 3, 5762 (1962).
- (30) O. Lüderitz y O. Westphal; *Z. Naturforsch.*, 7, 548 (1952).
- (31) L. Hough, J.K.N. Jones y W.H. Wadman; *J. Chem. Soc.*, 2511 (1949).

- (32) R.L. Whistler y J.N. BeMiller; *Methods Carbohyd. Chem.*, 1, 42 (1962).
- (33) J.P. Donaire, A.J. Sánchez, J. López-Gorge y L. Recalde *Phytochemistry*, 14, 1167 (1975).
- (34) J.P. Donaire, A.J. Sánchez, J. López-Gorge y L. Recalde *Agrochimica*, 21 (3-4), 311 (1977).
- (35) Folin-Malmros; *J. Biol. Chem.*, 83, 115 (1929).
- (36) L.C. Mokraak; *J. Biol. Chem.*, 208, 55 (1954).
- (37) A. Thompson y M.L. Wolfson; *Methods Carbohyd. Chem.*, 1, 3 (1962).
- (38) J.D. Phillips y A. Pollard; *Nature*, 171, 41 (1953).
- (39) R.A. Laidlaw y S.G. Reid; *J. Sci. Food Agr.*, 3, 19 (1952).
- (40) B.G. Chan y J.C. Cain; *J. Chromatog.*, 22, 95 (1966).
- (41) J.H. Lane y L. Eynon; *J. Soc. Chem. Ind. (London)*, 42, 32T (1923).
- (42) L. Eynon y J.H. Lane, *J. Soc. Chem. Ind. (London)*, 50, 85 (1931).
- (43) H. Fehling; *Ann.*, 72, 106 (1849).
- (44) B. Herstein; *J. Am. Chem. Soc.*, 32, 779 (1910).
- (45) R.A. Fairbridge, K.I. Willis y R.G. Booth; *Biochem. J.*, 49, 423 (1951).
- (46) M. Dubois, K.A. Gilles, F.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith; *Nature*, 168, 10 (1951).

- (47) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith; Anal. Chem., 28, 350 (1956).
- (48) J.H. Roe; J. Biol. Chem., 212, 335 (1955).
- (49) Z. Dische y A. Devi; Biochim. et Biophys. Acta, 39, 140 (1960).
- (50) L. Hough y J.K.N. Jones; Methods Carbohyd. Chem., 1, 400 (1962).
- (51) A. Heredia Moreno; Grasas y aceites, 27, 1 (1976).
- (52) C.S. Wise, R.J. Dimler, H.A. Davis y C.E. Rist; Anal. Chem., 27, 33 (1955).
- (53) R.J. Dimler, W.C. Schaefer, C.S. Wise y C.E. Rist; Anal. Chem., 24, 1411 (1952).
- (54) R.L. Whistler y J.L. Hickson; Anal. Chem., 27, 1514 (1955).
- (55) S.G. Sunderwirth, G.G. Olson y G. Johnson; J. Chromatog., 16, 176 (1964)
- (56) G. Hehl; Z. Anal. Chem., 266, 268 (1973).
- (57) R. Dreywood; Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18, 499 (1946)
- (58) D.I. Morris; Science, 107, 254 (1948).
- (59) H.K. Barrenscheen y T. Valyi-Nagy; Z. Naturforsch., 4b, 203 (1949).
- (60) C.M. Wilson; Anal. Chem., 31, 1199(1959).
- (61) H. El Khadem y W. Girris; Anal.Chem., 33, 645 (1961)
- (62) M.C. Jarvis y H.J. Dunson; J. Chromatog., 92, 454 (1974)

- (63) J.S. Sawardeker, J.H. Sloneker y A. Jeanes; Anal. Chem., 37, 1602 (1965).
- (64) C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita y W.W. Wells; J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963).
- (65) C.C. Sweeley, M. Makita, R. Bentley y W.W. Wells; Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 14 (1963).
- (66) C.T. Bishop; Advanc. Carbohyd. Chem., 19, 95 (1964).
- (67) J.H. Sloneker; "Biomedical Applications of Gas Chromatography", H.A. Szymanski, ed., Plenum Press, New York, 2, 87 (1968).
- (68) K.M. Brobst y C.E. Lott Jr.; Cereal Chem., 43, 35 (1969).
- (69) P.K. Davison y R. Young; J. Chromatog., 41, 12 (1969).
- (70) K.M. Brobst y C.E. Lott, Jr.; Amer. Soc. Brew. Chem., Proc., 71 (1966).
- (71) L. Marinelli y D. Whitney; J. Inst. Brew., 73, 35 (1967).
- (72) J.F. Saeman, W.F. Moore, R.L. Mitchell y M.A. Millett; Tappi, 37, 336 (1954).
- (73) J.D. Blake y G.N. Richards; Carbohyd. Res., 14, 375 (1970).
- (74) R.J. Alexander y J.T. Garbutt; Anal. Chem., 37, 303 (1965).
- (75) J. Kagan y J.J. Mabry; Anal. Chem., 37, 288 (1965).
- (76) O. Bethage, C. Larstrom y S. Juhlin; Svensk Papperstid 68, 60 (1965).

