

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN
DE AZUCARES REDUCTORES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO
RENDIMIENTO (HPLC) EN JUGOS DE CAÑA Y ESTUDIO COMPARATIVO
CON EL MÉTODO VOLUMETRICO LANE Y EYNON EN EL LABORATORIO
DE CALIDAD DEL INGENIO DEL CAUCA S.A.S**

MELIZA NORIEGA ARAGÓN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN
DE AZUCARES REDUCTORES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO
RENDIMIENTO (HPLC) EN JUGOS DE CAÑA Y ESTUDIO COMPARATIVO
CON EL MÉTODO VOLUMETRICO LANE Y EYNON EN EL LABORATORIO
DE CALIDAD DEL INGENIO DEL CAUCA S.A.S**

MELIZA NORIEGA ARAGÓN

Trabajo de grado en modalidad de práctica profesional presentado como
requisito parcial para optar el título de químico

Director

EDIER HUMBERTO PEREZ Ph.D.

Director Grupo de Investigación Agroquímica

Asesor

DIANA LORENA PERLAZA

Laboratorio de Calidad Incauca S.A.S

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

Nota de Aceptación

Director _____
Edier Humberto Pérez Ph.D.

Jurado _____
René Zúñiga Rengifo Ms.C.

Jurado _____
Ricardo Benítez Benítez Ph.D.

Fecha de sustentación: 20 de Diciembre de 2017

DEDICATORIA

A Dios por bendecir y fortalecer mi vida en cada momento, por su bondad y amor infinito.

A la Niña María de Caloto Cauca por los milagros y favores recibidos.

A mis padres César Noriega y Aidely Aragón por su amor incondicional, apoyo, comprensión y acompañamiento en cada paso que doy.

A mi hermana Laura Noriega por su compañía y colaboración en este proceso.

A mis abuelos Ananías Noriega, Eucaris Agudelo y Edelmira Chará, por su gran amor y preocupación por mi bienestar.

Al profesor Edier Humberto Pérez por su colaboración, enseñanza y dedicación.

A mis compañeros de carrera, Diana Correa, Juanjo Tobar, Leydi Conú, Alex Jiménez, Yina Bazante, Alexis Muelas, Andres Parra y Eymi Ramirez.

A mis amigos Alexandra Vásquez y Duvan Chocó gracias por su compañía y amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia quienes han sido mi motor, apoyo y ayuda incondicional, gracias por su paciencia e infinito amor.

Al profesor Edier Humberto Pérez Ph.D., por su guía, enseñanza, dedicación, motivación y acompañamiento en este proceso.

A la profesora Claudia Ximena Martínez M.Sc., por su enseñanza y contribución en mi formación profesional.

A la universidad del Cauca y el departamento de Química.

Al grupo de investigación Agroquímica.

A mis profesores, por poner un granito de arena en mi formación académica y profesional. Gracias a aquellos profesores que con su vocación me hicieron amar con más fuerzas esta línea de las ciencias exactas, la Química.

Al laboratorio de Calidad de Conformidad del ingenio Incauca S.A.S, a la Jefe Amalfi Otero, por recibirme y permitirme realizar la práctica profesional en su prestigioso laboratorio, a la Analista Diana Lorena Perlaza, por su asesoría, enseñanza y tiempo dedicado.

A los jurados por su recepción y colaboración en el mismo.

A mis compañeros del grupo de investigación Agroquímica; Leydi Conú, Alexander Jiménez, Eymi Ramirez, Diana Gomez, Andres Parra, Rafael Solano, Ximena Prieto, Yeferson Valencia, por su colaboración y momentos compartidos.

A mis compañeros de carrera Alexis Muelas, Diana Correa, Juanjo Tobar, Yina Bazante, gracias por tantos momentos de felicidad, angustia y trasnochadas.

A mis amigos Alexandra Vásquez y Duvan Chocó por su apoyo, compañía y palabras de motivación.

Finalmente quiero agradecer a todas y cada una de las personas que de una u otra manera fueron partícipes y me brindaron su colaboración desinteresadamente en la realización de este trabajo.

Muchas gracias por todo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN	2
2 FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	3
2.1 Generalidades del Proceso de Producción de Azúcar	3
2.2 Jugos de Caña de Azúcar	6
2.3 Políticas de Calidad	7
2.4 Validación	7
2.5 Figuras de Merito Analítico	8
2.5.1 Linealidad.....	8
2.5.2 Sensibilidad	9
2.5.3 Límites.....	10
2.5.4 Precisión	11
2.5.5 Exactitud	11
2.5.6 Incertidumbre.....	12
2.6 Análisis Estadístico	14
2.6.1 Pruebas de Normalidad	14
2.6.2 Pruebas Paramétricas.....	15
2.6.3 Pruebas no Paramétricas	16
2.7 Azucares	17
2.7.1 Sacarosa	18
2.7.2 Inversión de la Sacarosa	18
2.7.3 Glucosa	19
2.7.4 Fructosa	19
2.8 Azucares Reductores	20
2.8.1 Descomposición de Azucares Reductores	22
2.9 Métodos para la Determinación de Azucares Reductores Totales...	23
2.9.1 Método de Lane y Eynon	23
2.9.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento [10].....	24
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo General	28

4.2	Objetivos Específicos	28
5	METODOLOGÍA	29
5.1	Reactivos, Materiales y Equipos	29
5.2	Implementación y Validación para análisis de Azúcares Reductores Totales	30
5.2.1	Preparación de curvas de calibración	30
5.2.2	Validación del sistema instrumental	30
5.3	Implementación y Validación de la metodología para determinación de Azúcares Reductores Totales	31
5.3.1	Análisis de jugos de caña por HPLC	31
5.4	Comparación Estadística de los Métodos Lane & Eynon y HPLC en el Análisis del Porcentaje de Azúcares Reductores	32
5.4.1	Análisis de muestras por el método Lane y Eynon	32
5.5	Análisis estadístico de los resultados	32
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
6.1	Implementación para Análisis de Azúcares Reductores Totales	33
6.1.1	Preparación de Soluciones	33
6.1.2	Pruebas de Normalidad	33
6.1.3	Evaluación de la Sensibilidad y Linealidad Instrumental	37
6.1.4	Precisión Instrumental	40
6.1.5	Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación	43
6.2	Implementación y Validación de la metodología para determinación de Azúcares Reductores Totales	45
6.2.1	Linealidad	45
6.2.2	Exactitud y Precisión	45
6.2.3	Análisis de Muestras por HPLC	46
6.2.4	Estimación de la incertidumbre en la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa mediante la metodología de fuentes globales.	47
6.3	Comparación Estadística de los Métodos Lane & Eynon y HPLC en el Análisis del Porcentaje de Azúcares Reductores Totales	50
7	CONCLUSIONES	52
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS	55

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNICOS

ANOVA Análisis de varianza

ATR's Azúcares reductores totales

b Intercepto de la curva en el eje Y

CV Coeficiente de variación

EXT Extracción

F Cociente de dos varianzas

g Gramos

gl Grados de libertad

Ha Hipótesis alternativa

H₀ Hipótesis nula

HPLC Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

ICONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación

ICUMSA International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis

Comisión Internacional de Métodos Uniformes de Análisis del Azúcar

ISO International Organization for Standardization

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

LMP Límite Máximo permitido

LOD Límite de detección

LOQ Límite de cuantificación

m Pendiente de la curva

n Número de lecturas o valores observados

No Número

NTC Norma técnica colombiana.

p Significancia

P/P Peso/Peso

PGC Proceso de gestión de calidad.

R Recuperación

RID Detector de índice de refracción

r Coeficiente de correlación.

r² Coeficiente de regresión.

RSD Desviación estándar relativa.

RSDt Desviación estándar relativa total.

S Desviación estándar.

S.A.S Sociedad Anónima Simplificada

Sig Significancia.

SIGIN Sistema para la Gestión Industrial

SM Standard Methods.

SPSS Statistical Product and Service Solutions.

SRp Desviación estándar relativa de los recuperados.

t Valor estimado de la t de student

U Incertidumbre.

URP Incertidumbre de recuperación promedio

Xp Promedio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Gráfica para la determinación del rango lineal, b) Curva de calibración respuesta vs concentración	8
Figura 2. Variación de la pendiente, a una mayor pendiente mejor discriminación de datos.	10
Figura 3. Estructura de la sacarosa	18
Figura 4. Estructura de la Glucosa	19
Figura 5. Estructura de la Fructosa	19
Figura 6. Equilibrio del tautomerismo ceto-enol de la molécula de glucosa.....	20
Figura 7. Mecanismo de formación del carbanión.....	20
Figura 8. Mecanismo de reconversión a la forma Ceto	21
Figura 9. Mecanismo de formación del enol	21
Figura 10. Tautomerismo de la molécula de glucosa	22
Figura 11. Reacción de Fehling	24
Figura 12. Equipo de HPLC utilizado en los análisis.....	26
Figura 13. Curva de Calibración para linealidad: a. Sacarosa, b. Glucosa, c. Fructosa	37
Figura 14. Curva de Calibración: a. Sacarosa para Límites Críticos, b. Glucosa para Límites Críticos, c. Fructosa para Límites Críticos.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos para la elaboración de las curvas de calibración para Sacarosa, Glucosa y Fructosa, todos los patrones a un volumen de 50mL.....	30
Tabla 2. Diseño experimental para la implementación de la metodología para determinar ATR's	31
Tabla 3. Concentración de Sacarosa, Glucosa y Fructosa para cada solución patrón.....	33
Tabla 4. Resultados de curvas de calibración de Sacarosa, Glucosa y Fructosa	34
Tabla 5. Prueba de normalidad en función del día, sacarosa, glucosa y fructosa, Shapiro-wilk	34
Tabla 6. Prueba de normalidad en función del nivel de concentración, sacarosa, glucosa y fructosa, Shapiro-wilk (P).....	35
Tabla 7. Prueba ANOVA, el día como variable independiente	35
Tabla 8. Prueba ANOVA, nivel de concentración como variable independiente	36
Tabla 9. Prueba de Ducan.....	36
Tabla 10. Pendientes, Interceptos y Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental para el método de determinación de sacarosa, glucosa y fructosa).....	38
Tabla 11. Correlación de Pearson, Regresión lineal	38
Tabla 12. Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto	39
Tabla 13. ANOVA para evaluar la Regresión lineal en las curvas de calibración.	39
Tabla 14. Curvas de calibración bajo condiciones de Repetibilidad	40
Tabla 15. Evaluación de Curvas de calibración bajo condiciones de Precisión Intermedia.....	41
Tabla 16. Precisión Instrumental Bajo Condiciones de Repetibilidad y Precisión Intermedia.....	42
Tabla 17. Calculo del Límite de Detección y Cuantificación	44
Tabla 18. Exactitud y Precisión del método.....	45
Tabla 19. Prueba estadística de homogeneidad de varianza sacarosa, glucosa y fructosa.	46
Tabla 20. Exactitud y Precisión para la metodología global en la determinación de ATR's con Base en la Mediana.....	46
Tabla 21. Resultados de análisis de muestras de la validación	47
Tabla 22. Contribución de las fuentes aleatorias.....	47
Tabla 23. Estimación de la contribución de las fuentes sistemáticas sacarosa, glucosa y fructosa.....	48
Tabla 24. Evaluación de la significancia entre el factor 1 y el factor de recobro sacarosa, glucosa y fructosa.....	48
Tabla 25. Calculo de la incertidumbre del método.....	49

Tabla 26. Contribución de las fuentes de incertidumbre de sacarosa, glucosa y fructosa	49
Tabla 27. Comparación de los métodos HPLC y Fehling para la determinación de ATR's, calculando t.....	51
Tabla 28. Comparación de los métodos HPLC y Fehling para la determinación de ATR's, calculando F	51

RESUMEN

La determinación de azúcares reductores totales (ATR's) por HPLC es una metodología recomendada en el libro de métodos ICUMSA [1] como método oficial estándar, que se está implementado en las industrias azucareras del mundo, con el fin de brindar información real, oportuna, precisa y confiable, que demuestra la calidad de las condiciones del proceso y del producto terminado.

En el presente trabajo se implementa y valida una metodología para la determinación del contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en jugos de caña, por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), En el laboratorio de calidad de conformidad del Ingenio del Cauca S.A.S., esta técnica permite la separación de los azúcares, mediante una columna Hi-Plex de intercambio de ligandos que ofrecen una resolución superior facilitando así, una adecuada separación y cuantificación.

De manera experimental se determinaron los valores estadísticos que sirvieron como criterios de confianza y aceptación en la metodología implementada, tales como: Precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre y porcentaje de recuperación. Todo lo anterior cumpliendo con los requisitos de la NTC ISO 9001 versión 2008 [2] y los procedimientos del sistema de calidad de conformidad del laboratorio.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 23, para el respectivo tratamiento y análisis de los resultados.

La metodología validada para HPLC cumplió con los parámetros estadísticos requeridos como linealidad y precisión instrumental registrando coeficientes de variación menores al 5%, un límite de cuantificación de 0,001% para sacarosa y glucosa y 0,002% para fructosa y porcentajes de recuperación entre el 95,1 y 103,0% logrando validar una metodología sensible y lineal bajo los parámetros trabajados.

Los resultados obtenidos por la técnica implementada HPLC, se comparan estadísticamente con los resultados calculados por el método tradicional volumétrico Lane y Eynon, en el cual se aprovecha el poder reductor que tienen los azúcares para su cuantificación. En la comparación se determina que el método HPLC es más exacto y preciso para la determinación de azúcares reductores.

Palabras Claves: Azúcares Reductores Totales, HPLC, Lane y Eynon, Jugos de Caña

1 INTRODUCCIÓN

En la industria azucarera, los laboratorios de control de calidad deben velar por suministrar información precisa y confiable, siendo esta, un indicativo de la calidad de las condiciones del proceso y del producto terminado. Por ello, certificar que los métodos utilizados sean lo suficientemente fiables para generar un resultado, se convierte en un problema crítico ante cualquier tipo de análisis.

La materia prima utilizada para la producción de azúcar, es el jugo caña, que es analizado por el laboratorio de control de calidad del ingenio azucarero para su procesamiento, entre los análisis realizados es prioritario la determinación de azúcares reductores, que son compuestos orgánicos, generados por el desdoblamiento de la sacarosa a glucosa y fructosa durante el proceso de cristalización y separación de la sacarosa provocando pérdidas y disminuyendo el rendimiento y cantidad de azúcar obtenido.

La sacarosa puede ser invertida por efecto enzimático o físico-químico en sus azúcares reductores, glucosa y fructosa. Su poder reductor se debe al grupo carbonilo que queda libre en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto mediante diversos métodos, entre los cuales el más utilizado en los ingenios azucareros es el método de Lane y Eynon también conocido como Fehling, en el cual, mediante una reacción redox entre los azúcares reductores y el sulfato de Cobre (II) las soluciones de esta sal tienen color azul y tras la reacción con los azúcares reductores se forma óxido de Cobre (I) de color rojo. De este modo, el cambio de color indica que se ha producido la reacción y que, por lo tanto, el azúcar reductor está presente. [3]

El método Fehling proporciona una medida aproximada en la concentración de azúcares reductores totales (ATR's) en jugos de caña, y es empleado en la industria para dar cumplimiento a los requisitos comerciales. Actualmente la industria mundial azucarera tiene el reto de suministrar información de calidad, por tal razón el ingenio del Cauca está implementando el método de determinación de ATR's por HPLC, debido a que brinda una mayor exactitud en los resultados, por su selectividad y especificidad para estos azúcares.

La separación de los sacáridos por HPLC tiene lugar cuando los azúcares de bajo peso molecular como sacarosa, glucosa y fructosa presentes en la muestra son transportados por la fase móvil hacia la columna de intercambio de ligandos y pueden entrar en los poros de la resina y los grupos hidroxilos presentes en los carbohidratos interactúan con los contraiones (Ca^{2+}) de la resina por afinidad, dando como consecuencia la elución de las especies en tiempos diferentes de acuerdo a la fuerza con que sean retenidas por la resina, logrando su separación para su posterior detección y cuantificación por índice de refracción.

2 FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Generalidades del Proceso de Producción de Azúcar

La savia de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*,) contiene alrededor de 17% de sacarosa, un carbohidrato disacárido de fórmula general $C_{12}H_{22}O_{11}$, compuesto de los monosacáridos D-glucosa y D-fructosa que se condensan en grupos glucosídicos, formado por un proceso fotosintético de asimilación. Mediante el proceso de extracción realizado en Ingenios azucareros, se obtiene el jugo de caña, que es purificado por medios físicos y químicos, evaporando luego el agua y separando los cristales de azúcar por medio de centrifugas para obtener finalmente el azúcar comercial refinado, que contiene alrededor de 99.99% de sacarosa. [3]

En el ingenio se inicia el proceso con el muestreo de la caña de azúcar que viene del corte, para determinar su contenido de azúcar, su calidad y hacer los estimativos de producción. Una vez tomada la muestra, los vehículos transportadores pasan por básculas electrónicas de pesado y posteriormente son descargados en las mesas alimentadoras. [4]

Preparación de Caña: Las mesas entregan la caña a conductores que la envían a dos tandems de molinos los cuales poseen desfibradoras que fraccionan la caña para romper la corteza y facilitar la extracción del jugo en los molinos.

Molienda: Cada tandem está compuesto por seis molinos y cada molino se compone de cuatro mazas. Estas mazas son cilindros de gran tamaño que se encargan de comprimir la caña para extraer el jugo. El residuo llamado bagazo va pasando de un molino a otro para extraer la mayor cantidad de jugo posible.

Al material que sale de cada molino se le adiciona jugo del molino inmediatamente siguiente, para lograr extraer la mayor cantidad de sacarosa de la caña. Antes que el bagazo pase por el último molino, se le agrega agua con el propósito de mejorar la extracción de jugo y sacarosa.

El jugo extraído se hace pasar por sistemas de filtración, por mallas encargadas de separar la mayor cantidad de bagacillo del jugo, enviando el jugo crudo hacia el proceso y retornando el bagacillo a los molinos.

