

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE
GLUCOSA Y FRUCTOSA USANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO
RENDIMIENTO (CLAR), EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE ÁCIDO
CÍTRICO Y DETERMINACIÓN DE PUREZA ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE LA
TÉCNICA VOLUMÉTRICA EN LA PLANTA DE ÁCIDO CÍTRICO DE SUCROAL**



Universidad
del Cauca

DAIRA YANIRA IPAZ RODRÍGUEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN 2022**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE
GLUCOSA Y FRUCTOSA USANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO
RENDIMIENTO (CLAR), EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE ÁCIDO
CÍTRICO Y DETERMINACIÓN DE PUREZA ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE LA
TÉCNICA VOLUMÉTRICA EN LA PLANTA DE ÁCIDO CÍTRICO DE SUCROAL**

DAIRA YANIRA IPAZ RODRÍGUEZ

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

Director

RODRIGO SARRIA

PROFESOR ASOCIADO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

JESÚS PLAZAS

LABORATORIO DE CALIDAD SUCROAL.S.A.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

POPAYÁN 202

Nota de aceptación

Director _____

Rodrigo Andrés Sarria Villa. Dr.

Jurado _____

Edier Humberto Pérez. Ph. D

Jurado _____

Germán Cuervo Ochoa. Ph. D

Fecha de sustentación: 26 de octubre de 2022

Dedicatoria

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

A San Sebastián Martír de Yascual Nariño por los milagros y favores recibidos.

A mi hijo Alejandro Recalde Ipaz por ser mi gran motivación e impulsarme a superar y trabajar fuertemente para ofrecerle lo mejor.

Agradecimientos

A mi familia, Alejandro Recalde, Marina Rodríguez, Erminul Ipaz, Maribel Ipaz Sara Bohórquez, quienes han sido mi motor, apoyo y ayuda incondicional, gracias por su paciencia e infinito amor.

Al profesor Rodrigo Andrés Sarria Villa. Dr., por su guía, enseñanza, dedicación, motivación y acompañamiento en este proceso.

A la universidad del Cauca y a los profesores del departamento de Química por poner un granito de arena en mi formación académica y profesional.

De igual manera agradecer a mis compañeros de clase, Ximena Prieto, Ximena Correa, Alejandro Salamanca, Laura Córdoba por su colaboración y momentos compartidos.

A Sucroal S.A. por permitirme realizar mi práctica profesional, por facilitar los medios y recursos para la realización del proyecto. Agradecer a todas las personas pertenecientes al laboratorio de Calidad Cítrico y Alcoquímica que me apoyaron, me aconsejaron, me divertieron con sus ocurrencias y aportaron con sus conocimientos, especialmente a Leslie Rueda y Jesús Plazas por su asesoría y tiempo dedicado.

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

Finalmente quiero agradecer a 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.

Contenido

Resumen	1
Introducción	2
1. Planteamiento del problema	4
2. Marco teórico y estado del arte	5
2.1. Generalidades del ácido cítrico	5
2.1.1 Producción industrial.....	5
2.1.2. Reseña histórica en Colombia	5
2.1.3 Ácido cítrico	6
2.1.3.1 Obtención de ácido cítrico	6
2.1.3.2 Etapas del proceso de obtención de ácido cítrico	7
2.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR)	9
2.3 Validación de un método analítico	12
2.3.1 Límite de detección (LD)	12
2.3.2 Límite de cuantificación (LC).....	12
2.3.3 Intervalo de trabajo y rango lineal	13
2.3.4 Precisión.....	13
2.3.5 Exactitud.....	13
3.OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1 Materiales, equipos y reactivos	15
4.2 Verificación del material volumétrico	16
4.3 Preparación de soluciones patrón para estandarización de método por CLAR	17
4.4 Estandarización de método para la determinación de glucosa y fructosa en el proceso de fermentación para la obtención de ácido cítrico.....	17
4.4.1 Evaluación de condiciones cromatográficas.....	17
4.4.1.1 Reconocimiento de señales cromatográficas.....	17
4.4.1.2 Selección del estándar interno	18
4.4.1.3 Determinación del tiempo de análisis	19
4.4.2 Optimización de resolución	19
4.4.2.1 Variación de la concentración de la fase móvil y flujo	19

4.4.2.2 Volumen de inyección	20
4.4.3. Determinación de los parámetros de estandarización	20
4.4.3.1 Límites de detección y cuantificación.....	20
4.4.3.2 Linealidad y rango dinámico.....	21
4.4.3.3 Precisión.....	21
4.4.3.4 Exactitud.....	22
4.5 Validación de método por volumetría para la determinación de pureza en producto terminado de ácido cítrico.	22
4.5.1. Características de desempeño para la validación	22
4.5.1.1 Precisión expresada en repetibilidad y precisión intermedia.....	22
4.5.1.2 Exactitud expresada en forma de recuperación.....	23
4.5.1.3 Linealidad.....	23
4.5.1.4 Tabla de control.....	23
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	24
5.1 Calibración del material de vidrio.....	24
5.2 Estandarización de un método para la determinación de glucosa y fructosa en el proceso de fermentación de ácido cítrico.	25
5.2.1 Evaluación de las condiciones cromatográficas.	25
5.2.1.1 Reconocimiento de señales cromatográficas.....	25
5.2.1.2 Elección de estándar interno	27
5.2.1.3 Determinación del tiempo de análisis	28
5.2.2 Optimización de la resolución	29
5.2.2.1 Variación de la concentración de la fase móvil y flujo en CLAR.....	29
5.2.2.2 Volumen de inyección	31
5.2.3 Determinación de los parámetros de estandarización	31
5.2.3.1 Límites de detección y cuantificación.....	31
5.2.3.2 Linealidad y rango dinámico	33
5.2.3.3 Precisión.....	37
5.2.3.4 Exactitud	39
5.3 Validación de método por volumetría para la determinación de pureza en producto terminado de ácido cítrico.	40
5.3.1. Características de desempeño para la validación	40
5.3.1.1 Linealidad de la validación.....	40

5.3.1.2 Precisión expresada en repetibilidad y precisión intermedia de la validación	41
5.3.1.3 Exactitud expresada en forma de recuperación de la validación	41
5.3.1.4 Seguimiento y control al producto terminado de ácido cítrico	42
6. Conclusiones	43
7. Bibliografía.....	44