- (77) H.E. Brower, J.E. Jeffery y M.W. Folsom; Anal. Chem., 38, 362 (1966).
- (78) S.W. Gunner, J.K.N. Jones y M.B. Perry; Chem. Ind. (London), 255 (1961).
- (79) S.W. Gunner, J.K.N. Jones y M.B. Perry; Can. J. Chem. 39, 1892 (1961).
- (80) E. Sjostrom, P. Haglund y J. Janson; Svensk Papperstidn 69, 381 (1966).
- (81) E.P. Crowell y B.B. Burnett; Anal. Chem., 39, 121 - (1967).
- (82) J.H. Sloneker; Methods Carbohyd. Chem., 6, 20 (1972).
- (83) Association of Official Analytical Chemists (1975). Official Methods of Analysis, 12 th edition, AOAC, Washington, D.C.

I N D I C E

I.	<u>INTRODUCCION</u>	5
II.	<u>MONOSACARIDOS Y OLIGOSACARIDOS EN LA PULPA- DE ACEITUNAS DE LA VARIEDAD "MANZANILLA". IDENTIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE PAPEL..</u>	10
II.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	11
II.2.	MATERIAL Y METODOS	12
II.2.1.	Aceitunas	12
II.2.2.	Extracción de monosacáridos y oligosacáridos	13
II.2.3.	Identificación de azúcares por cromatografía sobre papel	14
II.2.4.	Separación de monosacáridos y oligosacáridos por cromatografía sobre columnas de celulosa y columnas de carbón	24
II.3.	ANALISIS DE LAS MUESTRAS	26
II.3.1.	Muestra A	26
II.3.2.	Muestra B	28
II.3.3.	Muestra C	32
II.3.4.	Muestra D	34
II.3.5.	Muestra E	35
II.4.	RESULTADOS	38
III.	<u>DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES DE LA PULPA. METODOS VOLUMETRICOS Y COLORI- METRICOS.....</u>	39
III.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	40
III.2.	MATERIAL Y METODOS	42
III.2.1.	Aceitunas	42
III.2.2.	Extracción de mono y oligosacáridos	42

III.2.3.	Tratamiento de purificación previo a las determinaciones cuantitativas	42
III.2.3.1.	Defecación	43
III.2.3.2.	Tratamiento con resinas de intercambio iónico	44
III.2.4.	Determinación de azúcares reductores	44
III.2.4.1.	Método de Lane-Eynon	44
III.2.4.2.	Método de las sales de tetrazolio	47
III.2.5.	Determinación de azúcares totales	52
III.2.5.1.	Método de Lane-Eynon	52
III.2.5.2.	Método del fenol-ácido sulfúrico	52
III.2.5.3.	Método de la antrona-ácido sulfúrico	57
III.2.6.	Determinación de fructosa	59
III.3.	ANALISIS DE LAS MUESTRAS	68
III.3.1.	Muestra F	68
III.3.2.	Muestra G	70
III.3.3.	Muestra H	71
III.3.4.	Muestra I	73
III.3.5.	Resumen	75
IV.	<u>DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA EN LA PULPA. METODO ENZIMATICO.</u>	77
IV.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	78
IV.2.	MATERIAL Y METODOS	79
IV.2.1.	Aceitunas	79
IV.2.2.	Extracción de mono y oligosacáridos	79
IV.2.3.	Tratamiento de purificación previo a las de terminaciones cuantitativas	79
IV.2.4.	Método analítico	79