En el último molino se obtiene un material llamado bagazo el cual contiene bajo contenido de sacarosa y humedad.

Generación de Vapor: Aproximadamente el 10% del bagazo generado en el proceso de molienda es vendido para la producción de papel.

El bagazo restante es enviado a las calderas para ser utilizado como combustible en la generación de vapor.

Incauca S.A.S cuenta con cuatro calderas para la generación de 750.000 Lb/h de vapor. 2 de ellas consumen sólo bagazo y generan vapor vivo a presión de 275 psi y 575 °F, las otras dos calderas consumen una mezcla de carbón y bagazo y generan vapor vivo a 650 psi y 750 °F.

Generación de Energía Eléctrica: El vapor vivo generado se utiliza en los turbogeneradores, que producen la energía eléctrica que requiere la fábrica y un excedente que es vendido a la red pública.

Sulfitación, Pesaje y Alcalización: El jugo extraído en molinos pasa por las básculas para su pesaje, con el propósito de evaluar el rendimiento del proceso y la cantidad de jugo que resulta de la caña procesada.

Posteriormente se preencala con la adición de lechada de cal viva, que neutraliza la acidez natural del jugo para evitar la inversión de sacarosa y se envía hacia un primer calentamiento (65°C) para posteriormente realizar el proceso de sulfitación y la segunda alcalización.

El proceso de sulfitación se hace con el fin de evitar la producción de compuestos coloreados, como las sales férricas, durante los procesos siguientes. El azufre es quemado para producir dióxido de azufre (SO₂) que se pone en contacto con el jugo por medio de eyectores. Después de la sulfitación, el jugo es alcalizado hasta un pH de 7,4 – 7,6.

Calentamiento y Clarificación: El jugo alcalizado pasa a la siguiente etapa de calentamiento para activar las reacciones entre la cal y los óxidos de fósforo presentes en el jugo y precipitar las impurezas orgánicas e inorgánicas.

Posteriormente, el jugo es alimentado a un clarificador rápido de bajo tiempo de retención en el que las impurezas del jugo se precipitan por la acción de la gravedad. El proceso de clarificación, se ayuda con la adición de floculante como, ácido fosfórico, que al entrar en contacto con el jugo agrupa las impurezas y las precipita.

Filtración: Los lodos sedimentados en el clarificador, se conducen a la estación de filtros con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de sacarosa que contienen.

La filtración consiste en tomar los lodos y adicionarle bagacillo (partícula fina de bagazo) para darle mayor consistencia y mejorar la filtrabilidad. Esta mezcla se procesa en los filtros con el objetivo de separar las impurezas en forma de torta llamada cachaza de la parte líquida (jugo filtrado). Para facilitar la extracción de sacarosa de los lodos, se adiciona agua caliente sobre la torta de cachaza, para lavarla y llevarse el material azucarado con el jugo filtrado.

La cachaza es enviada al proceso de compostaje para la producción de abonos orgánicos y el jugo filtrado es retornado al proceso de calentamiento de jugo para ser reprocesado en la clarificación.

Evaporación: El jugo clarificado se bombea a un sistema de evaporación de quintuple efecto para eliminarle parte del agua que contiene. Por medio de vapor y el vacío, los evaporadores concentran el jugo desde 15 a 68 – 70 °Brix, dando como resultado la meladura o jarabe.

Además, el vapor generado por la evaporación del agua en estos equipos es la fuente de calor para los demás procesos que lo necesitan: Calentamiento de Jugo y Cristalización.

Clarificación de Meladura: La meladura pasa por un proceso de clarificación por flotación. Este es un proceso donde se le adiciona a la meladura ácido fosfórico, cal y floculante para coagular. Teniendo en cuenta que las partículas que se deben extraer en este proceso son livianas, se le burbujea aire micronizado para hacer flotar las impurezas y removerlas.

Cristalización y Centrifugación: Para la producción de azúcar a partir de la meladura se utiliza un sistema de dos plantas o etapas. Las diferentes plantas se elaboran en los tachos, evaporadores de simple efecto que trabajan al vacío, que pueden ser batch o continuos.

En la primera etapa la meladura se pone en contacto con núcleos de azúcar (grano pequeño de azúcar) bajo condiciones controladas de temperatura y Brix. Tales núcleos generan puntos de cristalización de la sacarosa que contiene la meladura, creciendo hasta el tamaño deseado del azúcar a producir.

Debido a que los granos de azúcar se encuentran inmersos en el material líquido de la meladura que no se cristalizó, se envía hacia las centrifugas para separarlos, obteniendo el azúcar comercial y una miel de la primera etapa (miel A). En esta etapa se utiliza agua caliente para lavar el cristal y bajar el color del azúcar resultante.

La miel A se alimenta a una segunda etapa de cristalización, utilizando como núcleo suspensión alcohólica (mezcla de azúcar pulverizada y alcohol isopropílico) para inducir la formación de cristales a partir de la sacarosa contenida en ella, obteniendo la masa B. Esta masa se envía a otra etapa de centrifugación para separar los pequeños cristales de azúcar (semilla B) de la miel Generada (miel B).

Los pequeños cristales de azúcar resultantes de esta etapa (semilla B) son los núcleos utilizados en la primera etapa de cristalización.

La miel B se envía a la destilería como materia prima para la producción de alcohol por su alto contenido de azúcares fermentables.

Secado, Envase y Almacenamiento: El azúcar producido en la primera etapa de cristalización sale con una humedad menor al 1% y se debe secar antes de envasarlo, para tal fin, se hace pasar por secadoras rotatorias en las que se ponen en contacto en contracorriente el azúcar húmedo y aire seco, para disminuir el contenido de humedad del azúcar.

El azúcar seco y frío se lleva a tolvas que alimentan a las envasadoras de azúcar en las diferentes presentaciones con que se surten los mercados nacional e internacional. Una vez envasado el azúcar se lleva a las bodegas de producto terminado donde se almacena y se carga en vehículos para su distribución.

Sin embargo, no todo el azúcar generado en la centrifugación es secado y envasado, ya que Incauca S.A. cuenta con una moderna Refinería que procesa un 60 a 90% del azúcar que sale de las centrífugas, con el objetivo de producir azúcar con menores niveles de color e impurezas. [4]

El diagrama del proceso de producción de la caña de azúcar se puede observar en el anexo A.

2.2 Jugos de Caña de Azúcar

La extracción del jugo moliendo caña entre pesados rodillos o mazas, constituye la primera etapa del procesamiento del azúcar, la molienda eficiente extrae más del 95% del azúcar contenido en la caña y este porcentaje se conoce como extracción de sacarosa o Pol de extracción.

El jugo color verde oscuro procedente de los molinos es ácido y turbio. El proceso de clarificación cuyo objetivo principal es remover las impurezas tanto solubles como insolubles, emplea en forma universal cal y calor como agentes clarificantes. La solución de cal neutraliza la acidez natural del jugo, formando sales insolubles de calcio, en su mayor parte fosfatos de calcio. El calentamiento del jugo alcalizado hasta el punto de ebullición o ligeramente por encima, coagula la albúmina y algunas grasas, ceras y gomas; el precipitado así formado atrapa los sólidos en suspensión al igual que las partículas más finas. [5]

El jugo clarificado, presenta más o menos la misma composición que el jugo extraído, excepto las impurezas precipitadas por el tratamiento con cal, contiene aproximadamente 85% de agua, el cual, es purificado por medios físicos y químicos, evaporando luego el agua y separando los cristales de azúcar para obtener finalmente el azúcar comercial que contiene un alto porcentaje de sacarosa.

La producción de azúcar se basa en la capacidad que tiene la sacarosa de cristalizar, a partir de una meladura espesa, mientras que la glucosa y la fructosa permanecen disueltas. En este proceso se presentan pérdidas las cuales se pueden estimar determinando algunas características físico-químicas en los jugos. [5]

Pureza: La relación de la lectura del polarímetro (Pol) con los grados brix permite determinar la pureza de una solución en términos de sacarosa. [6]

Pol: Los azúcares diluidos gozan de la propiedad de desviar el plano de vibración de la luz polarizada. Esta propiedad se utiliza en la industria azucarera para determinar la riqueza de los jugos de caña mediante un polarímetro, de donde se deriva la expresión de POL; el polarímetro envía un rayo de luz polarizada, que es una luz con un ancho de banda estrecha en un plano de dirección, a través de una solución de sacarosa y mide la rotación de la luz después de pasar por el líquido. El valor de rotación resultante estima el % de sacarosa en el jugo mediante fórmulas y tablas ya establecidas. [6]

Grados Brix: Los °Bx determinan la concentración de sólidos disueltos en una solución de sacarosa, basándose en una relación entre los índices refractivos a 20°C y el % de masa total de sólidos solubles de una solución acuosa de sacarosa pura. [3]

Azúcares Reductores: Son el producto intermedio de la descomposición de la sacarosa, su análisis en jugos es utilizado como un parámetro para determinar la calidad de la caña que ingresa al ingenio azucarero e influyen en el desarrollo posterior del proceso de extracción, además, son el índice más empleado para la detección de pérdidas en jugos. [3]

2.3 Políticas de Calidad

Con el fin de garantizar a sus clientes y proveedores productos de la mejor calidad, bajo los más altos estándares de higiene y seguridad, así como una mayor eficiencia y productividad en los procesos, el ingenio del Cauca se ha certificado en la producción de azúcares, que aseguran no sólo la calidad de sus productos, sino también el compromiso que ha adquirido con el País.

Sello de calidad ICONTEC a los azúcares

Certificación de Aseguramiento de la Calidad ISO 9001 versión 2008.

Certificación del Sistema de Gestión ambiental ISO 14001 versión 2004. [7]

2.4 Validación

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. [8]

Para este trabajo se propone realizar una validación menor, puesto que se trata con métodos normalizados y se adecúan haciendo mínimas modificaciones o ninguna.

2.5 Figuras de Merito Analítico

Para demostrar objetivamente que se cumple con los requisitos exigidos para cada uno de los métodos se realiza la determinación estadística de figuras analíticas de mérito como son: intervalo de respuesta lineal, linealidad, sensibilidad, LOQ, LOD, precisión, y exactitud. [8]

2.5.1 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar un gráfico de respuesta vs concentración, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajo de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el intervalo lineal (fig.1a). Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la curva de trabajo o curva de calibración (fig.1b). Graficar los datos de concentración de la lectura observada (Y) vs los estándares de calibración estimados (X). [8]

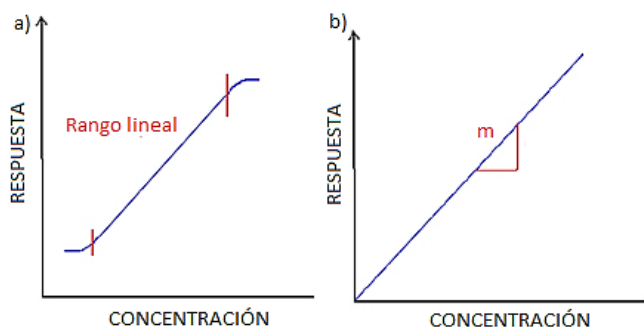


Figura 1. a) Gráfica para la determinación del rango lineal, b) Curva de calibración respuesta vs concentración

Evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: pendiente (m), coeficiente de correlación (r), punto de corte (intercepto) con el eje de la ordenada (b).

$$Y = mx + b$$

Ecuación 1

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación:

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1 . El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando $r=0$, no existe correlación alguna, por lo que existiría independencia total de los valores X e Y. [8]

En la práctica si r tiene un valor cercano a uno (1), esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a $0,999$, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que $0,99$.

Se evaluará una curva de calibración en la cual se realiza una evaluación estadística de prueba t-Student, como un mejor indicador del modelo lineal. Se calcula un valor de t con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0,05$), dos-colas, en este caso para un "n" (observaciones) que depende de los niveles de calibración.

Se desea probar si existe entonces una correlación significativa: La hipótesis nula H_0 es que no existe correlación entre X e Y. Si el valor observado de t_r es mayor que t_{cri} , se rechaza la hipótesis nula H_0 , siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada. [8]

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

t_r = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación.

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación.

$n - 2$ = Número de grados de libertad.

r^2 = Valor del coeficiente de determinación.

2.5.2 Sensibilidad

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. [8]

En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.

Se calcula como:

$$m = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / n} \quad \text{Ecuación 3}$$

El valor de sensibilidad obtenido (m) debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura.

En la figura 2, se puede observar que mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas (m_3). En el caso de (m_1) grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura.

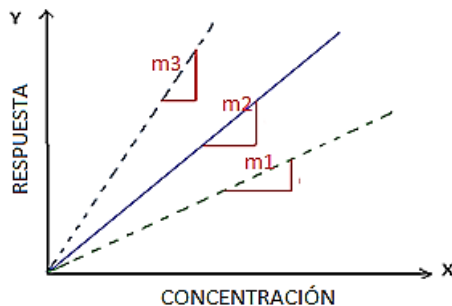


Figura 2. Variación de la pendiente, a una mayor pendiente mejor discriminación de datos.

Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. [8]

2.5.3 Límites

Límite de cuantificación: Es la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. El LOQ se expresa mediante la ecuación 4. [9][10]

$$\text{LOQ} = \frac{10S_b}{m_{\text{promedio}}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde m_{promedio} es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas; S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas y se puede estimar ya sea por el análisis de un número apropiado de muestras de blanco (muestra sin analito o con concentración cercana a cero) o a partir de los interceptos de las curvas realizadas.

Límite de detección: El límite de detección se define como la menor concentración de un elemento en la solución que se puede detectar con un 95%

de certeza, por lo tanto, la concentración que produce una desviación igual a 3 veces la desviación estándar de un conjunto de lecturas se puede definir como el límite de detección. Históricamente se ha definido como la concentración de un analito que produce la desviación de la línea base de un registrador gráfico que es igual al doble del pico de la línea base. Este parámetro es una cifra teórica y no debería tratar de medirse rutinariamente. También es definido en la Ecuación 5. [11][12]

$$\text{LOD} = \frac{3 S_b}{m_{\text{promedio}}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y m_{promedio} es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

2.5.4 Precisión

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados.[8]

- **Repetibilidad:** Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra homogénea, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto de tiempo (mismo día). El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación. [11][12]
- **Precisión Intermedia:** Resultados obtenidos dentro del laboratorio por el mismo analista, con los mismos equipos, en un intervalo largo de tiempo (días distintos) y con la misma muestra homogénea. [9][10]

2.5.5 Exactitud

Refleja la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero. La exactitud mide el error sistemático del método y se puede expresar en términos del porcentaje de error o porcentaje de recuperación. Es la proximidad entre el resultado de una medición y la media de un conjunto de datos.

Se puede medir a partir de la comparación de los valores obtenidos por medio de las metodologías disponibles, respecto a los emitidos por la empresa proveedora de las soluciones, o por medio del porcentaje de recuperación o de error. [9][10]

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Resultado Obtenido Experimental}}{\text{Resultado Real Esperado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

2.5.6 Incertidumbre

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al medurado. [8] [9] [13]

La determinación de la incertidumbre incluye generalmente 4 pasos, el primero corresponde a la determinación de las fuentes, el segundo en expresar los componentes en una incertidumbre estándar, el tercero combinar las diferentes incertidumbres y el cuarto paso es la determinación de la incertidumbre expandida es decir, multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura (k) = 2, a fin de entregar un 95% de confianza, y así establecer el intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se pueden atribuir razonablemente al medurado.

En algunos casos pueden existir mayores exigencias en cuanto al valor del factor de cobertura utilizado para obtener la incertidumbre expandida, pudiéndose solicitar o requerir un $k=3$, a fin de entregar un 99,7 % de confianza, esto generalmente se puede solicitar frente a determinados contaminantes o residuos.

Para demostrar que un método analítico es adecuado para el fin previsto, el laboratorio deberá demostrar a través de una evidencia objetiva que el método analítico ha sido adecuadamente validado o verificado. [8][13]

- Cálculo de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuentes globales de incertidumbre

Se calcula con base en los resultados de evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, de la siguiente forma: [14]

Se calcula inicialmente el promedio de los resultados obtenidos tanto a concentraciones bajas de analito, como a altas concentraciones mediante la ecuación 7.

$$X_{prom} = \frac{\sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación 7}$$

Se calcula la desviación de los resultados obtenidos aplicando ecuación 8.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Posteriormente se calcula la desviación estándar relativa de cada grupo de datos Ecuación 9

$$RSD = \frac{S}{X_{prom}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Finalmente, mediante ecuación 10 se calcula la Desviación Estándar Relativa del total de datos ($RSDt$).

$$RSDt = \sqrt{\frac{\left(\left(\left(\frac{S_1}{X_{p1}} \right)^2 X(n-1) \right) + \left(\left(\frac{S_2}{X_{p2}} \right)^2 X(n-1) \right) \right)}{(n-1)_1 + (n-1)_2}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Y adicionalmente se calcula la recuperación en función de porcentajes ($\%R$) de los patrones con base en la ecuación 11.

$$\%R = \frac{\text{Concentración Experimental Obtenida}}{\text{Concentración Real Preparada}} * 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

Se calcula el promedio de los porcentajes de recuperación con la ecuación 12.

$$\bar{R}_p = \frac{\sum \%R_i}{n} \quad \text{Ecuación 12}$$

La desviación estándar de los recuperados (SRp) con ecuación 13.

$$SRp = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 13}$$

También se debe calcular la incertidumbre en la recuperación promedio, mediante la ecuación 14:

$$U_{SRp} = \frac{SRp}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia (α) del 5% y un nivel de confianza del 95%, para (n-1)

grados de libertad (gl). Para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1.

Se establece la hipótesis nula (H_0). El factor de recobro no es significativamente diferente de 1.

Se calcula el t experimental (t_{exp}) (ecuación 15) y se compara con el t crítico (t_{crit}).