Lista de tablas

Tabla 1.	Material usado en los procedimientos de estandarización y validación.	15
Tabla 2.	Equipos utilizados en el procedimiento de estandarización de glucosa y fructosa por CLAR y equipos usados para la validación de producto terminado de ácido cítrico. ..	15
Tabla 3.	Reactivos usados en el procedimiento para la estandarización de glucosa y fructosa por CLAR y para la validación en la determinación de pureza por titulación.....	16
Tabla 4.	Preparación de soluciones de trabajo inicial.....	17
Tabla 5.	Condiciones iniciales del método cromatográfico.	18
Tabla 6.	Tiempos de retención de azúcares y alditoles usando la columna Aminex HPX-87H, fase móvil H ₂ SO ₄ 0,005 M, flujo 0,6 mL/min y de temperatura 65 °C.....	18
Tabla 7.	Ensayo para analizar variables de concentración de fase móvil y flujo.....	19
Tabla 8.	Ensayos experimentales de las diferentes concentraciones de fase móvil y los diferentes flujos.....	19
Tabla 9.	Ensayos experimentales del volumen de inyección de estándares de glucosa y fructosa en CLAR	20
Tabla 10.	Condiciones de estandarización en la determinación de glucosa y fructosa mediante cromatografía líquida de alta resolución.	21
Tabla 11.	Concentración de glucosa y fructosa con su respectivo patrón interno de las soluciones multicomponentes de cada punto de las curvas	21
Tabla 12.	Resultados de la verificación de algunos balones aforados.	24
Tabla 13.	Variables estadísticas de los ensayos de resolución de 10 y 20 microlitros.	31
Tabla 14.	Variables estadísticas de límite de detección de los analitos de glucosa y fructosa	32
Tabla 15.	Variables estadísticas del límite de cuantificación de los analitos de glucosa y fructosa	33
Tabla 16.	Análisis de normalidad para los límites de cuantificación de glucosa y fructosa.	33
Tabla 17.	Coeficiente de determinación lineal obtenidos en el rango de trabajo.....	34
Tabla 18.	Relación de concentración del analito/patrón interno y relación de áreas analito/ patrón interno.	34
Tabla 19.	Evaluación de la linealidad para la estandarización de glucosa y fructosa por CLAR teniendo en cuenta los parámetros de coeficiente de determinación, pendiente e intercepto.	35
Tabla 20.	Desviación estándar relativa para la glucosa y fructosa.....	38
Tabla 21.	Análisis de varianza para la glucosa	38
Tabla 22.	Análisis de varianza para la fructosa	39

Tabla 23.	Error relativo porcentual obtenido para 10 soluciones multicomponentes de glucosa y fructosa y con su respectivo patrón interno	40
Tabla 24.	Análisis de varianza para la linealidad de producto terminado de ácido cítrico	40
Tabla 25.	Análisis de varianza de un solo factor para la precisión de producto terminado de ácido cítrico.....	41
Tabla 26.	Precisión del método expresado en repetibilidad y precisión intermedia.....	41
Tabla 27.	Exactitud del método expresado en recuperación tratados en dos niveles de concentración	42

Lista de figuras

Figura 1.	Estructura molecular del ácido cítrico.	6
Figura 2.	Esquema general del proceso de obtención de ácido cítrico	7
Figura 3.	Esporas de <i>Aspergillus Níger</i> etapa de germinación 14 Horas visto en microscopio electrónico LEICA ICC50 W en instalaciones de Sucroal.....	8
Figura 4.	a) <i>Aspergillus Níger</i> de 25 horas comenzando etapa productiva parte izquierda, b) <i>Aspergillus Níger</i> de 95 horas finalizando etapa productiva parte derecha visto al microscopio electrónico LEICA ICC50 W en instalaciones de Sucroal.	8
Figura 5.	Cromatograma de estándar glucosa en CLAR-IR.....	26
Figura 6.	Cromatograma de estándar de fructosa en CLAR-IR.....	26
Figura 7.	a) Estructura molecular del estireno b) divinilbenceno, (c) polímero de estireno-divinilbenceno, (d) polímero sulfonado con ion fijo H ⁺	27
Figura 8.	. Cromatograma de estándar de arabinosa en CLAR-IR.....	28
Figura 9.	CLAR-IR de los estándares de glucosa, fructosa y patrón interno arabinosa a 60 minutos. 29	29
Figura 10.	Resolución obtenida de la Interacción de las diferentes concentraciones de la fase móvil y los flujos.....	30
Figura 11.	Resolución obtenida de la interacción de los flujos con respecto a las diferentes concentraciones de la fase móvil.....	31
Figura 12.	Graficas de residuos para glucosa, a) probabilidad normal de residuos, b) residuos vs ajuste, c) histograma, d) residuos vs orden.....	36
Figura 13.	Gráficas de residuos para fructosa, a) probabilidad normal de residuos, b) residuos vs ajuste, c) histograma, d) residuos vs orden.....	37
Figura 14.	Distribución de F de Fisher, grado de libertad de numerador 2 y grado de libertad del denominador 42.....	39
Figura 15.	Figura. Gráfico de control de pureza de producto terminado de ácido cítrico 42	42

Lista de acrónimos y abreviaturas

ACA: ácido cítrico

H: Hora

CLAR: Cromatografía líquida de alta rendimiento

RI: Detector de índice de refracción

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

S/N: Señal/Ruido

R²: Coeficiente de determinación lineal

S: Desviación estándar

RSD: Desviación estándar relativa

H₀: Hipótesis nula

H_a: Hipótesis alterna

ATR's: Azúcares reductores totales

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar métodos con el fin de obtener un producto (ácido cítrico) con la mejor calidad, en primer lugar se desarrolló una estandarización para la determinación simultánea de azúcares (glucosa, fructosa) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) acoplada con detector de índice de refracción RI, usando una columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, operando a 60 °C y fase móvil ácido sulfúrico 3,5 mM, de caudal 0,6 mL/min (isocrático) y 20 µL de inyección y patrón interno arabinosa 0,1 %m/v, el procedimiento de estandarización desarrollado incluyó una buena linealidad en el rango dinámico de 0,06 – 0,24% m/v para la glucosa y fructosa con un R² superior a 0,998, el límite de detección (LD) para la glucosa y fructosa fue 0,006 %m/v, y el límite de cuantificación fue 0,06 %m/v. El método CLAR-RI mostró una buena repetibilidad (RSD menor al 2 %) y para la precisión intermedia no se presentaron diferencias significativas entre las medias para los diferentes días en los análisis de la estandarización para la glucosa y fructosa.

En segundo lugar, se realizó una medición volumétrica para la determinación de la pureza de ácido cítrico utilizando el titulador automático TITRONIC®300, en el cual se observó una linealidad del 0,9998, una exactitud expresada como recuperación (nivel bajo y nivel alto) y que cumplió con el criterio de aceptación entre 99-110 % m/v, este método también presentó buena precisión evaluada como precisión intermedia y repetibilidad, las cuales presentaron valores de RSD menores al 2%. Para hacer un seguimiento de los resultados de los ensayos de pureza de producto terminado de ácido cítrico se realizó un gráfico de control establecido de acuerdo al promedio, a dos desviaciones estándar y la varianza.

PALABRAS CLAVE: Ácido cítrico, cromatografía líquida, patrón interno, estandarización, glucosa, fructosa, validación, Sucroal

Introducción

Sucroal S.A. es una industria biotecnológica que cuenta con dos divisiones, ingredientes alimenticios y soluciones industriales que satisfacen la demanda del consumidor con soluciones sostenibles, innovadoras, cuidado del medio ambiente y con responsabilidad social. En la división de soluciones industriales se encuentra la producción de materias primas para el proceso de producción de cuidado personal, agroindustria, nutrición animal, polímeros y recubrimientos, la división de alimentos cuenta con la producción de citratos especiales, citrato de sodio, citrato de potasio y como eje central de esta división esta la producción de ácido cítrico. Los productos elaborados en Sucroal son distribuidos a nivel nacional e internacional por lo que debe garantizar una alta calidad y certificar que los productos fabricados sean seguros. En la obtención de estos productos de buena calidad se tiene en cuenta en conjunto las buenas prácticas de manufactura, parte operativa, instalaciones, equipos y por su puesto métodos analíticos documentados que sean validados y verificados, competentes, reproducibles y fiables que cumplan con las normativas vigentes nacionales e internacionales de los entes regulatorios tanto en materias primas, producto en proceso y producto terminado.