IV.2.4.1.	Reactivos	80
IV.2.4.2.	Solución de tris-glicerol buffer, de pH 7..	81
IV.2.4.3.	Reactivo glucosa-oxidasa	81
IV.2.4.4.	Procedimiento de análisis	81
IV.2.4.5.	Curvas de calibrado	81
IV.3.	ANALISIS DE LAS MUESTRAS	89
IV.3.1.	Muestra G	89
IV.3.2.	Muestra J	91
IV.3.3.	Muestra I	92
IV.3.4.	Muestra K	93
IV.3.5.	Resumen	94
V.	<u>DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA, FRUC-</u> <u>TOSA Y SACAROSA EN LA PULPA. METODO DE LA -</u> <u>CROMATOGRAFIA DE PAPEL</u>	95
V.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	96
V.2.	MATERIAL Y METODOS	97
V.2.1.	Aceitunas	97
V.2.2.	Extracción de mono y oligosacáridos	97
V.2.3.	Tratamiento de purificación previo a las - determinaciones cuantitativas	98
V.2.4.	Técnica cromatográfica	98
V.2.5.	Ensayos cromatográficos previos	98
V.2.6.	Curvas de calibrado	101
V.2.6.1.	Preparación y desarrollo de los cromatogra- mas	101
V.2.6.2.	Localización y extracción de los azúcares - en los cromatogramas	103

V.2.6.3.	Determinación colorimétrica	105
V.2.6.4.	Curva de calibrado de la glucosa	105
V.2.6.5.	Curva de calibrado de la fructosa	107
V.2.6.6.	Curva de calibrado de la sacarosa	112
V.3.	ANALISIS DE LAS MUESTRAS	114
V.3.1.	Muestra F	114
V.3.2.	Muestra G	122
V.3.3.	Muestra I	126
V.3.4.	Resumen	130
VI.	<u>DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA, FRUC-</u> <u>TOSA, SACAROSA Y MANITOL EN LA PULPA. METODO</u> <u>DE LA CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO</u>	132
VI.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	133
VI.2.	MATERIAL Y METODOS	134
VI.2.1.	Aceitunas	134
VI.2.2.	Extracción de mono y oligosacáridos	135
VI.2.3.	Tratamiento de purificación previo a las - determinaciones cuantitativas	135
VI.2.4.	Método	135
VI.2.4.1.	Procedimiento	137
VI.2.4.2.	Instrumentación y condiciones cromatográ- ficas	137
VI.2.4.3.	Análisis previo	138
VI.2.4.4.	Calibrado	139
VI.3.	ANALISIS DE LAS MUESTRAS	147
VI.3.1.	Muestra H	148

VI.3.2.	Muestra J	150
VI.3.3.	Muestra K	155
VI.3.4.	Muestra L	164
VI.3.5.	Muestra LL	167
VI.3.6.	Resumen	174
VII.	<u>DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE</u> <u>AZUCARES EN HIDROLIZADOS DE PULPA</u>	176
VII.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	177
VII.2.	MATERIAL Y METODOS	177
VII.2.1.	Aceitunas	178
VII.2.2.	Tratamiento de purificación previo a las - determinaciones cuantitativas	178
VII.2.3.	Hidrólisis ácida	179
VII.2.4.	Identificación de azúcares por cromatogra- fía sobre papel	182
VII.2.5.	Determinación espectrofotométrica	183
VII.2.6.	Identificación y determinación cuantitativa de los azúcares por cromatografía gas-líqui- do	187
VII.2.6.1.	Procedimiento	188
VII.2.6.2.	Instrumentación y condiciones cromatográfi- cas	189
VII.2.6.3.	Análisis previo	190
VII.2.6.4.	Calibrado	192
VII.3.	ANALISIS DE LAS MUESTRAS	193
VII.3.1.	Muestra M	193
VII.3.2.	Muestra N	200

VII.3.3.	Resumen	203
VIII.	<u>DISCUSION DE LOS RESULTADOS</u>	206
VIII.1.	IDENTIFICACION DE AZUCARES EN LA PULPA DE ACEITUNAS	207
VIII.2.	DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES LIBRES Y DEL MANITOL EN EXTRACTOS DE PULPA DE ACEITUNAS	209
VIII.2.1.	Preparación de las muestras para su determinación cuantitativa	209
VIII.2.2.	Estudio comparativo entre los métodos globales y cromatográficos	212
VIII.2.2.1.	Azúcares reductores y azúcares totales ..	212
VIII.2.2.2.	Determinación de fructosa	214
VIII.2.2.3.	Determinación de glucosa	215
VIII.2.3.	Resultados obtenidos por aplicación de los métodos cromatográficos a extractos de pulpa de aceitunas	216
VIII.3.	DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS MONOSACARIDOS EN HIDROLIZADOS DE PULPA	222
IX.	<u>RESUMEN</u>	225
X.	<u>CONCLUSIONES</u>	228
XI.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	232
	<u>INDICE</u>	239

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Manuel Rivas Cuevas
titulada "Azúcares en aceites verdes"

acordó otorgarle la calificación de _____

Sevilla, 10 de Julio 1.980

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