Si $t_{exp} > t_{crit}$ se rechaza la H_0 .

Si $t_{exp} < t_{crit}$ se acepta la H_0 .

$$t_{exp} = \frac{|R-1|*\sqrt{n}}{S} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde t_{exp} es el t experimental; R es el factor de recobro experimental; S es la Desviación estándar y n es el número de datos.

La incertidumbre se calcula mediante las ecuaciones 16,17 y 18.

Incertidumbre Combinada Total ($U_{c_{total}}$).

$$U_{c_{total}} = \sqrt{\left(\left(\frac{U_{Rp}}{Rp}\right)^2 + RSDt^2\right)} \quad \text{Ecuación 16}$$

Incertidumbre Expandida del Método ($U_{exp\ met}$) (\pm).

$$U_{exp\ met} = 2 * U_{c_{total}} \quad \text{Ecuación 17}$$

La incertidumbre expandida en la medición $U(\pm)$ se expresa:

$$U = \mp C * U_{exp\ met} \quad \text{Ecuación 18}$$

2.6 Análisis Estadístico

Este análisis se realizará mediante el paquete estadístico SPSS versión 23.0, un software que facilita el análisis estadístico de los datos, como su ilustración gráfica. Entre las pruebas más utilizadas aplicadas para el análisis de datos están:

2.6.1 Pruebas de Normalidad

La distribución normal es, probablemente, la distribución teórica más importante en estadística y sirve como punto de referencia para describir cómo se

distribuyen muchos de los datos de los análisis que realizamos. Se utilizan dos pruebas, la de Shapiro-Wilk para un tamaño de muestra menor o igual a 50, y la prueba de Kolmogorov-Smirnov que se utiliza para número de datos mayores a 50. Ambas pruebas permiten contrastar la hipótesis nula que indica que los resultados de los análisis proceden de poblaciones normales. Rechazaremos la hipótesis de normalidad cuando el nivel crítico o significancia (Sig.) sea menor que el nivel de significación establecido (generalmente 0,05). Cuando los valores presentan una distribución normal, se acepta la hipótesis nula y se aplican pruebas paramétricas. Cuando ocurre lo contrario, se aplican pruebas no paramétricas. [8]

2.6.2 Pruebas Paramétricas

Son pruebas de hipótesis estadísticas que asumen cierto comportamiento de muestras obtenidas aleatoriamente, distribución normal de las observaciones y donde existe un parámetro de interés que buscamos estimar. [9]

- **Análisis de Varianza (ANOVA) de un Factor:** El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés, la hipótesis es evaluada de la siguiente forma: Si el nivel crítico asociado al estadístico F es menor que 0,05, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no se puede rechazar la hipótesis de igualdad y no se puede afirmar que los grupos comparados difieran en sus promedios poblacionales.[9][10]
- **Prueba de Tukey – Prueba de Duncan:** Son test de comparaciones múltiples. Permiten comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Estas pruebas permiten definir grupos entre un conjunto de datos. [9][10]
- **Prueba T:** Esta Prueba permite contrastar hipótesis con base a una media poblacional, ajustándose a un modelo de distribución de probabilidad t de student cuando la población muestreada es normal. [8]
- **Prueba T Para Muestras Independientes:** Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes. Si la

probabilidad asociada al estadístico de Levene es mayor que 0,05, podremos suponer que las varianzas poblacionales son iguales; si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es menor que 0,05, rechazaremos la hipótesis de igualdad de varianzas y supondremos que son distintas.

- **Prueba T Para Muestras Relacionadas:** Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias relacionadas. Si el valor del nivel crítico $< 0,05$ se rechaza la hipótesis de igualdad de medias.
- **Coefficiente de Correlación de Pearson (r):** Es una prueba paramétrica que mide el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas, tomando valores entre -1 y +1. Los valores próximos a +1 indican una fuerte asociación lineal positiva; los valores próximos a -1 indican una fuerte asociación lineal negativa; valores próximos a 0 indican que no existe asociación lineal entre las variables. [8]

2.6.3 Pruebas no Paramétricas

Una prueba no paramétrica es una prueba de hipótesis que no requiere que la distribución de la población se caracterice en función de determinados parámetros. Por ejemplo, numerosas hipótesis se basan en el supuesto de que la población sigue una distribución normal con los parámetros μ y σ . Las pruebas no paramétricas no tienen este supuesto, de modo que son útiles cuando sus datos sean firmemente no normales y resistentes a transformaciones. [9]

Como pruebas no paramétricas se tiene:

- **Prueba de Kruskal Wallis:** Es un método para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Esta prueba es paralela al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Para determinar las diferencias significativas se aplica la prueba U de Mann-Whitney.
- **Prueba de U Mann Whitney:** Es una excelente alternativa a la prueba t sobre diferencia de medias cuando: 1) no se cumplen los supuestos en los que se basa la prueba t (normalidad y homocedasticidad), o 2) no es apropiado utilizar la prueba t porque el nivel de medida de los datos es ordinal.
- **Coefficiente de Correlación de Spearman:** Es una prueba que mide la asociación o interdependencia entre dos variables discretas medidas, al menos una de ellas, en escala ordinal. Los valores próximos a +1 indican una correlación fuerte y positiva. Los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa. Los valores próximos a 0 indican que no hay correlación lineal. [8]

- **Análisis de Regresión Lineal Simple:** En estadística, la regresión lineal o ajuste lineal es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente Y , las variables independientes X_i y un término aleatorio ε . El procedimiento implica, básicamente, obtener la ecuación mínimo-cuadrática que mejor expresa la relación entre la variable dependiente y la variable independiente y estimar mediante el coeficiente de determinación la calidad de la ecuación de regresión obtenida.

2.7 Azúcares

Los azúcares tienen una fórmula general $(CH_2O)_n$, donde oxígeno e hidrógeno se encuentran en la misma proporción que en el agua, de ahí su nombre clásico de hidratos de carbono, aunque su composición y propiedades no corresponde en absoluto con esta definición. Pueden clasificarse como azúcares sencillos (monosacáridos) o complejos (disacáridos, polisacáridos).

Los monosacáridos son sólidos, cristalinos, incoloros, solubles en agua y de sabor dulce. Químicamente son polihidroaldehydos o polihidroacetonas y responden a la fórmula empírica $(CH_2O)_n$, en la que n tiene un valor igual o mayor que 3, siendo los más frecuentes los de 5 y 6 átomos de carbono.

Presentan en todos sus carbonos un grupo hidroxilo (-OH) excepto en uno, en el cual lleva un grupo carbonilo ($-C=O$). Si el grupo carbonilo se encuentra al final de la cadena el monosacárido es un aldehído, y se denomina aldosa. Si se encuentra en un carbono secundario es una cetona, y se llama cetosa. La mayoría de los monosacáridos poseen uno o más átomos de carbono asimétricos y son, por tanto, moléculas quirales; propiedad de los azúcares que ocasionan la rotación del plano de luz polarizada y la cual permite la determinación de la presencia de azúcares en jugos y productos de la fabricación de azúcar.

Algunos azúcares tienen la propiedad de oxidarse en presencia de agentes oxidantes suaves como el ion Fe^{+3} o Cu^{+2} . Esta característica radica en la presencia de un grupo carbonilo libre, el cual es oxidado y genera un grupo carboxilo. Por lo tanto, aquellos azúcares con un grupo carbonilo libre son llamados azúcares reductores y aquellos en los que el grupo carbonilo se encuentra combinado en unión glucosídica se conocen como azúcares no reductores. Entre los azúcares reductores más comunes se encuentra la glucosa, fructosa, lactosa y maltosa que presentan un carbono libre en su estructura y pueden reducir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas.

[5]

2.7.1 Sacarosa

La sacarosa, disacárido obtenido de la caña de azúcar, la remolacha y otras fuentes, es un componente importante de la dieta humana, como tal y en combinación en diversos alimentos comerciales, ver figura 3.

La sacarosa no contiene átomo de carbono anomérico libre; los de ambas hexosas se hallan unidos entre sí. La sacarosa, por tanto, no experimenta mutrorrotación ni es un azúcar reductor. Se hidroliza con más facilidad que los otros disacáridos. La hidrólisis de la sacarosa a D-glucosa y D-fructosa se denomina frecuentemente inversión, ya que va acompañada de un cambio neto de rotación óptica, de dextrógira a levógira. La hidrólisis de la sacarosa, que también es catalizada por el enzima invertasa, puede seguirse mediante un polarímetro. [15]

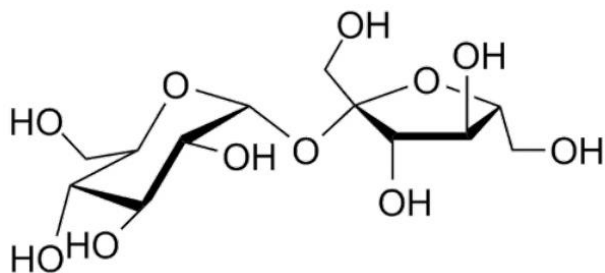
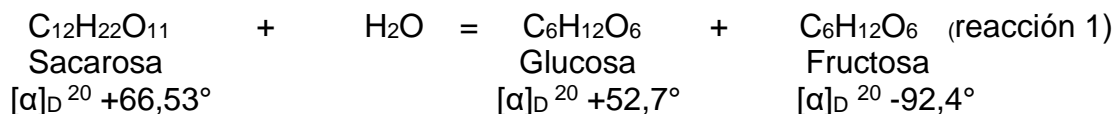


Figura 3. Estructura de la sacarosa

2.7.2 Inversión de la Sacarosa

La sacarosa se hidroliza con facilidad en soluciones ácidas a velocidades que aumentan notablemente según el aumento de la temperatura y disminución del pH, con liberación de los monosacáridos constituyentes, reacción 1



A esta reacción hidrolítica se aplica generalmente el nombre de inversión, porque produce un cambio en la actividad óptica dextrógira propia de la sacarosa a una actividad neta levógira, equivalente a $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -39,7^{\circ}$ de los productos de la reacción.

La mezcla equimolar de glucosa y fructosa que se forma es conocida generalmente como “azúcar invertido” por extensión de la terminología que se aplica a la reacción de la Hidrólisis.

2.7.3 Glucosa

La glucosa es metabólicamente el azúcar más importante en las plantas y animales. Sólo en la porción en crecimiento activo de la planta el contenido de glucosa excede el de la sacarosa. Al comienzo de la zafra el contenido de glucosa del jugo es alto y disminuye con la madurez. A pesar de que cantidades iguales de glucosa y fructosa están implicadas en la hidrólisis y condensación de la sacarosa, la relación de estas, raras veces es igual en el jugo crudo.

La fórmula empírica de la glucosa $C_6H_{12}O_6$ y el peso molecular es 180,2 g/mol. La glucosa es menos soluble en agua que la sacarosa; es soluble en etanol e insoluble en éter. Las moléculas de glucosa se condensan de diferente manera para formar almidón, dextrana y celulosa. [15]

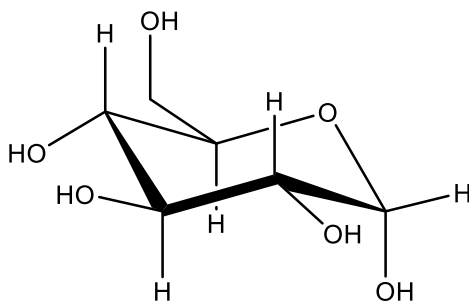


Figura 4. Estructura de la Glucosa

2.7.4 Fructosa

Conocida como azúcar de frutas. La fructosa es más dulce que la sacarosa y la glucosa; de las tres es la menos abundante en la caña. A semejanza de la glucosa, es más abundante en las partes en crecimiento de la planta y menos abundante en la parte inferior del tallo y las raíces. La fructosa disminuye en la maduración y puede ser imposible de detectar en algunas variedades de alta pureza en la madurez.

La fórmula empírica de la fructosa es la misma que la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y el peso molecular es de 180,2 g/mol. La fructosa es muy soluble en agua y ligeramente soluble en etanol. Igual que la glucosa, la fructosa es un azúcar reductor, pero posee un grupo cetona en lugar de un grupo aldehído. [16]

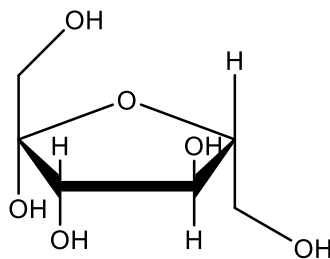


Figura 5. Estructura de la Fructosa

2.8 Azúcares Reductores [17]

Los monosacáridos existen principalmente en forma cíclica, pero debido a que están en equilibrio con la forma de cadena abierta, el grupo carbonilo presente en ellos podrá dar positiva varias de las pruebas para el reconocimiento de aldehídos y cetonas. Así los carbohidratos pueden ser oxidados con facilidad para producir los ácidos carboxílicos correspondientes, por ello, se denominan azúcares reductores (reductor porque el azúcar reduce al agente oxidante). Ver reacción en la figura 6.

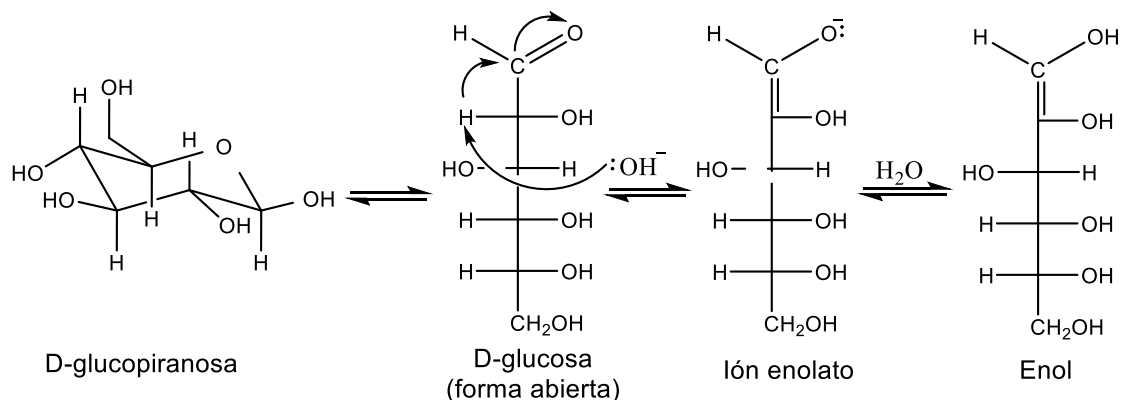


Figura 6. Equilibrio del tautomerismo ceto-enol de la molécula de glucosa

Debido a la presencia del grupo carbonilo, los átomos de hidrógeno unidos al carbono alfa de los compuestos carbonílicos muestran propiedades débilmente ácidas. La acidez de dichos hidrógenos es debida a la estabilización por resonancia del anión (ion enolato) que resulta de la disociación de un hidrógeno alfa. La estructura contribuyente al híbrido en resonancia del ion enolato posee un átomo de carbono con un par de electrones no compartidos y una carga negativa.

Un anión con tales características se le llama **carbanión**, ver reacción en la figura 7:

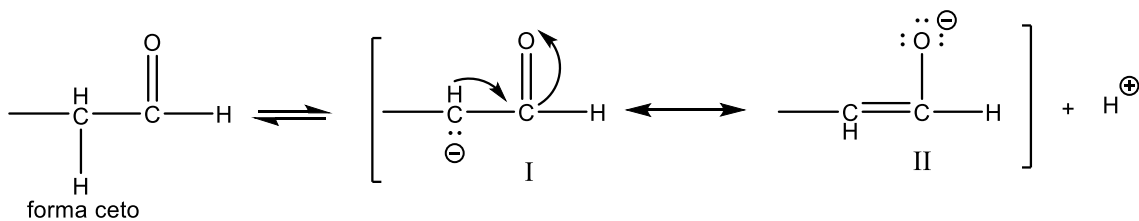


Figura 7. Mecanismo de formación del carbanión

Si el protón se adiciona nuevamente al carbono alfa (estructura I), se obtiene nuevamente el compuesto carbonílico original o la forma ceto. Ver reacción en la figura 8.

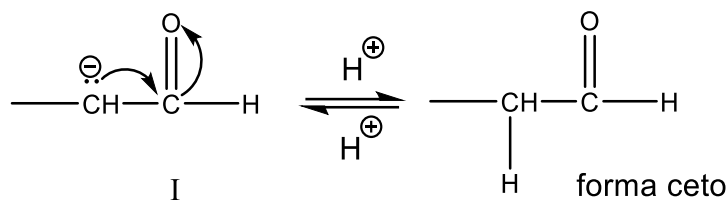


Figura 8. Mecanismo de reconversión a la forma Ceto

Sin embargo, si la adición ocurre en el átomo de oxígeno cargado negativamente (estructura II), se obtiene una forma estructural diferente a la forma ceto, llamada forma enólica o simplemente enol. Ver reacción en la figura 9.

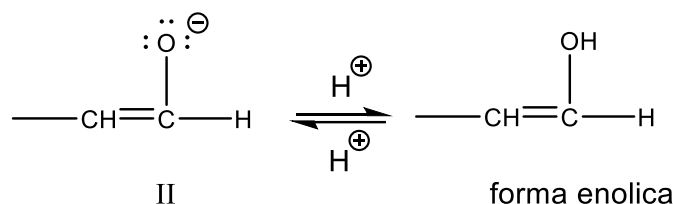


Figura 9. Mecanismo de formación del enol

Las sustancias que participan en un equilibrio de su forma ceto y enólica se dice que son **tautómeras**, por el fenómeno que implica la interconversión espontánea de los dos isómeros.

Todas las aldosas son azúcares reductores porque contienen un grupo carbonilo aldehídico, pero algunas cetosas son también azúcares reductores como es el caso de la fructosa, aun cuando no contiene un grupo aldehído. La reducción ocurre porque la fructosa se isomeriza con rapidez en solución básica o ácida mediante una serie de corrimientos tautómeros cetoenólicos cuyo resultado es la conversión a una aldosa.