Los laboratorios de control de calidad son parte fundamental de la cadena en la elaboración de productos. En estas instalaciones, con condiciones ambientales controladas, personal calificado y con instrumentos analíticos se estandarizan y se validan métodos de análisis con los criterios de aceptación de los productos en condiciones de proceso y terminado generando un certificado de calidad el cual suministra información precisa y confiable. La estandarización y validación de los diversos métodos analíticos, consiste en confirmar, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto, estas evidencias se pueden demostrar con la adquisición de datos y el comportamiento de estos en términos de límite de detección, límite de cuantificación, rango de linealidad, sensibilidad, selectividad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez. Tal confirmación requiere el empleo de la estadística descriptiva o inferencial como una herramienta para poder garantizar que los resultados obtenidos para los métodos aplicados son absolutamente confiables tal como se describe en el protocolo de validaciones interno de la empresa Sucroal QC-PRO-04 versión 04.

Uno de los productos ofertados en Sucroal es el ácido cítrico, el microorganismo *Aspergillus Níger* consume azúcar (materia prima) y en presencia de macro y micro sales y en condiciones de medio adecuadas produce ACA y se realiza una serie de procesos para obtener este producto en una alta concentración. Para salir este producto al mercado necesita una serie de análisis tanto en proceso como en el producto terminado, es por esta razón que en este proyecto se estandarizó glucosa y fructosa mediante cromatografía líquida de alta resolución para conocer el azúcar hidrolizado (glucosa y fructosa) en el proceso de fermentación de ácido cítrico y mediante volumetría se determinó la pureza (contenido) en el producto terminado de ácido cítrico.

Se cuantificó glucosa y fructosa mediante CLAR-RI, usando columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, con fase móvil de solución de ácido sulfúrico 3,5 mM isocráticamente y en la estandarización se tuvieron en cuenta dos aspectos, el tipo de columna para separar los analitos de interés (glucosa y fructosa) y los tiempos de retención. De Sá et al. (2011) reporta la determinación de glucosa y fructosa usando la columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm.

Por otro lado, al producto terminado de ácido cítrico se realizó la determinación de pureza mediante titulador automático puesto que este análisis anteriormente se realizaba con bureta convencional. Cabe resaltar que, aunque la titulación ácido-base es una operación de rutina, existen varios tipos de fuentes de error que pueden hacer que el resultado de la titulación difiera de la realidad, como la concentración o el volumen del titulante, la precisión volumétrica de la bureta y algunos posibles errores aleatorios (principalmente errores humanos). Muchos de ellos están relacionados con la solución titulante, los tituladores se preparan comúnmente de forma manual utilizando productos químicos de reserva o diluyendo de una solución concentrada de titulante. Para mejorar la exactitud y la precisión en la determinación de pureza en producto terminado de ácido cítrico, se ha propuesto el titulador automático con el fin de mitigar estos ciertos errores y obtener resultados confiables y precisos.

Se definió las características de validación para la determinación de pureza en producto terminado de ácido cítrico y se implementó el método en las muestras reales a estos resultados se les realizó un seguimiento mediante carta o gráfico de control que permitió evaluar la variabilidad de los resultados dentro de los límites de control establecidos de acuerdo al promedio, la desviación estándar, la varianza, etc, y de esta forma esbozar a partir de las tendencias de los datos el comportamiento del método como tal, la confiabilidad de los datos emitidos por los equipos, la confiabilidad de los datos obtenidos mediante el trabajo de un analista, la confiabilidad de los datos obtenidos durante el tiempo, la calidad de los reactivos involucrados y los atributos de validación necesarios.

1. Planteamiento del problema

Entre los productos ofertados por Sucroal se encuentran el ácido cítrico, en su proceso de obtención utiliza como fuente de energía el azúcar (sacarosa), la cual en el proceso se hidroliza en glucosa y fructosa, estas sustancias son el sustrato principal en la fermentación. Puesto que existe una constante búsqueda en el mejoramiento continuo para investigar y definir estrategias que permitan aumentar el rendimiento y reducir el costo de producción, es muy importante conocer que cantidad de glucosa y fructosa queda en el sustrato al momento que finaliza el proceso y si su consumo por el microorganismo *Aspergillus Níger*, se ha efectuado en su totalidad, esto pues constituye uno de los costos más altos asociados al proceso por ser la materia de mayor volumen, por otro lado si existe un azúcar residual del 0,25 % puede ocasionar un incremento de sustancias carbonizables en el proceso de cristalización lo cual genera un reproceso (costo adicional en la operación) de este producto y también se afecta el tiempo de vida media del producto que se ve reflejado físicamente con una coloración amarilla, olor desagradable y en cambio de concentración en la pureza. En la actualidad esta verificación se ha realizado a través de la técnica volumétrica de azúcares reductores totales (ATR's) la cual se lleva a cabo mediante la titulación de Lane Eynon, esta técnica se basa en la reducción de azúcar por iones Cu^{2+} , donde el punto final es establecido por la sensibilidad del ojo humano y la limitación de la perspectiva del individuo frente a un cambio de color, por lo cual se necesita de un método más selectivo con menos efectos de errores sistemáticos y que garantice precisión y exactitud para su cuantificación. Por esta razón, en este proyecto se pretende estandarizar la técnica de análisis para determinar el contenido de glucosa y fructosa usando la técnica analítica de cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y verificar la cantidad de sacarosa en el proceso y por otro lado determinar la pureza (concentración) de ácido cítrico en producto terminado mediante la técnica volumétrica usando titulador automático con el fin de minimizar errores sistemáticos al usar bureta convencional.

2. Marco teórico y estado del arte

2.1. Generalidades del ácido cítrico

El ácido cítrico fue aislado por primera vez por Scheels Karls en 1874, en Inglaterra, a partir del jugo de limón importado de Italia. Empresarios italianos tenían el monopolio por su producción durante casi 100 años, el cual fue vendido a un alto costo. Esto llevó numerosos esfuerzos de todo el mundo para encontrar alternativas para su producción, que incluyó técnicas químicas y microbianas. Wehmer, en 1907 fue el primero en observar la presencia de ácido cítrico como un subproducto en la producción de oxalato de calcio utilizando cultivos de *Penicillium glaucum*. En 1913 Zahorsky, obtuvo la patente de producción de ácido cítrico vía fermentación con *Aspergillus Níger* (Papagianni, 2007). Tom y Currie en 1916, establecieron que algunas especies del género *Penicillium* podían producir ácido cítrico, sin embargo, el medio de fermentación se contaminaba fácilmente debido al pH neutro que requería el proceso, y en 1917 Currie desarrolló la vía industrial basado en la observación de que el microorganismo *Aspergillus. Níger* crece bien en un pH entre 2.5 - 3.5, lo que permitía eliminar los problemas de contaminación. Observó además que a mayor concentración de azúcar mejor era la producción y que los mayores rendimientos se obtenían restringiendo el desarrollo del micelio (Lucía & Schouben, 2012)

2.1.1 Producción industrial

Cada año se fabrican miles de toneladas de ácido cítrico en todo el mundo y su demanda se incrementa continuamente dada su naturaleza y característica como la biodegradabilidad, ecológico, biocompatibilidad, no toxicidad y efecto antibacterial y quienes lideran esta producción son, China, Europa Occidental y Estados Unidos. Se espera que para los años comprendidos entre 2021-2025 el mercado de ácido cítrico crezca a una tasa compuesta anual del 8 % (Mores *et al.*, 2021), lo anterior se estipula debido a que este producto se lo utiliza en un 60 % de la producción de ácido cítrico como acidulante y conservante para prevenir el deterioro oxidativo del sabor y el color en alimentos y bebidas procesadas, en un 15 % se usa como complejante y agente tampón en las industrias farmacéuticas y cuidado personal, también se utiliza 12 % como ablandador de agua para detergentes y en un 6 % aproximadamente como quelante en el tratamiento de metales y el 10 % en otros usos.