La forma enólica de la glucosa presenta la estereoquímica del C-2 típica, en la que el ión enolato puede transformarse directo a una de las tres posibilidades de compuestos hidroxycarbonílicos: D-glucosa, D-manosa y D-fructosa. De modo que, si el carbonilo se forma en su C-2 si obtiene fructosa, si el carbonilo se forma con el C-1 puede obtenerse glucosa o manosa porque el H⁺ se puede ligar al lado izquierdo o derecho del plano molecular sp² del ión enolato. Ver reacción en la figura 10:

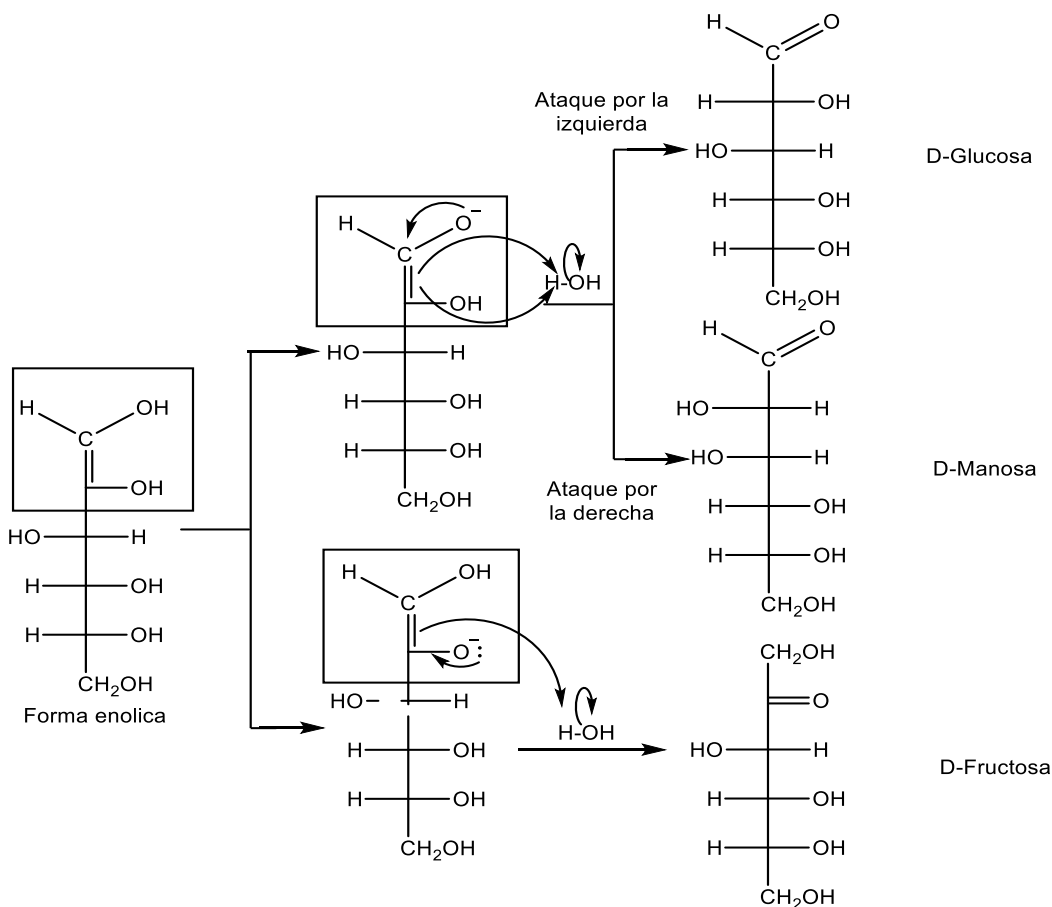


Figura 10. Tautomerismo de la molécula de glucosa

La isomerización alcalina de la glucosa produce una mezcla en la cual están presentes glucosa, manosa y fructosa en equilibrio a través de un ión intermedio inestable o enolato. Como se trata de un equilibrio, se obtiene siempre esta mezcla final partiendo de cualquiera de estos tres monosacáridos. [17]

2.8.1 Descomposición de Azúcares Reductores

Cuando la alcalización del jugo es elevada, ocurre la destrucción de azúcares reductores, ya que el exceso de cal descompone la glucosa presente en el jugo, formando ácidos orgánicos que destruirán la sacarosa y en consecuencia habrá un desdoblamiento de esta para alcanzar de nuevo su equilibrio con la fructosa y glucosa.

La alcalización también provoca la formación de sales solubles de calcio que aumentarán las incrustaciones en los evaporadores. Estas sales solubles incrementan la viscosidad de la meladura afectando la evaporación en los tachos y en consecuencia aumentando la cantidad de azúcares reductores y sus pérdidas de azúcar.

La adición excesiva de cal, además produce oscurecimiento de los jugos, aumentando la viscosidad de los productos de baja pureza, así como las cenizas debido a las sales de calcio disueltas, con su consecuente e indeseable aumento de la cantidad de azúcares reductores.

Además de la pérdida directa de sacarosa para invertir el azúcar, se pueden formar productos indeseables de color oscuro en el jugo a través de la reacción de Maillard de aminoácidos y azúcares reductores. Las reacciones reversibles se inician por el equilibrio entre las formas neutras e ionizadas de los monosacáridos. El oxianión en el carbono anomérico debilita el enlace CO del anillo y permite la mutarotación y la isomerización a través de un intermedio acíclico de enediol.

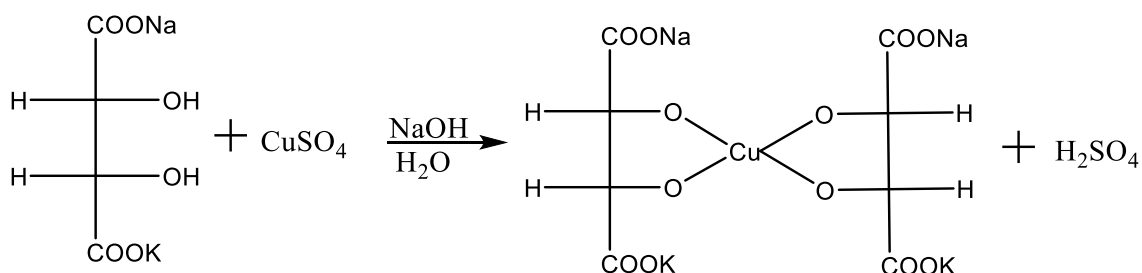
Por tales razones, conocer la concentración de los azúcares reductores contribuye a evaluar los diferentes productos y subproductos dentro del proceso fabril, por lo que es necesario contar con técnicas analíticas de elevada exactitud, precisión y sensibilidad para su determinación y cuantificación.

2.9 Métodos para la Determinación de Azúcares Reductores Totales

2.9.1 Método de Lane y Eynon

El poder reductor que pueden presentar los azúcares proviene de su grupo carbonilo, que puede ser oxidado a grupo carboxilo con agentes oxidantes suaves. Si el grupo carbonilo se encuentra combinado no puede presentar este poder reductor.

El Reactivo de Fehling opera la oxidación alcalina de aldosas y de cetosas que van a transformarse en ácido glucónico. Está compuesto de dos soluciones A y B que deben mezclarse al momento de su uso. La solución A contiene CuSO_4 . La solución B contiene tartrato de sodio en NaOH . El tartrato tiene la función de acomplejar al Cu^{2+} produciendo coloración azul, ver figura 11. La especie oxidante es el Cu^{2+} que se reduce a Cu^+ precipitando como óxido de cobre Cu_2O rojo. La oxidación total de los monosacáridos tiene lugar por la intercepción de la forma de cadena abierta presente en el equilibrio hemiacetal del aldehído-cetona, aunque en cualquier momento sólo hay una cantidad pequeña de la forma de la cadena abierta, esa cantidad se reduce y continúa hasta que toda la muestra ha experimentado la reacción. [18]



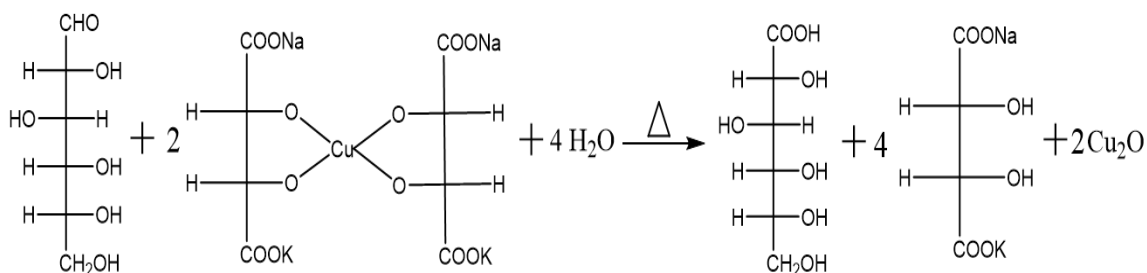


Figura 11. Reacción de Fehling

La reacción tiene lugar en medio básico por lo que es necesario introducir en la reacción tartrato sódico-potásico para evitar la precipitación del hidróxido cúprico. La prueba de Fehling no es específica, dado que otras sustancias dan reacción positiva como por ejemplo los fenoles.

2.9.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento [10]

La HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o Cromatografía líquida de alto rendimiento, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes de una muestra que se fraccionan entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida compuesta por partículas muy finas contenidas en una columna, y donde se utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente a través de ella, consiguiendo así separaciones de gran resolución, permitiendo su identificación y cuantificación.

La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil bombeada con alta presión a una columna rellena de fase estacionaria y allí el analito se retarda separándose por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil.

Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a sus cualidades de sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas con buena exactitud, su gran adaptabilidad a sustancias que son de interés para la industria, la ciencia y la sociedad, incluyendo sustancias tan diversas como; aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenos, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una gran variedad de sustancias inorgánicas.

Para la determinación de carbohidratos el sistema de HPLC debe ser acoplado a un detector de índice de refracción, este mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal, no destructivo, ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente.

Esta técnica al derivarse de una optimización de la cromatografía en columna para el análisis de sacarosa, glucosa y fructosa por el método contemplado en el ICUMSA utiliza una columna Hi-plex Ca de intercambio de ligandos que ofrece una resolución superior para los monosacáridos y disacáridos debido a la interacción de los grupos hidroxilo con el ión metálico asociado a la función de intercambio catiónico del grupo ácido sulfónico. [19]

El equipo de HPLC utilizado en este trabajo se observa en la figura 12.

Instrumentación

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- **Depósitos para la fase móvil (disolventes):** Se utilizan un erlenmeyer de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de filtros en acero inoxidable, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.
- **Filtros:** Situados entre la bomba y el inyector de muestras, para evitar la entrada de ciertas sustancias y evitar el colapso de la columna. Normalmente estos filtros están compuestos de acero inoxidable poroso.
- **Sistema de bombeo:** La bomba tiene la función de introducir con un flujo continuo a presión la fase móvil o disolvente a través del inyector, la columna y el detector. Los requisitos de una bomba para HPLC son:
 - Generar presiones de 1 a 6000 psi.
 - Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.
 - Construidos en acero inoxidable
- **Columna Cromatográfica:** En ésta es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación. La columna Hi-plex Ca tiene una resina catiónica fuerte, es decir, que el intercambiador está cargado negativamente porque los grupos funcionales fijos a las esferas son derivados de un ácido fuerte $R-SO_3^-$ (sulfónico) donde la letra R representa la red orgánica de la resina y tiene contraiones positivos (cationes Ca^{2+}) disponibles para intercambiar y por lo tanto se conocen como intercambiadores catiónicos. Estos contraiones pueden ser intercambiados en forma reversible con otros iones de la misma carga sin alterar la estructura de la matriz.
- **Sistema de inyección de muestras:** Las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método que se utiliza por medio de un inyector automático el cual permite programar las condiciones del análisis.

Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna; en este caso se realizaron inyecciones de 20µL de muestra.

- **Detectores:** El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura.
- **Sistema para el tratamiento de datos y registrador:** La velocidad de elución de los componentes de una muestra depende de la fracción de tiempo que requieran para distribuirse según su naturaleza química con respecto a las fases móvil y estacionaria y salir de la columna. Este tiempo es registrado por el equipo mediante un detector colocado en el extremo final de la columna el cual transmite una señal que se transforma por medio del registrador en una gráfica en función del tiempo llamado cromatograma, que consta de una serie de picos simétricos. Generalmente la respuesta del detector es linealmente proporcional a la concentración de los analitos en la fase móvil, la forma de cada pico muestra la distribución de concentración del componente asociado a la señal.



Figura 12. Equipo de HPLC utilizado en los análisis

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria azucarera, los laboratorios de control de calidad deben velar por suministrar información real, oportuna, precisa y confiable, siendo esta, un indicativo de la calidad de las condiciones del proceso, como del producto terminado. Por ello, certificar que los métodos utilizados sean lo suficientemente fiables para generar un resultado, se convierte en un problema crítico ante cualquier tipo de análisis.

El ingenio del Cauca S.A.S, cuenta con un laboratorio de calidad de conformidad certificado por la NTC ISO 9001 versión 2008, que es el encargado de realizar los respectivos análisis de aguas, carbón, producto terminado y materiales en proceso, dentro de estos se encuentran los jugos de caña obtenidos durante el proceso de molienda, a estos jugos se les debe realizar pruebas para la determinación y cuantificación de azúcares reductores totales (sacarosa, glucosa y fructosa), que son un factor determinante en el rendimiento del producto terminado.

La determinación de azúcares reductores totales (ATR's) se lleva a cabo mediante el método tradicional de Lane y Eynon, estipulado en el manual de métodos de la Comisión Internacional para la Uniformidad de métodos de Análisis de Azúcares (ICUMSA por sus siglas en inglés), en el cual se aprovecha la propiedad del poder reductor que tienen los azúcares para su cuantificación; en este método, La reacción ocurre en medio básico fuerte, que requiere un estabilizador para el ión Cu^{+2} que evite la formación de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble, como el tartrato con el cual forma un compuesto de coordinación de color azul.

Debido a que no se eliminan las demás especies que contiene la matriz de la muestra, algunas de estas pueden generar interferencias, tales como especies inorgánicas y moléculas con grupos aldehído en su estructura susceptibles a oxidación, al igual que otros azúcares como cetosas que pueden sufrir efectos de tautomerización por la alcalinidad del medio, afectando el resultado del contenido real de azúcares reductores totales en los jugos de caña, además que el analista que realiza este procedimiento está expuesto a varios tipos de compuestos que le podrían afectar la salud si no toma las precauciones necesarias. Por tales razones, en este proyecto se pretende implementar y validar una metodología para la determinación del contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en jugos de caña, por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), esta técnica permite la separación de los azúcares, mediante una columna de intercambio de ligandos que ofrece una alta resolución para los monosacáridos y disacáridos debido a la interacción de los grupos hidroxilo con el ión metálico asociado a la función de intercambio catiónico del grupo ácido sulfónico, facilitando así, una adecuada separación y cuantificación.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Implementar y validar un método para la determinación de azúcares reductores totales (sacarosa, glucosa y fructosa) en jugos de caña, utilizando la técnica analítica, Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento y comparar con el método volumétrico Lane y Eynon.

4.2 Objetivos Específicos

- Implementar y validar el método GS7/4/8-23 (2002) del manual de métodos ICUMSA para la determinación analítica por HPLC de azúcares reductores totales (ATR's).
- Evaluar los parámetros de calidad como: Linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límites de detección y de cuantificación e intervalo lineal para la metodología a validar.
- Realizar una comparación estadística de los métodos Lane y Eynon y HPLC en el análisis del porcentaje de Azúcares Reductores totales en jugos de caña.

5 METODOLOGÍA

5.1 Reactivos, Materiales y Equipos

- **Reactivos:**
 - Sacarosa, glucosa y fructosa marca Merck grado analítico
 - Agua grado HPLC.
 - Ayuda Filtrante
 - Solución alcohólica de Fenolftaleína al 1%
 - Solución indicadora de Azul de Metileno al 1%
 - Solución de Sulfato de Cobre (Solución A): Se disuelven 69.278g de Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) reactivo analítico, previamente desecado, y se transfiere a un matraz volumétrico de 1000 ml
 - Solución alcalina de tartrato (Solución B): Se pesan 346 g de tartrato de Sodio y potasio reactivo analítico ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)₃. Se disuelven en 250 ml de agua destilada, agitando hasta completa disolución. Aparte se prepara 100 g de Hidróxido de Sodio, reactivo analítico, agregando 250 ml de agua destilada y se agita hasta completa disolución. Las soluciones anteriormente preparadas se mezclan en un matraz volumétrico de 1000 ml y se completa el volumen con agua destilada.
- **Materiales:**
 - Micropipetas Schott Duran
 - Pipetas pasteur
 - Balones aforados de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
 - Beakers, erlenmeyers, buretas, probetas
 - Jeringas, filtros de jeringa con membranas de 0.22 micras, viales
 - Embudos de caña
- **Equipos:**
 - Balanza analítica
 - Sistema de agua ultrapura Milli-Q
 - Equipo de HPLC 1260 AGILENT
- **Equipo de HPLC 1260 AGILENT:**
 - Bomba Quat con velocidad de flujo de 0,6mL/min
 - Detector RID a 40°C
 - Inyector ALS de 20uL
 - Fase móvil será agua grado HPLC
 - Compartimento termostatzado de columna (TCC) Horno con temperatura de 85°C
 - Columna Hi-Plex Ca PL1170-6810, 7,7x300 mm, 8 µm
 - Software Openlab ChemStation.

5.2 Implementación y Validación para análisis de Azúcares Reductores Totales

La metodología a implementar para el proceso de validación está basada en la guía *Validación de Métodos y Determinación de la incertidumbre de la medición*, 1ª Edición. Santiago de Chile. 2010, Aspectos generales para la validación de métodos.

5.2.1 Preparación de curvas de calibración

Se utilizaron estándares de sacarosa, glucosa y fructosa marca Merck, para preparar soluciones patrón (ver tabla 1) con el propósito de obtener curvas de calibración en un rango lineal, determinando el respectivo coeficiente de correlación.

Tabla 1. Datos para la elaboración de las curvas de calibración para Sacarosa, Glucosa y Fructosa, todos los patrones a un volumen de 50mL.

Patrones	1	2	3	4	5	6	7	8
Sac g	0,3 mL del	0,5 mL del	1 mL del	0,1	0,3	0,5	0,8	1,2
Gluc g	patrón 8	patrón 8	patrón 8	0,015	0,05	0,10	0,15	0,25
Fruc g	en balón de 50 mL	en balón de 50 mL	en balón de 50 mL	0,015	0,05	0,10	0,15	0,25

5.2.2 Validación del sistema instrumental

Se realizaron las curvas de calibración de sacarosa, glucosa y fructosa de la tabla 1. Se evaluó la linealidad y precisión en términos de precisión intermedia y límites críticos.

- **Linealidad instrumental:** Se evaluaron 8 niveles de concentración para cada azúcar, durante 6 días diferentes. Se preparó una curva de calibración por día. Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permitirán concluir la linealidad instrumental en el rango utilizado.
- **Precisión instrumental:** Se evaluaron bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día), se prepararon 3 curvas de calibración con 8 niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Bajo condiciones de precisión intermedia (días diferentes), se prepararon 5 curvas de calibración durante 5 días diferentes, una curva de calibración por día. Para obtener el porcentaje del coeficiente de variación (CV%) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

- **Límites críticos (LOD y LOQ):** Los límites de detección y cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC.

5.3 Implementación y Validación de la metodología para determinación de Azúcares Reductores Totales

Para implementar la metodología para la determinación de ATR's se evalúan los siguientes parámetros consignados en el diseño experimental. Ver tabla 2.

Tabla 2. Diseño experimental para la implementación de la metodología para determinar ATR's

Pruebas y parámetros de validación a evaluar	
Linealidad	
Exactitud	Sesgo Porcentaje de recuperación
Precisión	Desviación estándar Precisión intermedia Varianza Error relativo Coeficiente de variación
Incertidumbre	

5.3.1 Análisis de jugos de caña por HPLC

Se analizaron cinco jugos de caña diferentes (ver puntos de muestreo en el anexo A) primera extracción y diluido del molino farrel, primera extracción y diluido del molino fulton y el jugo clarificado, de tipo compuestos y puntuales recolectados a diferentes horas del día. Los datos se pueden observar en el anexo B, tablas 1 y 2.

- **Tratamiento de la muestra**

Los jugos se filtran en presencia de ayuda filtrante, se hace una dilución, pesando un balón de 50 mL vacío, a este se le adiciona 2 mL de muestra y se afora con agua grado HPLC, en cada paso se registra el peso para calcular un factor de dilución, finalmente las muestras se filtran por membranas de 0.22 micras en viales para HPLC.

- **Análisis de muestras por HPLC**

Se prepararon los patrones respectivos para la curva de calibración y se ajustaron las condiciones del equipo, las cuales se especificaron en el punto 5.1. En la determinación se utilizó agua grado HPLC como blanco. Seguido a ello, se leen los patrones de la curva de calibración respectivamente en orden ascendente, estas lecturas se guardan en el software del equipo, como estándares de calibración externos para sacarosa, glucosa y fructosa. Posteriormente se leen las muestras teniendo en cuenta su factor de dilución y se observan sus respectivos cromatogramas.

5.4 Comparación Estadística de los Métodos Lane & Eynon y HPLC en el Análisis del Porcentaje de Azúcares Reductores

Se realizará el análisis estadístico de los resultados obtenidos comparando dos métodos con base en los siguientes parámetros: Promedio, Desviación estándar absoluta (s), Desviación estándar relativa (RSD), Desviación estándar de la media (Sm), Coeficiente de varianza (CV), Varianza.

5.4.1 Análisis de muestras por el método Lane y Eynon

El método consiste en la titulación de soluciones de fehling (A y B) con una muestra que contiene azúcares reductores en proporción desconocida. Se utiliza como indicador azul de metileno.

Los jugos de caña analizados por el método de HPLC, también se analizan por este fehling (ver anexo C tablas 1-5 para cada jugo), se toman 5 mL de Fehling A y B en un Erlenmeyer y se agrega 15 mL de una muestra previamente filtrada, desde una bureta y se agita.

La mezcla anterior se calienta hasta ebullición y se mantiene durante 2 minutos (coloración marrón), luego se adicionan 3 gotas de solución de azul de metileno 1% y se mezcla hasta que la coloración azul sea permanente, la muestra azucarada titulante se adiciona poco a poco, agitando hasta que la coloración azul desaparezca completamente, se repite la titulación para verificar el punto exacto del viraje, finalmente se registra el volumen gastado en la titulación para calcular el % de ATR's mediante el SIGIND (Programa integral de información).

5.5 Análisis estadístico de los resultados

Con el objetivo de validar las metodologías utilizadas, se aplicará un tratamiento estadístico a todos los resultados obtenidos, utilizando hoja de cálculo de Excel 2016 y el paquete estadístico SPSS versión 23.0, también se aplican pruebas paramétricas como ANOVA o no paramétricas, según corresponda.

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Implementación para Análisis de Azúcares Reductores Totales

Con las condiciones establecidas, se procedió a realizar las pruebas necesarias y sus correspondientes análisis estadísticos, teniendo como fin, mostrar unos resultados confiables, reproducibles y precisos en la cuantificación de azúcares reductores por la técnica HPLC en el laboratorio de calidad del ingenio del cauca S.A.S.

6.1.1 Preparación de Soluciones

Cada solución patrón contiene los tres estándares, Sacarosa, Glucosa y Fructosa y para su preparación se tomaron los pesos reportados en la tabla 1, las concentraciones se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración de Sacarosa, Glucosa y Fructosa para cada solución patrón

Concentración (%P/P)			
Patrón	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
1	0,014	0,003	0,003
2	0,024	0,005	0,005
3	0,048	0,01	0,01
4	0,2	0,03	0,03
5	0,6	0,1	0,1
6	1,0	0,2	0,2
7	1,6	0,3	0,3
8	2,4	0,5	0,5

6.1.2 Pruebas de Normalidad

Con el fin de determinar cuál es la distribución que siguen los datos obtenidos, se realiza la prueba de Shapiro-Wilk, puesto que el tamaño de muestra es menor de 50.

Se prepararon curvas de calibración para sacarosa, glucosa y fructosa durante 6 días diferentes usando 8 niveles de concentración. Los resultados obtenidos se consignaron en la tabla 4.

Se evaluó la normalidad de los datos en función de los días y en función de la concentración teniendo en cuenta el valor de significancia (p) de la prueba Shapiro-Wilk, las hipótesis planteadas fueron:

H₀: La variable de la cual se extrajo la muestra sigue una distribución Normal.
H_a: La variable de la cual se extrajo la muestra no sigue una distribución Normal.

Tabla 4. Resultados de curvas de calibración de Sacarosa, Glucosa y Fructosa

Concentración		Áreas					
		(%P/P)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
SACAROSA	0,014	4,00E+04	3,04E+04	4,08E+04	4,12E+04	3,79E+04	4,02E+04
	0,024	6,76E+04	6,83E+04	6,93E+04	6,95E+04	6,72E+04	6,58E+04
	0,048	1,35E+05	1,35E+05	1,36E+05	1,39E+05	1,36E+05	1,32E+05
	0,2	5,68E+05	5,82E+05	5,70E+05	5,82E+05	5,93E+05	5,91E+05
	0,6	1,69E+06	1,72E+06	1,70E+06	1,72E+06	1,75E+06	1,69E+06
	1,0	2,84E+06	2,84E+06	2,84E+06	2,92E+06	2,93E+06	2,82E+06
	1,6	4,55E+06	4,54E+06	4,52E+06	4,70E+06	4,74E+06	4,52E+06
	2,4	6,78E+06	6,78E+06	6,76E+06	6,99E+06	6,86E+06	6,71E+06
GLUCOSA	0,003	8,06E+03	6,30E+03	8,26E+03	8,38E+03	7,86E+03	8,40E+03
	0,005	1,36E+04	1,40E+04	1,39E+04	1,41E+04	1,41E+04	1,36E+04
	0,01	2,74E+04	2,78E+04	2,75E+04	2,90E+04	2,87E+04	2,71E+04
	0,03	8,74E+04	9,94E+04	9,41E+04	8,75E+04	8,97E+04	8,71E+04
	0,1	2,77E+05	2,80E+05	2,78E+05	2,75E+05	3,22E+05	2,82E+05
	0,2	5,56E+05	5,55E+05	5,54E+05	5,94E+05	6,17E+05	5,50E+05
	0,3	8,09E+05	8,37E+05	8,38E+05	8,61E+05	9,40E+05	8,17E+05
	0,5	1,38E+06	1,40E+06	1,37E+06	1,44E+06	1,51E+06	1,37E+06
FRUCTOSA	0,003	8,21E+03	8,36E+03	8,35E+03	8,53E+03	7,54E+03	8,50E+03
	0,005	1,37E+04	1,40E+04	1,39E+04	1,42E+04	1,35E+04	1,39E+04
	0,01	2,74E+04	2,75E+04	2,74E+04	2,81E+04	2,74E+04	2,85E+04
	0,03	8,64E+04	8,23E+04	8,70E+04	8,41E+04	8,49E+04	8,17E+04
	0,1	2,71E+05	2,73E+05	2,80E+05	2,76E+05	2,84E+05	2,79E+05
	0,2	5,48E+05	5,85E+05	5,50E+05	5,84E+05	5,91E+05	5,64E+05
	0,3	8,24E+05	8,21E+05	8,27E+05	8,60E+05	8,70E+05	8,24E+05
	0,5	1,39E+06	1,38E+06	1,36E+06	1,42E+06	1,42E+06	1,39E+06

El criterio de rechazo se da para valores de significancia menor a $(p) = 0,05$ los resultados se consignan en las tablas 5 y 6 para Sacarosa, Glucosa y Fructosa.

Tabla 5. Prueba de normalidad en función del día, sacarosa, glucosa y fructosa, Shapiro-wilk

Día	Sacarosa		Glucosa		Fructosa	
	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia
1	0,842	0,080	0,823	0,050	0,823	0,061
2	0,845	0,085	0,825	0,052	0,824	0,072
3	0,843	0,082	0,826	0,054	0,822	0,093
4	0,841	0,078	0,821	0,048	0,824	0,082
5	0,844	0,084	0,818	0,044	0,825	0,073
6	0,844	0,083	0,824	0,052	0,824	0,064

Tabla 6. Prueba de normalidad en función del nivel de concentración, sacarosa, glucosa y fructosa, Shapiro-wilk (P)

Nivel	Sacarosa		Glucosa		Fructosa		
	%P/P	Estadístico	Sig	Estadístico	Sig	Estadístico	Sig
1		0,723	0,110	0,880	0,268	0,939	0,648
2		0,951	0,749	0,826	0,099	0,857	0,178
3		0,930	0,580	0,895	0,343	0,822	0,091
4		0,900	0,377	0,816	0,081	0,952	0,759
5		0,886	0,299	0,991	0,991	0,943	0,682
6		0,779	0,380	0,767	0,029	0,823	0,094
7		0,769	0,312	0,827	0,101	0,882	0,276
8		0,881	0,276	0,823	0,094	0,822	0,091

Se evaluó la normalidad de los datos aplicando la prueba de Shapiro-Wilk, encontrando que los resultados tanto en función de los días como en función de la concentración, tienen una significancia estadística superior a 0,05, por lo tanto, la hipótesis nula H_0 es aceptada y se considera que en función de los días y de la concentración los resultados siguen una distribución normal. La normalidad de estos resultados, permitió aplicar pruebas paramétricas para el correspondiente análisis estadístico, en cada sustancia.

Para saber si existen diferencias significativas entre las medias de los valores de área de cada uno de los 8 niveles de concentración, se realizó la prueba ANOVA en función del día y del nivel de concentración, Los resultados de la prueba se registran en las tablas 7 y 8 respectivamente, para Sacarosa, Glucosa y Fructosa.

Tabla 7. Prueba ANOVA, el día como variable independiente

Azúcar		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Sacarosa	Inter-grupos	4,20E+010	5	8,4+009	0,001	1,000
	Intra-grupos	2,62E+014	42	6,2E+012		
	Total	2,62E+014	47			
Glucosa	Inter-grupos	9,83E+009	5	2,0E+009	0,008	1,000
	Intra-grupos	1,09E+013	42	2,6E+011		
	Total	1,09E+013	47			
Fructosa	Inter-grupos	7,5E+07	5	15043117	0,000	1,000
	Intra-grupos	1,04E+013	42	2,5E+011		
	Total	1,04E+013	47			

La prueba ANOVA para los valores de absorbancia de los diferentes niveles de concentración en función del día, (Tabla 7) muestra que no existe diferencia significativa entre los valores de absorbancia ($p > 0,05$) en función del día, se concluye que la absorbancia de cada concentración no presenta variación con el tiempo, por tanto, se establece que la metodología aplicada es reproducible.

Ahora se aplica la prueba ANOVA para saber si existen diferencias significativas entre los valores de área en función del nivel de concentración.

Tabla 8. Prueba ANOVA, nivel de concentración como variable independiente

Azúcar		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Sacarosa	Inter-grupos	2,62E+014	7	3,7E+013	13387,858	0,000
	Intra-grupos	1,12E+011	40	2,8E+009		
	Total	2,62E+014	47			
Glucosa	Inter-grupos	1,08E+013	7	1,5E+012	2035,658	0,000
	Intra-grupos	3,04E+010	40	7,6E+008		
	Total	1,09E+013	47			
Fructosa	Inter-grupos	1,04E+013	7	1,5E+01	136408,7	0,000
	Intra-grupos	4,36E+08	40	1,09E+07		
	Total	1,04E+013	47			

Como se observa en la tabla 8, los resultados obtenidos indican que la absorbancia difiere significativamente ($p > 0,05$) entre cada nivel de concentración. Para determinar en cuales niveles hay diferencia, se aplica la prueba de Duncan, la cual se reporta en la tabla 9.

Tabla 9. Prueba de Duncan

Subconjunto para alfa = 0,05										
	Nivel	N	1	2	3	4	5	6	7	8
Sacarosa	1	6	4,0416E+04							
	2	6		6,7950E+04						
	3	6			1,355E+05					
	4	6				5,81E+05				
	5	6					1,71E+06			
	6	6						2,86E+06		
	7	6							4,59E+06	
	8	6								6,811E+06
	Sig			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Glucosa	1	6	8210,0							
	2	6		13883,3						
	3	6			27916,7					
	4	6				90866,7				
	5	6					277333,3			
	6	6						571000,0		
	7	6							850333,3	
	8	6								1411667
	Sig			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Fructosa	1	6	8515,0							
	2	6		13950,0						
	3	6			27466,67					
	4	6				84400,0				
	5	6					274166,7			
	6	6						583000,0		
	7	6							822666,7	
	8	6								1383333
	Sig			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

En la prueba de Duncan, tabla 9, se aprecia que cada nivel de concentración es significativamente diferente, lo cual indica la relación directa entre área y nivel de concentración, a mayor nivel de concentración, mayor área, por lo que es posible realizar una curva con estas dos variables.

6.1.3 Evaluación de la Sensibilidad y Linealidad Instrumental

Para la evaluación de la sensibilidad y la linealidad se utilizaron los datos de la tabla 4 y se elaboró un gráfico relacionando el área respecto al nivel de concentración, para sacarosa, glucosa y fructosa, respectivamente, las gráficas se muestran en la figura 15, 16 y 17. Donde se observa la tendencia lineal de los resultados, por lo que se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal que relaciona la cantidad de cada azúcar con el área de pico de respuesta.

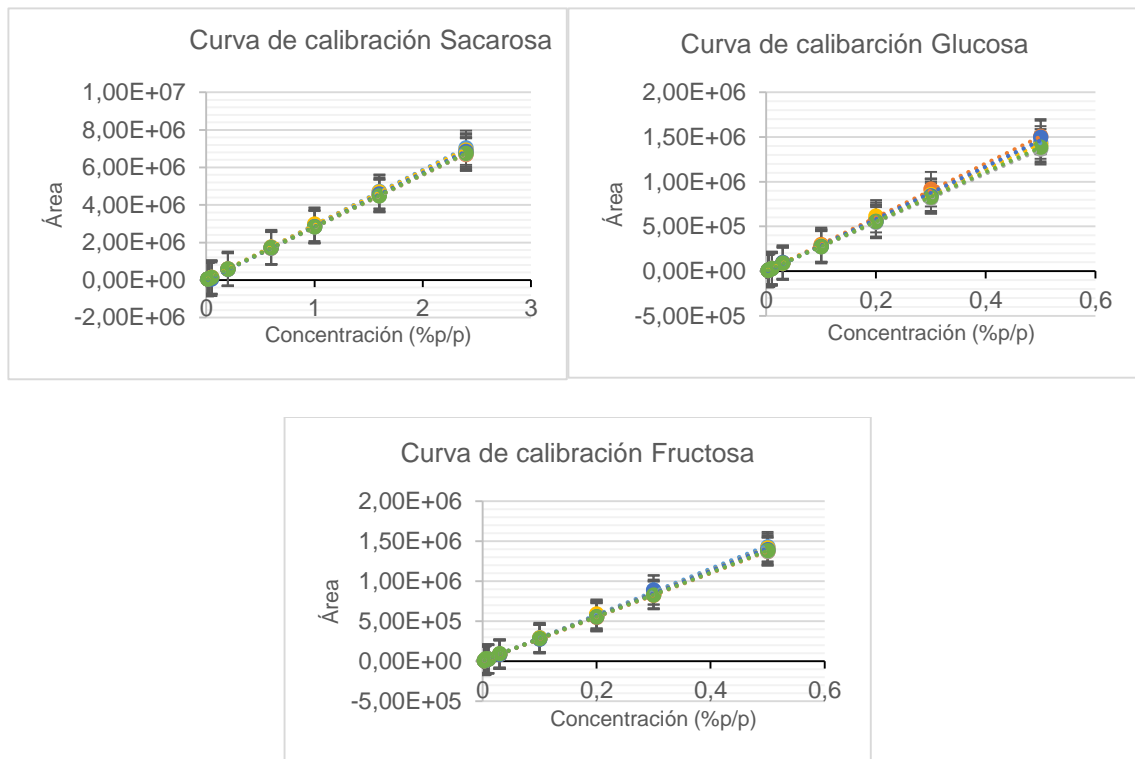


Figura 13. Curva de Calibración para linealidad: a. Sacarosa, b. Glucosa, c. Fructosa

Se determinaron los valores para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y sus respectivas desviaciones estándar, obteniendo los resultados registrados en la tabla 10.