2.1.2. Reseña histórica en Colombia

En 1966, nace SUCROMILES a partir de un convenio entre LABORATORIOS MILES de Estados Unidos y Sucroquímica Colombiana S.A, una empresa fundada en 1962 por un grupo de industriales del sector azucarero del Valle del Cauca. LABORATORIOS MILES aportó una tecnología diferente a la utilizada en la Sucroquímica para la producción de ácido cítrico caracterizada por un proceso de fermentación sumergida, realizada en reactores o fermentadores cerrados y totalmente asépticos, utilizando como materia prima azúcar refinada para su transformación en ácido cítrico. Para el año de 1986, la empresa americana MILES LABORATORIOS INC. fue adquirida por la empresa alemana Bayer, para pasar a pertenecer a la organización TATE & LYLE en 1998.

En el 2012, Sucromiles pasó a ser parte de la ORGANIZACIÓN ARDILA LULLE (OAL), la cual decide cambiar el nombre de la industria de Sucromiles a Sucroal para reflejar un nuevo comienzo con una nueva estrategia y una amplia oferta de productos. Hoy en día, la

OAL es reconocida como uno de los mayores productores de caña de azúcar en el mundo. La ORGANIZACIÓN ARDILA LULE (Sucroal S.A.) es la principal accionista de esta importante empresa que es la más productora de ácido cítrico en el país y la quinta a nivel mundial con una capacidad de producción de 32.000 ton/año y con el objetivo de llegar producir 40.000 ton/año.

2.1.3 Ácido cítrico

El ácido cítrico (figura 1), está presente en la mayoría de las frutas sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarbónico su fórmula química es $C_6H_8O_7$ y su nombre IUPAC es ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarbónico, tiene un peso molecular de 192,124 g/mol, debido a que tiene tres grupos funcionales carboxílicos, contiene tres valores de pKa 3,1, 4,7, y 6,4. En su presentación industrial es un polvo cristalino, inodoro, blanco, además su importancia se debe a que se destacan tres propiedades, acidez, sabor y la formación de diferentes sales metálicas (Ajala *et al.*, 2020)

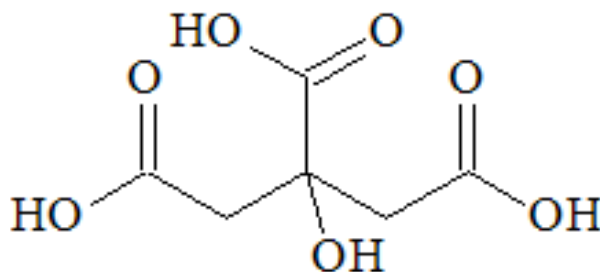


Figura 1. Estructura molecular del ácido cítrico.

2.1.3.1 Obtención de ácido cítrico

En la actualidad la producción comercial de ácido cítrico se realiza mediante tres procesos, el primer proceso es mediante fermentación sumergida (técnica más utilizada), esta técnica tiene la ventaja de producir altos rendimientos y bajo costo de mano de obra, existen dos tipos de fermentadores, el convencional con agitación y el fermentador en columna de aire, éste último es el más utilizado debido al precio, tamaño y funcionamiento. El segundo proceso de fermentación usada es la de superficie, este método requiere menos esfuerzo en el funcionamiento e instalación, los costos de energía son inferiores, aunque es necesaria más mano de obra, se debe mantener controlado la temperatura y la humedad mediante la circulación de aire. Finalmente, el tercer proceso de fermentación es en estado sólido, consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema. La velocidad de crecimiento de los microorganismos es menor que en la fermentación sumergida y su aplicación se encuentra limitada a microorganismos (Mores *et al.*, 2021)

El proceso de producción de ácido cítrico en Sucroal se hace mediante fermentación sumergida en fermentador columna y utiliza el microorganismo *Aspergillus Níger*, esta

producción sigue el esquema general (figura 2) y en cada sección debe llevarse control temperatura, pH, acidez



Figura 2. Esquema general del proceso de obtención de ácido cítrico

2.1.3.2 Etapas del proceso de obtención de ácido cítrico

- Fermentación

Existen una serie de procesos previos antes de iniciar la fermentación.

Preparación del jarabe, el alimento (azúcar) para el *Aspergillus Níger* es diluida en un 20%*m/v* posteriormente se pasa por un filtro Pannevis con el objetivo de quitarle materia extraña, luego este líquido se pasa por columnas de intercambio iónico (catiónica y aniónica) y por celdas de carbón activado para retirar iones y color al jarabe, finalmente se realiza una pasteurización, con el fin de esterilizar el jarabe para que el microorganismo pueda generar de manera correcta el producto ácido cítrico sin ninguna afectación por contaminación

Por otro lado, se realiza la inoculación, en este proceso se trasfiere las esporas del *Aspergillus Níger* a un germinador (figura 3). En el proceso de germinación el microorganismo crecerá y se desarrollará, para luego ser adicionado a los fermentadores.

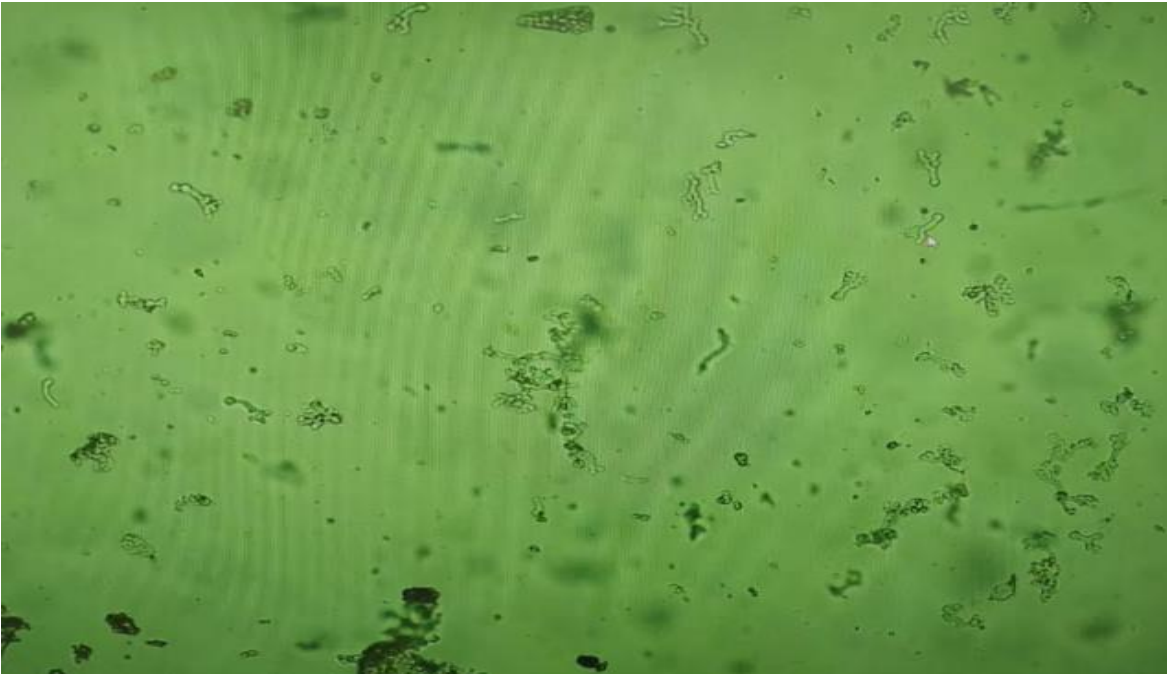


Figura 3. Esporas de *Aspergillus Níger* etapa de germinación 14 Horas visto en microscopio electrónico LEICA ICC50 W en instalaciones de Sucroal

Después de la germinación el microorganismo *Aspergillus Níger* pasa al proceso de fermentación (figura 4a), el microorganismo es adicionado al tanque de jarabe (alimento) que anteriormente ha sido tratado, es aquí donde el microorganismo produce ácido cítrico y es controlado para mayor producción y no gaste el consumo de alimento en energía.

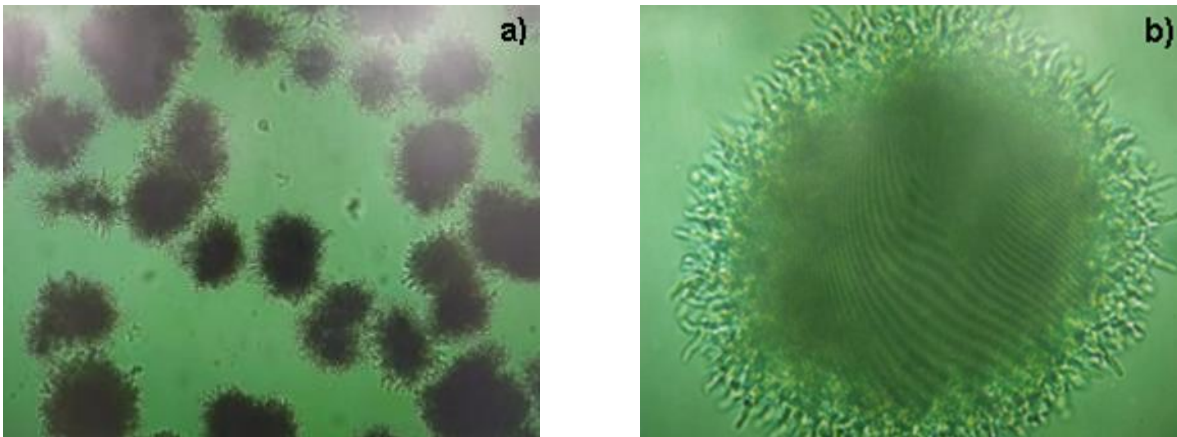


Figura 4. a) *Aspergillus Níger* de 25 horas comenzando etapa productiva parte izquierda, b) *Aspergillus Níger* de 95 horas finalizando etapa productiva parte derecha visto al microscopio electrónico LEICA ICC50 W en instalaciones de Sucroal.

- Purificación

El proceso de purificación del ácido cítrico, consiste en la limpieza de la mezcla, donde están involucrados el ácido cítrico y el *Aspergillus Níger* que son obtenidos al finalizar la fermentación (figura 4b). Para llevar a cabo este procedimiento se realiza la siguiente serie de pasos.

La mezcla que proviene de la fermentación pasa por filtros Pannevis, con el fin de que quede retenido el microorganismo muerto denominado micelio. Una vez la solución filtrada está libre de impurezas sólidas, el ácido cítrico entra en contacto con hidróxido de cal, para formar citrato di cálcico y tricálcico (DCC y TCC) que se precipita sobre la solución, este precipitado se pasa por filtros Pannevis, luego se agrega ácido sulfúrico, se libera el ácido cítrico y como subproducto se obtiene sulfato de calcio (yeso), este subproducto se retira mediante filtro Pannevis y finalmente el ácido cítrico concentrado pasa por un filtro precapa de carbón y se envía al proceso de recuperación

- Recuperación

En la sección lo que se pretende es recuperar el ácido que viene de la sección de purificación, para esto se realizan los siguientes procesos, en primer lugar, se realiza una filtración con el fin de remover las últimas impurezas que no fueron extraídas en el proceso anterior, en el siguiente paso se lleva a cabo una evaporación para aumentar la concentración de ácido cítrico en solución.

El proceso de cristalización del ácido cítrico es un proceso de ensemillamiento, en el cual se adicionan cristales micrométricos de ácido cítrico, los cuales, gracias a procesos de difusión y adherencia, comienzan a crecer, hasta formar cristales de mayor tamaño, empobreciendo la solución de ácido cítrico, este proceso se realiza al vacío, luego los cristales son enviados a la sección de secado mediante la adición de aire caliente, consecuentemente estos cristales de ácido cítrico son llevados a temperatura ambiente y pasan por mallas para clasificarlos de acuerdo a su tamaño y finalmente son transportados a la sección de empaque y quedan listos para su distribución. Se debe aclarar que el remanente de la solución de ácido cítrico se envía por ductos a la sección de recuperación y empieza de nuevo el proceso.

Con el interés de determinar con mayor precisión glucosa y fructosa residual en el proceso de fermentación se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR)

2.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR)

Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a versatilidad, alta sensibilidad, precisión, su fácil ajuste 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 (Skoog *et al.*, 2009.)

La cromatografía líquida de alto rendimiento es una técnica usada para separar componentes de una muestra que se fracciona entre una fase líquida y una fase

estacionaria (elución) 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 atravesando la fase estacionaria, el retardo se conoce como tiempo de retención que depende de la naturaleza del analito, fase estacionaria, y de la composición de la fase móvil, esta retención es única para cada analito (Lozano-Sánchez et al., 2018).

Un equipo de cromatografía líquida de alta resolución consta de un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como una computadora, integrador, o un registrador (Lozano-Sánchez *et al.*, 2018).

El sistema de bombeo CLAR envían cantidades exactas y con velocidad constante a presión la fase móvil o disolvente a través del inyector, la columna y el detector mediante una tubería construida con materiales inertes y uniones adecuadas, minimizando las fluctuaciones durante periodos prolongados de tiempo. La fase móvil para CLAR es un líquido que puede ser de un componente o una mezcla de componentes y debe presentar las características como no degradar la fase estacionaria, tener baja viscosidad, ser compatible con el detector utilizado, disolver la muestra, es decir tener una polaridad adecuada, puesto que es la que transporta hacia a la columna cromatográfica, permite la retención del analito y una buena resolución.

El flujo constante de la fase móvil por las diferentes partes del equipo se llama elución isocrática, pero si se varía el flujo de manera continua la composición de los disolventes de forma que su fuerza vaya incrementado durante el tiempo de análisis se llama elución por gradiente. Existen dos tipos de gradientes, el primero se denomina lineal, la velocidad de cambio del disolvente es lineal en el tiempo. El segundo tipo de gradiente se llama elución exponencial que puede ser convexos y cóncavos. La elución por gradiente convexa puede alcanzar rápidamente la composición final de la fase móvil, se utilizan para señales de compuestos superpuestos al final del cromatograma y la elución por gradiente cóncava alcanza muy lentamente la composición final de la fase móvil y se usa para picos superpuestos al inicio del cromatograma.