Tabla 10. Pendientes, Interceptos y Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental para el método de determinación de sacarosa, glucosa y fructosa).

Azúcar	Parámetro	Símbolo	Valor	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Sacarosa	Coeficiente de correlación	r	0,9999	0,0001	0,01
	Pendiente	m	3,0E+06	0,0	0,0
	Intercepto	b	2,64E+03		
Glucosa	Coeficiente de correlación	r	0,9995	0,001	0,07
	Pendiente	m	3E+06	0,0	0,0
	Intercepto	b	4502,7		
Fructosa	Coeficiente de correlación	r	0,9995	0,0004	0,04
	Pendiente	m	3E+06	0,0	0,0
	Intercepto	b	3010,3		

El coeficiente de correlación se evaluó estadísticamente mediante correlación de Pearson (ver tabla 11) teniendo como H₀: “No existe correlación significativa entre las variables x e y”. Para ello se realiza una prueba de significancia con el propósito de aceptar o rechazar la hipótesis nula.

Tabla 11. Correlación de Pearson, Regresión lineal

Correlaciones	Sacarosa		Glucosa		Fructosa		
	Área	Nivel de concentración	Área	Nivel de concentración	Área	Nivel de concentración	
Área	Correlación de Pearson	1	1	1	0,999	1	1
	Sig bilateral		0,000		0,000		0,000
	N	48	48	48	48	48	48
Nivel de concentración	Correlación de Pearson	1	1	0,999	1	1	1
	Sig bilateral	0,000		0,000		0,000	
	N	48	48	48	48	48	48

Se puede observar en la tabla 11 que la prueba de significancia tiene un valor de 0.000, para cada azúcar, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe una correlación altamente significativa entre la concentración y el área, con una correlación de Pearson de 1.0.

Para evaluar estadísticamente la m y b se tiene las siguientes hipótesis.

- Para la pendiente se tiene como H_0 : “la pendiente no es significativamente diferente de cero” la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. $\leq 0,05$.
- Para el intercepto se tiene como H_0 : “El intercepto no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. $\leq 0,05$.

Tabla 12. Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto

Azúcar	Modelo	Coef. No estandarizado		Coef. estandarizado	t	Sig
		B	Error típ.	B		
sacarosa	intercepto	6453,2	10080,6		0,640	0,525
	Pendiente	2847136	9143,895	1,000	311,4	0,000
Glucosa	intercepto	930,6	4928,4		0,189	0,851
	Pendiente	2825579	22291,6	0,999	126,7	0,000
Fructosa	intercepto	2379,7	2119,7		1,123	0,267
	Pendiente	2768694	9587,8	1,000	288,77	0,000

La significancia estadística para la pendiente es inferior a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que la pendiente es significativamente diferente de cero.

La significancia estadística para el intercepto es superior a 0,05, por lo que se acepta la hipótesis nula, y se concluye que el intercepto no es significativamente diferente de cero.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se evaluó estadísticamente la regresión lineal en las curvas de calibración de la tabla 4, los resultados se muestran en la tabla 13, donde se observa si la significancia para la regresión es menor o mayor de 0,05

Tabla 13. ANOVA para evaluar la Regresión lineal en las curvas de calibración.

Azúcar	Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Sacarosa	Regresión	2,62E+014	1	2,6E+014	96951,4	0,000
	residual	1,24E+011	46	2,7E+009		
	total	2,62E+014	47			
Glucosa	Regresión	1,08E+013	1	1,1E+013	16066,9	0,000
	residual	3,10E+010	46	6,7E+008		
	total	1,09E+013	47			
Fructosa	Regresión	01,04E+013	1	1,0E+013	83389,3	0,000
	residual	5,74E+009	46	1,2E+08		
	total	1,04E+013	47			

Para evaluar la regresión se tiene como hipótesis nula: “No hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$)”, y como hipótesis alternativa “Hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$)”. En la tabla 13 se observa que la significancia para la regresión es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe regresión significativa en la curva de calibración para cada azúcar.

Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad permiten concluir que el método instrumental empleado para la determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa es lineal en el rango de concentraciones establecidas para cada azúcar.

6.1.4 Precisión Instrumental

La precisión refleja la reproducibilidad de las medidas, es decir, la cercanía entre los resultados obtenidos entre sí. Refleja el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas. Se evaluó bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día) y precisión intermedia (días diferentes). En condiciones de repetibilidad se prepararon 3 curvas de calibración con 8 niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14, donde se observa que los datos de las tres curvas para cada azúcar presentan valores similares entre sí.

Tabla 14. Curvas de calibración bajo condiciones de Repetibilidad

	Sacarosa			Glucosa			Fructosa		
	Curvas			Curvas			Curvas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	4,12E+04	3,97E+04	4,14E+04	8,38E+03	7,81E+03	8,33E+03	8,53E+03	7,82E+03	8,31E+03
2	6,95E+04	6,75E+04	6,85E+04	1,41E+04	1,40E+04	1,38E+04	1,42E+04	1,38E+04	1,38E+04
3	1,39E+05	1,38E+05	1,33E+05	2,90E+04	2,82E04	2,70E+04	2,81E+04	2,81E+04	2,73E+04
4	5,82E+05	6,34E+05	5,94E+05	8,75E+04	8,65E+04	8,69E+04	8,41E+04	8,76E+04	8,72E+04
5	1,72E+06	1,76E+06	1,75E+06	2,75E+05	2,88E+05	2,85E+05	2,76E+05	2,98E+05	2,93E+05
6	2,92E+06	2,93E+06	2,97E+06	5,94E+05	5,66E+05	6,41E+05	5,84E+05	5,78E+05	5,94E+05
7	4,70E+06	4,72E+06	4,69E+06	8,61E+05	8,52E+05	8,73E+05	8,60E+05	8,91E+05	8,70E+05
8	6,99E+06	7,04E06	6,92+06	1,44E+06	1,44E+06	1,41E+06	1,42E+06	1,43E+06	1,42E+06

Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon cinco curvas de calibración durante cinco días diferentes, una curva de calibración por día, los resultados se expresan en la tabla 15.

Tabla 15. Evaluación de Curvas de calibración bajo condiciones de Precisión Intermedia

Azúcar	Concentración	Días				
		1	2	3	4	5
Sacarosa	0,014	3,97E+04	4,16E+04	4,10E+04	4,14E+04	4,10E+04
	0,024	6,75E+04	6,79E+04	6,74E+04	6,85E+04	6,84E+04
	0,048	1,38E+05	1,33E+05	1,37E+05	1,33E+05	1,41E+05
	0,2	6,01E+05	5,68E+05	5,55E+05	5,94E+05	5,71E+05
	0,6	1,76E+06	1,69E+06	1,69E+06	1,75E+06	1,72E+06
	1,0	2,93E+06	2,85E+06	2,82E+06	2,97E+06	2,84E+06
	1,6	4,72E+06	4,53E+06	4,47E+06	4,69E+06	4,58E+06
	2,4	7,04E+06	6,68E+06	6,72E+06	6,92E+06	6,85E+06
Glucosa	0,003	7,81E+03	8,79E+03	8,49E+03	8,33E+03	8,90E+03
	0,005	1,40E+04	1,43E+04	1,38E+04	1,38E+04	1,45E+04
	0,01	2,82E+04	2,81E+04	2,80E+04	2,70E+04	2,91E+04
	0,03	8,65E+04	9,41E+04	8,83E+04	9,82E+04	8,81E+04
	0,1	2,88E+05	2,96E+05	2,74E+05	2,85E+05	2,75E+05
	0,2	5,66E+05	5,78E+05	5,42E+05	5,55E+05	5,55E+05
	0,3	8,52E+05	9,16E+05	8,13E+05	8,40E+05	8,27E+05
	0,5	1,44E+06	1,51E+06	1,41E+06	1,50E+06	1,39E+06
Fructosa	0,003	7,82E+03	8,62E+03	8,64E+03	8,31E+03	8,88E+03
	0,005	1,38E+04	1,40E+04	1,41E+04	1,38E+04	1,41E+04
	0,01	2,81E+04	2,71E+04	2,79E+04	2,73E+04	2,81E+04
	0,03	8,76E+04	8,28E+04	9,38E+04	8,72E+04	8,59E+04
	0,1	2,98E+05	2,79E+05	2,85E+05	2,93E+05	2,78E+05
	0,2	5,78E+05	5,48E+05	5,77E+05	5,94E+05	5,56E+05
	0,3	8,91E+05	8,23E+05	8,33E+05	8,40E+05	8,90E+05
	0,5	1,43E+06	1,37E+06	1,37E+06	1,42E+06	1,40E+06

Se determinó el coeficiente de variación (%CV) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Los resultados se presentan en la tabla 16, en la que se observan %CV menores al 5%.

Tabla 16. Precisión Instrumental Bajo Condiciones de Repetibilidad y Precisión Intermedia.

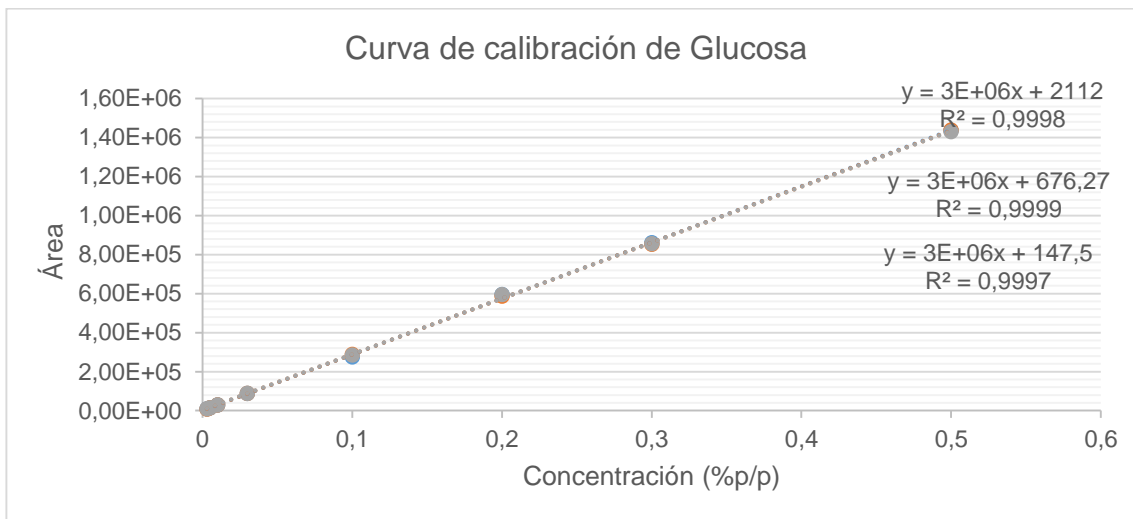
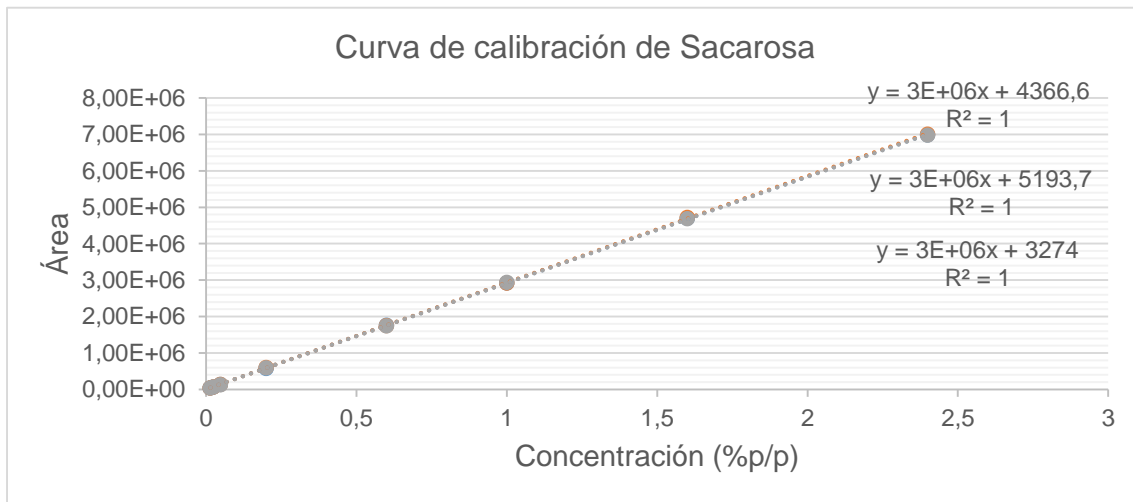
	Nivel	Repetibilidad			Precisión intermedia		
		Promedio	Desv. Est.	%CV	Promedio	Desv. Est.	% CV
Sacarosa	1	4,14E+04	0,036	0,88	4,09E+04	0,039	1,81
	2	6,85E+04	0,056	0,82	6,79E+04	0,052	0,74
	3	1,33E+05	0,030	2,20	1,36E+05	0,035	2,52
	4	5,94E+05	0,108	1,82	5,78E+05	0,203	3,31
	5	1,75E+06	0,009	0,51	1,72E+06	0,007	1,90
	6	2,94E+06	0,011	0,39	2,88E+06	0,009	2,24
	7	4,69E+06	0,017	0,35	4,60E+06	0,015	2,30
	8	6,98E+06	0,010	0,14	6,84E+06	0,019	2,15
Glucosa	1	8,33E+03	0,219	2,66	8,66E+03	0,223	2,80
	2	1,42E+04	0,012	0,81	1,41E+04	0,022	2,21
	3	2,90E+04	0,020	0,70	2,81E+04	0,034	2,66
	4	8,77E+04	0,010	0,12	8,80E+04	0,067	1,08
	5	2,85E+05	0,065	2,29	2,84E+05	0,078	3,26
	6	5,94E+05	0,048	0,81	5,59E+05	0,073	2,42
	7	8,56E+05	0,046	0,53	8,30E+05	0,077	1,98
	8	1,43E+06	0,004	0,29	1,41E+06	0,010	1,33
Fructosa	1	8,31E+03	0,306	3,71	8,65E+03	0,22	2,57
	2	1,38E+04	0,025	1,80	1,40E+04	0,031	2,57
	3	2,73E+04	0,045	1,62	2,77E+04	0,049	1,09
	4	8,72E+04	0,191	2,22	8,55E+04	0,165	1,69
	5	2,93E+05	0,115	3,99	2,92E+05	0,102	2,46
	6	5,94E+05	0,081	1,38	5,71E+05	0,086	2,00
	7	8,80E+05	0,156	1,78	8,35E+05	0,141	1,59
	8	1,42E+06	0,009	0,64	1,40E+06	0,011	1,27

Como se puede observar en la tabla 16. Los %CV son bajos al ser inferiores al 5%, se debe tener en cuenta que el MS. Propone que los coeficientes de variación deben ser inferiores a 10. Sin embargo, no se observa variabilidad en los resultados en días diferentes (precisión intermedia) respecto a los obtenidos el mismo día (repetibilidad), lo cual indica que la preparación diaria de las curvas de calibración y la variabilidad en el comportamiento del equipo entre días es constante.

6.1.5 Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación

Los límites de detección y cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC.

Se prepararon tres curvas de calibración para cada azúcar, las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones, (los mismos datos reportados en la tabla 14). Con los resultados obtenidos, se elaboró un gráfico donde se relacionó el área vs la concentración. Ver figura 14



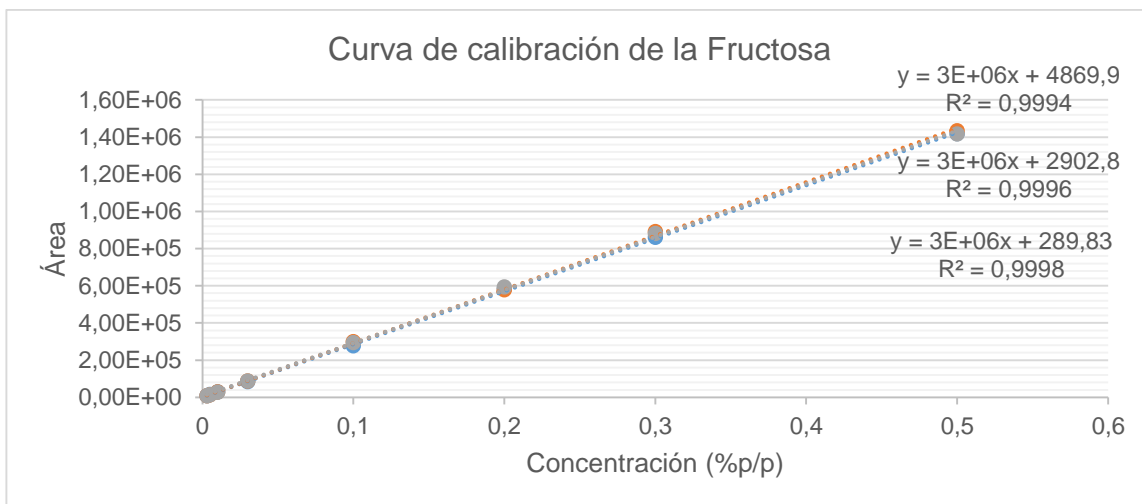


Figura 14. Curva de Calibración: **a.** Sacarosa para Límites Críticos, **b.** Glucosa para Límites Críticos, **c.** Fructosa para Límites Críticos.

Luego, se calculó mediante el método de mínimo cuadrados las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los Interceptos y las pendientes para cada una de las curvas de calibración, con esos datos se determinó la desviación estándar de los Interceptos (S_b) y el promedio de las pendientes (promedio m). Finalmente se aplicaron las ecuaciones 19 y 20 para establecer teóricamente los valores del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), los resultados se muestran en la tabla 17.

$$LOD = \frac{3 S_b}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 19}$$

$$LOQ = \frac{10 S_b}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 20}$$

Tabla 17. Calculo del Límite de Detección y Cuantificación

Mtra	Parám.	Curvas			Prom.	Desv	LOD	LOQ
		1	2	3				
Sac	Pendiente	2920354,8	2925202,2	2916345,0	2920634,0	4435,2	0,001	0,003
	Intercepto	3273,97	5193,72	4366,64	4278,11	962,92		
Gluc	Pendiente	2878066,8	2871001,8	2863363,1	2870810,6	7353,7	0,001	0,003
	Intercepto	147,50	676,27	2112,02	978,60	1016,5		
Fruc	Pendiente	2850258,7	2886549,5	2857969,2	2864925,8	19119,4	0,002	0,008
	Intercepto	289,8	2902,8	4869,9	2687,5	2297,6		

Los límites de detección y cuantificación son adecuados, como se observa el sistema instrumental brinda una exactitud y precisión aceptables.

6.2 Implementación y Validación de la metodología para determinación de Azúcares Reductores Totales

Para la implementación de la metodología se evaluaron los parámetros linealidad, exactitud y precisión. Para los análisis se empleó el software estadístico SPSS (versión 23).

6.2.1 Linealidad

Corresponde a la linealidad instrumental, por lo que se emplearon curvas de calibración sometidas a la metodología planteada.

6.2.2 Exactitud y Precisión

Se prepararon 5 curvas de calibración durante 5 días diferentes, una curva de calibración por día, los resultados obtenidos se expresan en la tabla de evaluación de la curva de calibración en término de la precisión intermedia (tabla 15). Se determinó la precisión y exactitud por niveles de concentración en las curvas de calibración, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 18. Los %CV obtenidos son inferiores al 5% y los %R son adecuados.

Tabla 18. Exactitud y Precisión del método

Nivel	Sacarosa			Glucosa			Fructosa		
	Precisión intermedia			Precisión intermedia			Precisión intermedia		
	Desv. Est.	%CV	% R	Desv. Est.	%CV	% R	Desv. Est.	%CV	% R
1	5,1E-04	3,74	97,2	8,9E-05	3,04	97,0	1,58	1,64	96,1
2	4,3E-04	1,85	96,1	1,5E-04	3,01	98,7	1,38	1,45	95,1
3	1,6E-03	3,36	99,3	2,9E-04	2,90	98,8	1,84	1,91	96,3
4	2,5E-03	1,27	99,9	1,2E-03	3,78	103,0	3,81	3,73	102,1
5	4,2E-03	0,69	100,3	1,7E-03	1,67	99,9	1,69	1,69	100,3
6	5,9E-03	0,59	99,9	1,3E-03	0,65	99,8	1,68	1,68	100,3
7	9,5E-03	0,59	100,2	3,1E-03	1,04	99,8	2,90	2,92	99,6
8	4,7E-03	0,20	99,9	1,5E-03	0,30	100,1	0,75	0,75	100,1

Con el propósito de determinar la exactitud y precisión para la metodología global se le aplicó la prueba estadística de homogeneidad de varianza (estadístico de Levene), teniendo como H_0 que “El nivel de concentración no afecta la variabilidad de los porcentajes de recuperación”. Los resultados de la prueba se presentan la tabla 19.

Tabla 19. Prueba estadística de homogeneidad de varianza sacarosa, glucosa y fructosa.

Base	Sacarosa				Glucosa				Fructosa			
	Est. Levene	gl1	gl2	Sig	Est. Levene	gl1	gl2	Sig	Est. Levene	gl1	gl2	Sig
en la media	4,354	7	40	0,03	3,207	7	40	0,010	3,229	4	30	0,035
en la mediana	4,288	7	40	0,511	3,108	7	40	0,446	2,780	4	30	0,553
en la mediana con gl corregido	4,288	7	20,144	0,515	3,108	7	22,283	0,454	2,780	4	11,676	0,570
en la media recortada	4,343	7	40	0,033	3,198	7	40	0,134	3,024	4	30	0,061

Como se puede observar en la tabla 19, La significancia estadística basándose en la media para el estadístico de Levene es menor de 0,05, por lo que la prueba estadística es significativa y por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que el nivel de concentración si afecta la variabilidad en los %R obtenidos. Por lo tanto, para cada nivel de concentración se debe tener en cuenta su porcentaje de recuperación. La significancia estadística basándose en la mediana para el estadístico de Levene es mayor a 0,05 (Sig=0,511, 0,446 y 0,553) para sacarosa, glucosa y fructosa respetivamente, por lo que la prueba estadística es no significativa y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, concluyendo que el nivel de concentración no afecta la variabilidad en los %R obtenidos. Esto permite calcular un %R_{promedio} basándose en la mediana de los datos del porcentaje de recuperación para cada nivel y un %CV para la metodología global. Los resultados se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Exactitud y Precisión para la metodología global en la determinación de ATR's con Base en la Mediana.

Mtra	Nivel	1	2	3	4	5	6	7	8	%R _{prom}	S	% CV
Sac	%R(m)	97,2	96,1	99,3	99,9	100,3	99,9	100,2	99,9	99,1	1,587	1,601
Gluc	%R(m)	97,0	98,7	98,8	103,0	99,9	99,8	99,8	100,1	99,6	1,707	1,713
Fruc	%R(m)	96,1	95,1	96,3	102,1	100,3	100,3	99,6	100,1	98,7	2,542	2,574

Los %R obtenidos en base a la mediana y el %R_{promedio} son aceptables, encontrándose dentro del intervalo normal (95 al 105 %), de igual forma los %CV son inferiores al 5%.

6.2.3 Análisis de Muestras por HPLC

La implementación de la metodología se realizó analizando muestras diferentes (**Ext. Farrael, Ext. Fulton, Dil. Farrel, Dil. Fulton y Jugo claro**) para cada azúcar las muestras fueron analizadas por triplicado durante 8 días diferente,

preparando una curva de calibración por día y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente. Se realizó la correlación en la concentración del azúcar para cada muestra teniendo en cuenta la reproducibilidad del método. Se determinó la precisión en términos del %CV, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados de análisis de muestras de la validación

Muestra	Sacarosa			Glucosa			Fructosa		
	Prom.	S	%CV	Prom.	S	%CV	Prom.	S	%CV
Ext. Farrel	14,21	0,57	4,04	0,40	0,01	3,08	0,44	0,01	3,06
Ext. Fulton	15,33	0,60	3,90	0,38	0,02	4,11	0,41	0,02	4,24
Dil. Farrel	11,99	0,40	3,37	0,27	0,01	3,91	0,29	0,01	4,50
Dil. Fulton	11,36	0,54	4,70	0,27	0,01	4,30	0,29	0,01	4,70
Jugo claro	11,47	0,28	2,45	0,23	0,01	4,63	0,23	0,01	4,55

Se puede apreciar que la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa en diferentes extractos presenta bajos coeficiente de variación (% CV), demostrando que la metodología implementada es precisa y genera resultados exactos.

6.2.4 Estimación de la incertidumbre en la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa mediante la metodología de fuentes globales.

Se determinó la incertidumbre de la metodología de determinación de los diferentes azúcares con concentración del nivel 1 (bajo) y 8 (alto) de la curva. Inicialmente se muestra la contribución de las fuentes aleatorias encontrándose un valor promedio, una desviación estándar y una desviación estándar relativa de cada grupo de datos con los cuales se calcula la desviación estándar relativa del total de los datos (RSDt). Los resultados se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Contribución de las fuentes aleatorias

No. de análisis	Sacarosa		Glucosa		Fructosa	
	nivel bajo	nivel alto	[%P/P] nivel bajo	nivel alto	nivel bajo	nivel alto
1	0,0134	2,3969	0,0028	0,5016	0,0029	0,4976
2	0,0143	2,3971	0,0029	0,5009	0,0028	0,5000
3	0,0134	2,3986	0,0031	0,5024	0,0029	0,5038
4	0,0140	2,3906	0,0029	0,4987	0,0028	0,5028
5	0,0138	2,4002	0,0028	0,4988	0,0029	0,4946
6	0,0128	2,4049	0,0029	0,5007	0,0029	0,5036
X _p	0,0136	2,3980	0,0029	0,5005	0,00288	0,5004
S	5,1E-04	4,7E-03	8,9E-05	1,5E-03	4,74E-05	3,73E-03
No.	6	6	6	6	6	6
RSD	0,037	0,002	0,030	0,003	0,016	0,008
RSDt	0,027		0,022		0,013	

También se determina la contribución de las fuentes sistemáticas en la incertidumbre del método con los porcentajes de recuperación de la concentración a niveles bajo y alto, donde se hace necesario calcular el promedio de los recuperados, su desviación estándar para poder calcular la incertidumbre en la recuperación promedio (U_{Rp}), los resultados se presentan en la tabla 23.

Tabla 23. Estimación de la contribución de las fuentes sistemáticas sacarosa, glucosa y fructosa.

No. de análisis	Sacarosa		Glucosa		Fructosa	
	% Recuperación					
	nivel bajo	nivel alto	nivel bajo	nivel alto	nivel bajo	nivel alto
1	0,95	0,99	0,95	1,01	0,95	0,99
2	1,19	1,00	0,96	1,00	1,00	1,02
3	0,96	0,97	1,02	1,03	0,98	1,01
4	1,00	1,00	0,98	0,99	0,95	1,01
5	0,99	0,98	0,93	0,99	0,99	0,99
6	0,92	1,00	0,98	1,02	1,02	1,00
R_p		0,99		0,99		0,99
S_{Rp}		0,07		0,03		0,02
No.		12		12		12
U_{Rp}		0,02		0,008		0,007

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95% para (n-1) grados de libertad, es decir; para ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1 estableciendo como H_0 “el factor de recobro es significativamente diferente de 1”, para esto se calcula el It_{expl} y se compara con el It_{critl} , siendo que si $It_{expl} > It_{critl}$ se rechaza la H_0 y si el $It_{expl} < It_{critl}$ se acepta la H_0

En la tabla 24 se muestran los resultados de acuerdo a los cuales se observa que el t-experimental es menor que el t-crítico, por lo tanto, se utiliza la fórmula de incertidumbre combinada total, con la que se calcula la incertidumbre expandida del método que se registra en tabla 25, aceptando la hipótesis nula.

Tabla 24. Evaluación de la significancia entre el factor 1 y el factor de recobro sacarosa, glucosa y fructosa.

Metales	α (%)	Nivel de confianza	Grados de libertad	t. critico	t. experimental
sacarosa					0,3
Glucosa	5	95	11	1,7959	1,3
Fructosa					1,1

Tabla 25. Calculo de la incertidumbre del método

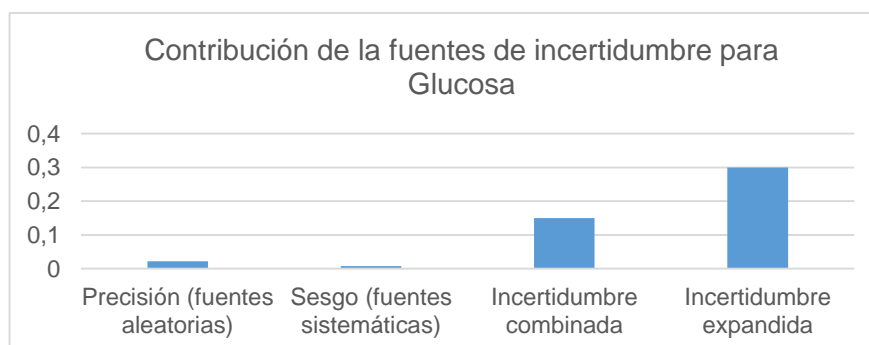
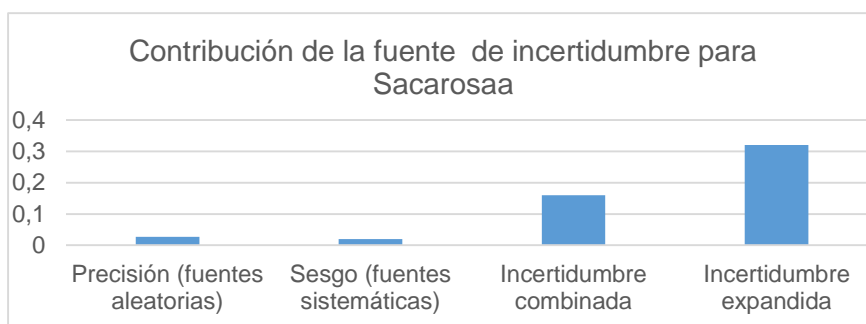
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
Incertidumbre combinada total (U_{Ctotal})	0,16	0,15	0,11
Incertidumbre expandida del método ($U_{exp\ mét}$)	0,32	0,30	0,22
Concentración del analito	100,00	100,00	100,00
Incertidumbre expandida en la medición	32	30	22

En la tabla 26 se muestra la contribución de las diferentes fuentes de incertidumbre a la incertidumbre global en la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa, con los que se construyen las gráficas de la figura 16.

Tabla 26. Contribución de las fuentes de incertidumbre de sacarosa, glucosa y fructosa

	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
Precisión (fuentes aleatorias)	0,027	0,022	0,013
Sesgo (fuentes sistemáticas)	0,02	0,008	0,007
Incertidumbre combinada	0,16	0,15	0,11
Incertidumbre expandida	0,32	0,30	0,22

Con los cálculos de las incertidumbres se obtienen las gráficas de la figura 16 representadas en forma de barras.



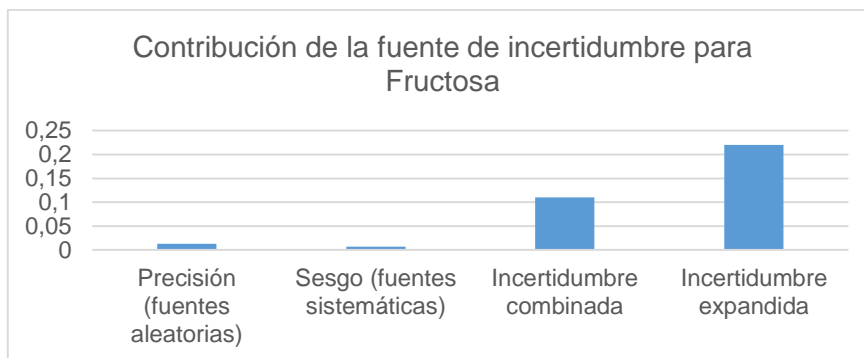


Figura 16: Grafico de la contribución de la fuente: **a.** Sacarosa, **b.** Glucosa **c.** Fructosa

En las gráficas de la figura 16 se observa que la principal fuente de incertidumbre en la medida en la determinación de ATR's por HPLC, es por fuentes aleatorias, estas incluyen limitaciones en los instrumentos y otras variables que no pueden ser controladas, mientras que las fuentes sistemáticas relacionadas con el funcionamiento del equipo o el procedimiento realizado por el operario, presentan el menor aporte en la incertidumbre de la medida.

El reporte de la incertidumbre en un análisis se hace en las mismas unidades del parámetro determinado a través de la desviación estándar. Por lo tanto, para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa se reportaría de la siguiente manera:

$$\text{Sacarosa (\%P/P)} = \text{valor medido} \pm (\text{valor medido} \times 0,3)$$

$$\text{Glucosa (\%P/P)} = \text{valor medido} \pm (\text{valor medido} \times 0,3).$$

$$\text{Fructosa (\%P/P)} = \text{valor medido} \pm (\text{valor medido} \times 0,2)$$

6.3 Comparación Estadística de los Métodos Lane & Eynon y HPLC en el Análisis del Porcentaje de Azúcares Reductores Totales

La comparación de los dos métodos se realizó mediante un contraste de comparación de las medias muestrales, planteando como hipótesis nula H_0 : que los métodos proporcionan los mismos resultados es decir $u_1 = u_2$ donde u_1 y u_2 son las medias muestrales obtenidas para cada método HPLC y fehling respectivamente. Para decidir si la diferencia entre las dos medias muestrales, es significativa se calcula el estadístico t.

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Donde } x_1 \text{ y } x_2 \text{ son los promedios obtenidos por el método 1 y 2, S}$$

es la desviación estándar calculada a partir de la siguiente ecuación:

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

La comparación se realizó para los azúcares reductores en las diferentes muestras (**Ext. Farrael, Ext. Fulton, Dil. Farrel, Dil. Fulton y Jugo claro**) los datos se registran en la tabla 27.

Tabla 27. Comparación de los métodos HPLC y Fehling para la determinación de ATR's, calculando t.

Azúcar Reductores Totales								
Muestra	HPLC			FEHLING			t-exp	t-cri
	Prom.	Desv. Estándar	CV	Promedio	Desv. Estándar	CV		
Ext. Farrel	0,84	0,02	2,40	0,56	0,04	7,03	1,30	
Ext. Fulton	0,79	0,02	2,41	0,57	0,04	6,69	1,04	
Dil. Farrel	0,57	0,01	2,53	0,48	0,03	6,95	0,40	2.14
Dil. Fulton	0,56	0,01	1,87	0,47	0,03	5,96	0,60	
Jugo claro	0,46	0,01	2,73	0,46	0,02	5,45	0,01	

En la tabla anterior se observa que la t calculada es menor que el t-crítico o tabulado para cada muestra, por tanto, la diferencia entre los dos métodos no es significativa para un intervalo de confianza al 5%, por lo que se acepta la hipótesis nula, y se concluye que los métodos tienen medias que no difieren significativamente.