Los detectores para cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la solución son sensibles a una propiedad de la fase móvil, como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, la cual es modulada por la presencia de solutos. En cambio, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades de este último, como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente de difusión, que no son inherentes a la fase móvil. El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar información cuantitativa y cualitativa de los mismos, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, amplio margen de respuesta lineal. Para la estandarización de glucosa y fructosa se usó el detector de índice de refracción (RI) el cual mide los cambios que se producen en las propiedades intensivas del eluyente y los solutos que se están analizando, aprovechando la improbabilidad de que los eluyentes y los solutos compartan un índice de refracción idéntico. La ventaja de los detectores de índice de refracción (RI) es que responden a casi todos los solutos, son confiables y no dependen de la tasa de flujo. Sin embargo, son muy sensibles a los cambios de temperatura y tienen que estar a

temperatura constante hasta unas pocas milésimas de grado centígrado. Por otra parte, no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores y son incompatibles con los métodos de elución con gradiente y la presión del eluyente puede producir inestabilidad en la línea base (Skoog et al., 2009.).

De acuerdo con el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria la cromatografía de alto rendimiento se puede clasificar en los siguientes tipos, fase normal, exclusión molecular por tamaño, afinidad, quiral, adsorción, intercambio iónico, fase reversa, exclusión iónica, esta última es empleada para la separación de glucosa y fructosa en este trabajo.

La cromatografía de exclusión iónica (IEC), esta técnica se aplica principalmente a la separación de ácidos débiles, particularmente ácidos carboxílicos, aniones de ácidos débiles inorgánicos, bases orgánicas débiles iones de bajo peso molecular pero también se ha aplicado a la separación de carbohidratos, fenoles, aminoácidos, agua de mar y aguas residuales (Robards et al., 2004). La fase estacionaria de este tipo de cromatografía es un intercambiador de iones de alta capacidad con el mismo tipo de grupo iónico inmovilizado que los iones de la muestra. Los iones permanecen con la misma carga que la fase estacionaria son repelidos, mientras que los solutos neutros y parcialmente ionizados son retenidos y separados por partición entre la fase estacionaria porosa y la corriente de la fase móvil.

La columna Aminex HPX 78H es un tipo de columna de exclusión iónica, que acoplada al detector de índice de refracción (RI) es usada para determinar una gran variedad de carbohidratos, entre los cuales están glucosa y fructosa. En la literatura se encontraron reportados diferentes estudios, donde implementaron este tipo de columna. Producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión con vapor, en el cual se determinó el contenido de glucosa usando las siguientes condiciones de operación: temperatura de la columna 65 °C, ácido sulfúrico 0,5 mM como fase móvil, a un flujo isocrático de 0,6 ml/minl (Piñeros-Castro et al., n.d, 2011.). Determinación de glucosa y fructosa en el desarrollo y validación de un método por cromatografía líquida para cuantificar sacarosa, glucosa y fructosa en tubérculos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja variando las condiciones de temperatura de la columna en un rango de 18-35 °C y concentración de fase móvil ácido sulfúrico entre 5 a 12 mM (Duarte-Delgado et al., 2015) y determinación de glucosa y fructosa en compuestos fermentables para la producción de bioetanol bajo las siguientes condiciones, temperatura de columna 50°C, fase móvil de ácido sulfúrico 0,5 mM (Tapia Julio César et al., 2020.).

Entre los métodos utilizados para cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución está el método del patrón interno que permite que varíen las condiciones de operación entre muestra y muestra y no requiere de repetibilidad en las inyecciones. El patrón interno debe ser un compuesto que pueda resolverse completamente de los picos adyacentes, que no esté presente en la muestra problema y que no produzca ningún efecto interferente.

Por otro lado, para determinar la pureza (acidez) de ácido cítrico en producto terminado se emplea la valoración volumétrica, este tipo de análisis químico cuantitativo es muy usado en la rutina de los análisis de ensayo en las industrias debido a que son procedimientos sencillos, rápidos y versátiles. Aprovechando de las propiedades del ácido cítrico se usó una titulación ácido- base, determinando la concentración desconocida de ácido a partir de una solución con concentración conocida. Para llevar a cabo este análisis se utilizó un

titulador automático TITRONIC®300 (anexo1.4), puesto que es una bureta digital y disminuye el error sistemático frente a una bureta convencional.

2.3 Validación de un método analítico

La validación de un método analítico es el proceso por el cual, a partir de estudios de laboratorio, se aportan evidencias objetivas de las características de desempeño del método que cumplan con los parámetros estadístico requeridos, demostrando así, que el método es apropiado para la aplicación analítica deseada y que los resultados mediante este son confiables, den un valor agregado y demuestren una competencia de acreditación. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación, por lo que los laboratorios deben demostrar que las características de desempeño son adecuadas para el uso previsto tal como lo especifica la Norma Técnica Colombiana (NTC-Iso-17025-20050-1, 2017.)

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de la aplicación dados. (NTC-ISO/IEC 17025)

Un método de ensayo debe ser validado cuando es indispensable demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. (NTC-ISO/IEC 17025)

- métodos no normalizados
- métodos diseñados/developados por el laboratorio
- métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación
- ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados
- Se incorpora un nuevo equipo o hay un cambio de equipo
- Se presentan cambios en las especificaciones del producto
- Se da cumplimiento a un plan de validación
- Se modifica el método para ampliarlo o mejorarlo
- Se debe demostrar la correspondencia entre dos métodos
- Se presentan cambios en compendias

2.3.1 Límite de detección (LD)

El límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del blanco o ruido (Miller y Jane C. Miller, 2002), esta cantidad baja puede ser identificada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

2.3.2 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que pueda determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas, el límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra. En el caso de los métodos instrumentales que exhiben ruido

de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.)

2.3.3 Intervalo de trabajo y rango lineal

Es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo definido, para obtener respuestas directamente proporcionales a la concentración del analito. Para determinar hasta qué punto un método analítico sigue siendo lineal, a menudo se analizan soluciones estándar de concentración progresivamente mayores hasta encontrar un punto en el cual se pierde este comportamiento, este rango corresponde al intervalo de trabajo. La linealidad debe establecerse por medio de un método estadístico apropiado como el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.).

2.3.4 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas de una misma muestra homogénea. La propagación de resultados usualmente es expresada en términos de coeficiente de variación (RSD), desviación estándar (s) o varianza (s^2). La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas un mismo analista, mismos aparatos y reactivos en un mismo laboratorio y en un tiempo corto (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.).

Precisión intermedia. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes, diferentes analistas, aparatos, días y en un mismo laboratorio (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.).

Reproducibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.).

2.3.5 Exactitud

Expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia verdadero expresado en error o porcentaje de error. La validación de un método busca cuantificar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar métodos analíticos para ácido cítrico en proceso y producto terminado con el fin de asegurar y garantizar su calidad

3.2 Objetivos específicos

- Definir las condiciones de operación de la CLAR en la determinación de glucosa y fructosa en el proceso de fermentación para la obtención de ácido cítrico.
- Establecer las condiciones para determinar pureza de ácido cítrico por volumetría descritos en el protocolo de validaciones interno (QC-MET-04 versión 04) del laboratorio
- Elaborar e implementar tablas de control para el método validado realizado en modalidad pasantía.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales, equipos y reactivos

En las tablas 1, 2, 3 se muestran los listados de materiales, reactivos y equipos utilizados con sus especificaciones

Tabla 1. Material usado en los procedimientos de estandarización y validación.