Teniendo en cuenta que los métodos tienen valores medios que no son significativamente diferentes se pretende comparar las desviaciones estándar con el propósito de establecer si el método HPLC es más preciso que el fehling, por esto se establece una prueba F de una sola cola, los resultados se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Comparación de los métodos HPLC y Fehling para la determinación de ATR's, calculando F

Azúcar Reductores								
Muestra	HPLC			FEHLING			F-exp	F-crit
	Prom.	Desv. Estándar	CV	Prom.	Desv. Estándar	CV		
Ext. Farrel	0,84	0,02	2,40	0,56	0,04	7,03	3,80	
Ext. Fulton	0,79	0,02	2,41	0,57	0,04	6,69	4,00	
Dil. Farrel	0,57	0,01	2,53	0,48	0,03	6,95	5,50	3,79
Dil. Fulton	0,56	0,01	1,87	0,47	0,03	5,96	7,30	
Jugo claro	0,46	0,01	2,73	0,46	0,02	5,45	3,95	

Se puede apreciar que el valor de F obtenido es mayor que el valor crítico, lo que establece que la varianza el método fehling es mayor que la del método propuesto HPLC para un nivel de probabilidad del 5%. Lo cual nos permite concluir que el método de HPLC es más preciso que el fehling, para determinación de Azúcares Reductores.

7 CONCLUSIONES

1. Se implementó la metodología GS7/4/8-23 (2002) del manual de métodos ICUMSA para la determinación analítica por HPLC de azúcares reductores totales en jugos de caña en el laboratorio de Calidad del ingenio del Cauca S.A.S, concluyendo que es un método sensible, preciso, exacto, lineal y reproducible
2. Los límites de detección y de cuantificación para el método HPLC son adecuados para cada curva de calibración en cada azúcar, están sobre el primer nivel y permiten tener una cuantificación sensible a bajas concentraciones del compuesto.
3. La incertidumbre para el análisis de las muestras por HPLC se calcula con un t experimental mayor al t crítico obtenido de los resultados estadísticos aplicados para todos los ATR's validados, calculando la incertidumbre expandida a partir de la incertidumbre total combinada, pero aplicando un factor de recobro, observando que la incertidumbre del método proviene con mayor proporción de las fuentes aleatorias que de las fuentes sistemáticas.
4. Los datos obtenidos en la validación provienen de una población de datos normales permitiendo aplicar pruebas estadísticas paramétricas como ANOVA, para determinar las diferencias significativas en los resultados obtenidos en base a repetitividad y precisión intermedia del método.
5. Los formatos de captura de datos, protocolos de ensayo e instructivos técnicos, necesarios para llevar a cabo de manera clara la determinación de ATR's en jugos de caña por la técnica de HPLC se elaboraron y se implementara su aplicación en los laboratorios del ingenio del Cauca S.A.S
6. La determinación de Azúcares Reductores Totales por HPLC en los jugos de caña, presenta bajos coeficiente de variación (% CV), demostrando que la metodología implementada es precisa y genera resultados exactos.
7. El método por HPLC es más preciso que el de Fehling, para cada jugo de caña analizado, debido a que el valor de F (contraste de significación para la comparación de desviaciones estándar) calculado es mayor que el valor crítico.

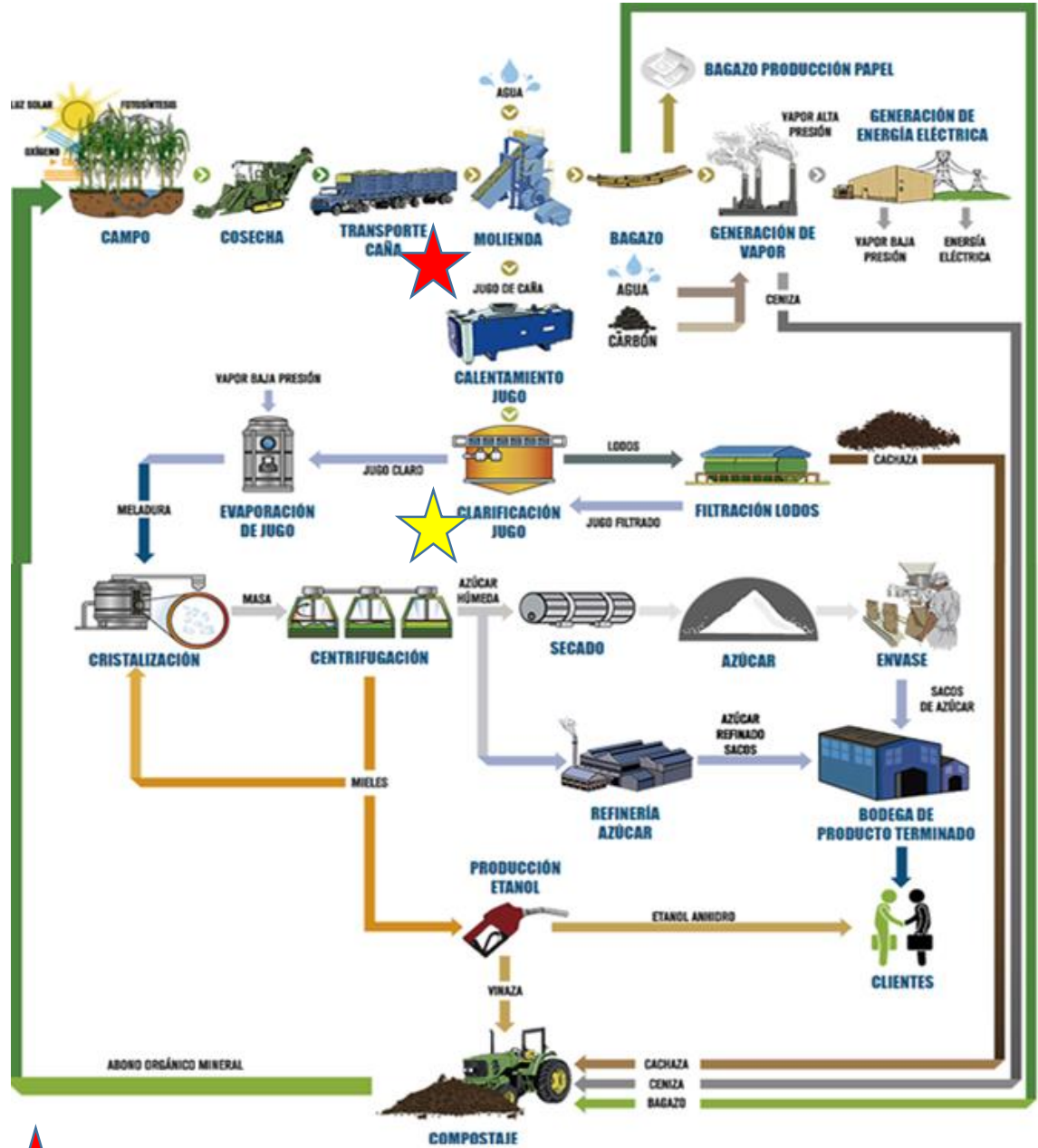
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ICUMSA, *Determinación de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC. (GS7/4/8-23)*. Alemania, 2002.
- [2] ICONTEC, “Sistema de gestión de la calidad. NTC-ISO9001:2008.”
[en línea]: <http://incauca.incc.4cloud.co/wp-content/uploads/2016/05/Certificado-Icontec-NTC-ISO-9001-2008.pdf>
- [3] L. Serrano, “Determinación de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el Ingenio Manuelita S.A,” p. 173, 2006.
- [4] INCAUCA, “Procesos de producción industrial.”
[en línea]: <http://www.incauca.com/es/procesos>
- [5] J. Ramirez, “Determinación De Sacarosa Invertida Por Efecto De Recirculación De Jugo Clarificado De Caña De Azúcar, En Un Evaporador De Placas De Película Descendente,” 2011.
- [6] J. E. Larrahondo, “Calidad de la Caña de Azúcar. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia,” pp. 337–355, 1995.
- [7] INCAUCA, “Sistema de gestión y certificaciones.”
[en línea]: <http://www.incauca.com/es/nosotros/quienes-somos/sistemas-de-gestion/>
- [8] S. Sandoval, “Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos,” *Dep. salud Ambient. Santiago Chile*, p. 66, 2010.
- [9] J. N. Miller and J. M. Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4th ed. Pearson Educación, 2002.
- [10] T. A. Skoog, Douglas A.; Holler, James; Nieman, *Principios De Análisis Instrumental*, 5th ed. 2001.
- [11] R. Castillo A., Beatriz, Gonzalez H., “Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la cuantificación de Fármacos.,” *Rev. Cuba. Farm.*, 1996.
- [12] G. F. Mercader, *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*, 2nd ed. Mexico, 2005.
- [13] FAO/OMS, *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento.*, 18th ed. 2016.
- [14] W. Chairman and E. Secretary, “Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, Guía CG 4 EURACHEM / CITAC,” *Eurachem/Citac*, vol. 3rd Editio, p. 133, 2012.

- [15] T. Morrison, *Química Orgánica*, 5th ed. Mexico: Pearson Education, 1990.
- [16] M. Robert, *Bioquímica de Harper*, 13th ed. Mexico: El Manual Moderno, 1994.
- [17] M. Tonellato, "Chimica dei carboidrati," *Pianeta Chim.*
[en línea]: <http://www.pianetachimica.it/didattica/carboidrati/carboidrati.htm>
- [18] M. Murry, *Química Orgánica*, 5th ed. Mexico, 2001.
- [19] Z. Diaz and H. Hurtado, "Cromatografía de intercambio ionico," p. 7, 2005.
- [20] G. Bello, Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Icidca*, 40, 45–50, 2016
- [21] L. Casas Cardoso, "Determinación de azúcares reductores en miel final por Cromatografía Líquida de Alta Resolución." *Centro Azúcar*, vol. 28, no. 2, p. 17. Academic OneFile, 2001
- [22] H. Huang, Evaluation of the quantity and composition of sugars and lipid in the juice and bagasse of lipid producing sugarcane. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10(March), 148–155, 2017
- [23] A. Diez, Determinación de Sacarosa Fructosa y Glucosa por Cromatografía Líquida de alta presión (HPLC). En: *Revista Industrial y agrícola de Tucumán*. Vol. 69, No. 2 P 87-92, 1992
- [24] L. Hernández, *Introducción al análisis instrumental*. España: Ed. Ariel Ciencia. 2002. P 578
- [25] M. Chicharro, Bull et al. *Cromatografía Principios y Aplicaciones*
[en línea]:
<https://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones>
- [26] G. Mantovani, Application of planar chromatography to sample analysis in the sugar industry. *Carbohydrate Polymers*, 37(3), 263–272, 1998
- [27] A. Accorsi, C., Determination of volatile and non-volatile organic acids in technical sugar solutions by ion-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography*, 555 (1–2), 65–71, 1991
- [28] J. D. Blake, Determination of organic acids in sugar cane process juice by high-performance liquid chromatography: improved resolution using dual aminex HPX-87H cation-exchange columns equilibrated to different temperatures. *Journal of Chromatography A*, 398(C), 265–277.

ANEXOS

ANEXO A: Diagrama del proceso de producción de la caña de azúcar



★ Punto de muestreo de los jugos de los molinos Farrel y Fulton (Primera extracción y diluido).

★ Punto de muestreo del jugo clarificado o claro.

ANEXO B: Datos de los porcentajes de ATR´s en jugos de caña por HPLC

Tabla 1: Porcentajes de ATR´s por HPLC en muestras de las 9:00 am

MUESTRAS 9:00 AM				
MUESTRA	DIA	SACAROSA %	GLUCOSA %	FRUCTOSA %
EXT. FARREL	1	14,697	0,296	0,581
	2	13,759	0,336	0,327
	3	12,186	0,462	0,505
	4	12,922	0,351	0,455
	5	14,838	0,265	0,349
	6	13,934	0,425	0,498
EXT. FULTON	1	10,909	0,553	0,670
	2	13,356	0,315	0,333
	3	13,021	0,435	0,527
	4	13,257	0,554	0,734
	5	13,521	0,155	0,233
	6	14,341	0,512	0,579
DIL. FARREL	1	10,918	0,237	0,373
	2	11,606	0,315	0,347
	3	10,396	0,382	0,417
	4	11,923	0,154	0,235
	5	15,119	0,284	0,369
	6	12,378	0,239	0,29
DIL. FULTON	1	11,833	0,217	0,375
	2	11,237	0,299	0,373
	3	11,189	0,37	0,439
	4	11,287	0,233	0,317
	5	11,144	0,258	0,371
	6	11,592	0,309	0,389
JUGO CLARO	1	10,473	0,247	0,223
	2	11,654	0,218	0,247
	3	11,953	0,274	0,302
	4	12,857	0,208	0,269
	5	11,512	0,167	0,219
	6	11,915	0,224	0,270

Tabla 2: Porcentajes de ATR's por HPLC en muestras de las 11:00 am

MUESTRAS 11:00 AM				
MUESTRA	DIA	SACAROSA %	GLUCOSA %	FRUCTOSA %
EXT. FARREL	1	14,968	0,342	0,466
	2	14,634	0,236	0,246
	3	13,275	0,448	0,687
	4	12,804	0,286	0,359
	5	15,413	0,267	0,346
	6	13,949	0,46	0,553
EXT. FULTON	1	12,166	0,198	0,278
	2	13,031	0,387	0,426
	3	15,947	0,302	0,382
	4	12,974	0,257	0,328
	5	15,826	0,297	0,346
	6	16,435	0,288	0,278
DIL. FARREL	1	14,725	0,376	0,596
	2	11,483	0,271	0,329
	3	9,771	0,255	0,479
	4	10,464	0,225	0,289
	5	10,767	0,287	0,478
	6	11,343	0,284	0,363
DIL. FULTON	1	10,28	0,367	0,589
	2	10,596	0,401	0,520
	3	11,985	0,225	0,311
	4	12,093	0,312	0,39
	5	12,51	0,33	0,408
	6	11,372	0,348	0,492
JUGO CLARO	1	12,347	0,237	0,240
	2	11,595	0,239	0,273
	3	11,479	0,227	0,279
	4	11,483	0,183	0,227
	5	11,661	0,187	0,228
	6	11,892	0,255	0,299

ANEXO C: Datos para la comparación entre HPLC y Lane y Eynon

Tabla 1: Comparación de ATR's obtenidos por HPLC y Fehling (Extracción Farrel)

DIA	HPLC			FEHLING	
	%Sacarosa	%Glucosa	% Fructosa	ATR's	ATR's
DIA 1	13,078	0,396	0,433	0,829	0,575
DIA 2	14,061	0,421	0,430	0,851	0,606
DIA 3	14,672	0,400	0,430	0,830	0,604
DIA 4	14,332	0,385	0,446	0,831	0,543
DIA 5	14,911	0,389	0,438	0,827	0,514
DIA 6	14,635	0,415	0,467	0,882	0,513
DIA 7	14,022	0,395	0,424	0,819	0,573
DIA 8	13,949	0,397	0,442	0,839	0,518

Tabla 2: Comparación de ATR's obtenidos por HPLC y Fehling (Extracción Fulton)

DIA	HPLC			FEHLING	
	%Sacarosa	%Glucosa	% Fructosa	ATR's	ATR's
DIA 1	14,136	0,382	0,407	0,789	0,606
DIA 2	14,883	0,369	0,417	0,786	0,535
DIA 3	15,535	0,393	0,418	0,811	0,525
DIA 4	15,906	0,349	0,433	0,782	0,604
DIA 5	15,573	0,392	0,426	0,818	0,554
DIA 6	15,998	0,396	0,415	0,811	0,617
DIA 7	15,323	0,373	0,391	0,764	0,593
DIA 8	15,260	0,382	0,395	0,777	0,531

Tabla 3: Comparación de ATR's obtenidos por HPLC y Fehling (Diluido Farrel)

DIA	HPLC			FEHLING	
	%Sacarosa	%Glucosa	% Fructosa	ATR's	ATR's
DIA 1	11,824	0,256	0,282	0,538	0,510
DIA 2	11,252	0,276	0,303	0,579	0,493
DIA 3	12,567	0,273	0,307	0,580	0,443
DIA 4	11,813	0,274	0,283	0,557	0,520
DIA 5	12,176	0,264	0,315	0,579	0,475
DIA 6	12,307	0,292	0,277	0,569	0,427
DIA 7	11,811	0,280	0,293	0,573	0,505
DIA 8	12,196	0,270	0,294	0,564	0,505

Tabla 4: Comparación de ATR's obtenidos por HPLC y Fehling (Diluido Fulton)

DIA	HPLC			FEHLING	
	%Sacarosa	%Glucosa	% Fructosa	ATR's	
DIA 1	11,279	0,290	0,270	0,560	0,500
DIA 2	11,111	0,251	0,301	0,552	0,450
DIA 3	11,587	0,265	0,292	0,557	0,450
DIA 4	12,370	0,272	0,279	0,551	0,460
DIA 5	11,599	0,274	0,304	0,578	0,520
DIA 6	11,263	0,283	0,271	0,554	0,450
DIA 7	11,155	0,270	0,273	0,543	0,460
DIA 8	10,482	0,274	0,290	0,564	0,500

Tabla 5: Comparación de ATR's obtenidos por HPLC y Fehling (Jugo Claro)

DIA	HPLC			FEHLING	
	%Sacarosa	%Glucosa	% Fructosa	ATR's	
DIA 1	11,950	0,235	0,231	0,466	0,440
DIA 2	11,349	0,247	0,228	0,475	0,500
DIA 3	11,295	0,230	0,227	0,457	0,460
DIA 4	11,187	0,239	0,222	0,461	0,450
DIA 5	11,519	0,214	0,218	0,433	0,430
DIA 6	11,820	0,236	0,227	0,463	0,480
DIA 7	11,209	0,227	0,227	0,454	0,470
DIA 8	11,425	0,247	0,219	0,466	0,430