Marca	Denominación (mL)	Cantidad	Límite de error	Marca
	100,00	3,00	±0,8	
Balón aforado	50,00	5,00	±0,06	BLAUBRAND
	10,00	10,00	±0,04	
Matraz de Erlenmeyer	125,00	15,00	N.A.	SCHOTT
Vaso de precipitado	50,00	3,00	N.A.	SCHOTT
Espátula	N.A.	1,00	N.A.	N.A.
Frasco lavador	500,00	1,00	N.A.	N.A.
Filtro tipo jeringa	0,20	200,00	N.A.	WHATMAN
Viales	1,00	40,00	N.A.	WATERS
Filtro de membrana acetato de celulosa	30,00	20,00	N.A.	FISCHER SCIENTIFIC
Jeringas desechables	5,00	20,00	N.A.	N.A.

N.A.: No aplica por no ser material volumétrico.

El material de vidrio se lavó con extran al 2% v/v y ácido nítrico (HNO₃) al 1% v/v, dejando en cada solución durante 2 horas, y posteriormente el último enjuague se realizó con agua desionizada, el material volumétrico fue verificado de acuerdo al numeral 4.2.

Tabla 2. Equipos utilizados en el procedimiento de estandarización de glucosa y fructosa por CLAR y equipos usados para la validación de producto terminado de ácido cítrico.

Equipos	Especificaciones
Micropipeta 100-1000 µL	BRAND
Balanza analítica	METTLER TOLEDO
Cromatógrafo líquido	WATERS
Detector	WATERS
Titulador de pistón TITRONIC 300	SI ANALYTICS

Los equipos y accesorios de la tabla 2 fueron calibrados y verificados por técnicos externos encargados de certificar la calibración, estos datos se muestran en el Anexo 1.

Tabla 3. Reactivos usados en el procedimiento para la estandarización de glucosa y fructosa por CLAR y para la validación en la determinación de pureza por titulación.

Reactivo	Pureza	Marca	CAS
Glucosa	99,50 % m/m	MERCK	50-99-7
Fructosa	99,00% m/m	MERCK	57-48-7
Ácido cítrico	USP	SUCROAL	5949-29-1
ftalato ácido de potasio	Ph EUR	MERCK	4409-98-7
Hidróxido de sodio	Ph EUR	SCHARLAU	1310-73-2
Fenolftaleína	Ph EUR	MERCK	77-09-8
Etanol	USP	SUCROAL	200-578-6
Ácido sulfúrico (solvente)	95,0-97,0 % m/m	MERCK	7664-93-9
Agua	Desionizada	N.A.	N.A.

N.A.: No aplica

Los certificados de análisis se muestran en el Anexo 2.

4.2 Verificación del material volumétrico

Se llevó a cabo la verificación de 13 matraces aforados de 10 mL, 6 matraces aforados de 50 mL y 3 matraces aforados de 100 mL según la metodología descrita en el protocolo de la casa comercial que fabrica la instrumentación BLAUBRAND (BLAUBRAND, 2015). Los matraces volumétricos aforados fueron clasificados como aparatos volumétricos ajustados por contenido 'In', elaborados de vidrio borosilicato 3.3 (Boro 3.3), sus límites de error admisible pueden ser revisados en la tabla 2. Según el protocolo BLAUBRAND para la calibración de material de vidrio, este tipo de materiales pueden ser verificados con un solo control, sin embargo, para obtener más confiabilidad, se recomienda utilizar el valor medio que resulta de 3 valores medidos. Al hacerlo, la dispersión de los valores individuales no debe ser mayor del límite de error admisible del aparato de medida. El control gravimétrico de aparatos volumétricos está descrito en la norma DIN EN ISO 4787 donde también está indicada la fórmula general de cálculo que se muestra en la ecuación 1

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \left(\frac{1}{\rho_w - \rho_L} \right) \left(1 - \frac{\rho_L}{\rho_G} \right) (1 - \gamma(t - 20^\circ C)) \quad (Ec.1)$$

Donde:

- V_{20} [mL]: volumen del aparato de medida a 20 °C.
- $W_2 - W_1$: Valor obtenido de la pesada del aparato de medida lleno menos el valor obtenido de la pesada del aparato de medida vacío.
- (ρ_G) : peso de ajuste de la balanza
- (ρ_L) : Densidad atmosférica en función de la presión de aire, de la temperatura y de una humedad relativa del aire del 40-90 %.
- (ρ_w) : Densidad del agua en función de la temperatura
- (γ) : Coeficiente de expansión del aparato volumétrico

Tomando en cuenta la aplicación muy complicada de esta fórmula y el gran número de tablas necesarias, el cálculo ha sido simplificado para la introducción de un factor “Z” que se muestra en la ecuación 2. El valor Z es un coeficiente tabulado que se encuentra en el protocolo de BLAUBRAND.

$$V_{20} = Z(W_2 - W_1) \text{ (Ec. 2)}$$

Donde:

Z [mL/g]: Factor de los parámetros de control resumidos.

Los valores de Z pueden ser interpolados mediante una recta, donde “y” representa al factor Z y “x” es el valor de temperatura (BLAUBRAND, 2015).

4.3 Preparación de soluciones patrón para estandarización de método por CLAR

Se prepararon soluciones madre de glucosa, fructosa y arabinosa pesando los valores que se muestran en la tabla 4 y aforando a 100 mL con agua desionizada.

Tabla 4. Preparación de soluciones de trabajo inicial.

Analito	Peso(g)	V(mL)
Glucosa	5,00	100
Fructosa	5,00	100
Arabinosa (patrón interno)	5,00	100

4.4 Estandarización de método para la determinación de glucosa y fructosa en el proceso de fermentación para la obtención de ácido cítrico.

4.4.1 Evaluación de condiciones cromatográficas

Para estandarizar el método en la determinación de glucosa y fructosa fue necesario evaluar ciertas condiciones cromatográficas como, reconocimiento de señales, determinación de tiempo de análisis, flujo, concentración de fase móvil, volumen de inyección y elección de estándar interno.

4.4.1.1 Reconocimiento de señales cromatográficas

Con el fin de conocer el tiempo de retención de los analitos de interés e identificar cuál de ellos eluye primero, se preparó por separado glucosa y fructosa al 0,3 % m/v y se inyectaron bajo las condiciones cromatográficas en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones iniciales del método cromatográfico.

Componentes	Condiciones
Solvente	2,5 mM H ₂ SO ₄
Precolumna	Aminex HPX-87H
Columna	Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm
Temperatura de columna	60,0 °C
Temperatura de detector	55,0 °C
Temperatura de inyector	22,0 °C
Flujo	0,6 mL/min
Volumen de inyección	10,0 µL

4.4.1.2 Selección del estándar interno

La selección del patrón interno se basó en los siguientes criterios, en primer lugar, que no tenga el mismo tiempo de retención de los analitos de interés como se observa en la tabla 6 (Bio-rad, 2012), pero que tenga propiedades similares para que se puede analizar en este tipo de columna y, por otro lado, que arabinosa no haga parte del proceso, específicamente en el ciclo de Krebs del microorganismo *Aspergillus Níger* encargado de producir ácido cítrico.

Tabla 6. Tiempos de retención de azúcares y alditoles usando la columna Aminex HPX-87H, fase móvil H₂SO₄ 0,005 M, flujo 0,6 mL/min y de temperatura 65 °C

Carbohidratos	Tiempo de retención (tr)utilizando la columna HPX-87H
Estaquiosa	6,94
Melezitosa	7,79
Rafinosa	7,65
Maltotriosa	7,18
Celobiosa	7,80
Sacarosa	Invierte
Trehalosa	8,03
Maltosa	7,89
Melibiosa	7,89
Lactosa	8,13
Glucosa	10,16
Xilosa	10,39
Sorbosa	9,92
Galactosa	10,49
Manosa	10,02
Ramnosa	11,20
Fructosa	10,39
Arabinosa	11,34
Fucosa	12,05
Digitoxosa	13,23
Ribosa	9,21

4.4.1.3 Determinación del tiempo de análisis

Para conocer el tiempo necesario para que no haya interferencia entre una corrida y otra en el sistema se inyectó 0,3 %m/v del componente glucosa-fructosa con 0,1% m/v de arabinosa como patrón interno bajo las condiciones cromatográficas de la tabla 5, pero cambiando el flujo a 0,6 mL/min durante 60 minutos.

4.4.2 Optimización de resolución

4.4.2.1 Variación de la concentración de la fase móvil y flujo

Para obtener señales cromatográficas de los analitos con buena resolución se variaron las condiciones de fase móvil y flujo, donde se realizaron diferentes concentraciones de fase móvil de ácido sulfúrico con dos flujos diferentes, quedando de la siguiente manera como se muestra en la tabla 7. Para la concentración de la fase móvil se trabajaron 2,5; 3,5; 4,5 mMol/ mL y para el flujo se trabajó un mínimo nivel 0,5 mL/min y máximo nivel 0,6 mL/min. Estos ensayos se realizaron bajo las siguientes condiciones: se inyectaron de la solución multicomponente 20 microlitros con 0,25 % m/v glucosa, fructosa con patrón interno de 0,1 %m/v de arabinosa (tabla 8), temperatura de inyector de 22 °C en la columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm a 60 °C y el detector RI a temperatura de 55 °C según las condiciones experimentales y además cada ensayo se realizó por triplicado. La variable de respuesta analizada fue la resolución de las señales cromatográficas.

Tabla 7. Ensayo para analizar variables de concentración de fase móvil y flujo.

Factor	Unidad	Bajo	Alto
Concentración de la fase móvil	mMol/mL	2,50	4,50
Flujo	mL/min	5,00	6,00

Tabla 8. Ensayos experimentales de las diferentes concentraciones de fase móvil y los diferentes flujos.

Flujo (mL/min)	Concentración de la fase móvil		
	2,5 mMol/mL	3,5 mMol/mL	4,5 mMol/mL
0,5	1	1	1
	2	2	2
	3	3	3
0,6	1	1	1
	2	2	2
	3	3	3

4.4.2.2 Volumen de inyección

Para encontrar la cantidad representativa y que además tenga buena respuesta en la resolución para cada analito de interés en la estandarización, en el sistema se inyectaron 10 y 20 microlitros del componente glucosa- fructosa 0,3 %m/v, con patrón interno 0,1 %m/v de arabinosa, bajo las siguientes condiciones cromatográficas, flujo de 0,5 mL/min, fase móvil 3,5 mMol/mL H₂SO₄, temperatura de columna 60 °C, temperatura del inyector 22 °C, temperatura de detector 55 °C y de manera aleatoria y por triplicado como se consigna en la tabla 9.

Tabla 9. Ensayos experimentales del volumen de inyección de estándares de glucosa y fructosa en CLAR

Analito	Volumen	
	10µL	20µL
Glucosa-Fructosa	1	1
	2	2
	3	3

Realizaron tres ensayos por triplicado para los dos volúmenes tabla 9, con el fin de evaluar la resolución.

4.4.3. Determinación de los parámetros de estandarización

4.4.3.1 Límites de detección y cuantificación

Para el límite de detección se evaluaron concentraciones progresivamente desde 0,0005 hasta 0,0070 %m/v a partir de una solución multicomponente de glucosa y fructosa, midiendo en cada caso el valor de la relación señal ruido (S/N) mediante el uso del software BREZEE que controla el cromatógrafo líquido, las concentraciones evaluadas fueron 0,0005; 0,0010; 0,0015; 0,0020; 0,0030; 0,0050; 0,0060; 0,0070 %m/v, se adicionó en cada una de las soluciones patrón interno 0.00010 %m/v de arabinosa, obteniendo de esta manera un triplicado en cada punto. Después de encontrar que el cociente de la relación señal ruido(S/N) sea superior a tres, se procedió a inyectar 10 veces por triplicado las soluciones de componente glucosa-fructosa 0,0060 %m/v.

En el caso del límite de cuantificación se inyectaron 10 soluciones por triplicado del multicomponente glucosa-fructosa de concentración 0,06%m/v con patrón interno de 0,00010 %m/v. Se debe tener en cuenta que los límites de detección y cuantificación se evaluaron bajo las condiciones reportadas en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de estandarización en la determinación de glucosa y fructosa mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Componentes	Condiciones
Solvente	3,5 mM H ₂ SO ₄
Precolumna	Aminex HPX-87H
Columna	Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm
Temperatura de columna	60 °C
Temperatura de detector	55 °C
Temperatura de inyector	22 °C
Flujo	0,5 mL/min
Volumen de inyección	20 µL

4.4.3.2 Linealidad y rango dinámico.

Con el fin de evaluar el rango dinámico del método en la cuantificación de glucosa y fructosa por CLAR, se preparó un conjunto de soluciones multicomponentes incluido el patrón interno 0,1 % m/v y se llevó a 10 mL de solución final a partir de soluciones estándar (tabla 4), estas concentraciones aumentaron progresivamente hasta obtener 10 niveles de concentración (tabla 11) y en cada una de ellas se calculó el coeficiente de determinación lineal (R^2) y comportamiento residual. Para la elaboración del rango lineal se tuvieron en cuenta los datos anteriores, obteniendo de esta manera 7 niveles de concentración equiespaciados entre cada punto de la curva de concentración de la solución multicomponente glucosa, fructosa y patrón interno.

Tabla 11. Concentración de glucosa y fructosa con su respectivo patrón interno de las soluciones multicomponentes de cada punto de las curvas

Patrón	Concentración % m/v		
	Glucosa	Fructosa	Arabinosa
1	0,06	0,06	0,1
2	0,09	0,09	0,1
3	0,12	0,12	0,1
4	0,15	0,15	0,1
5	0,18	0,18	0,1
6	0,21	0,21	0,1
7	0,24	0,24	0,1
8	0,27	0,27	0,1
9	0,30	0,30	0,1
10	0,33	0,33	0,1

De las anteriores curvas se consideró que con un coeficiente de determinación mayor a 0,998 fue el que se ajustó adecuadamente a una relación lineal entre concentración y área obtenida para cada uno de los analitos de glucosa y fructosa

4.4.3.3 Precisión

En la determinación de la precisión se prepararon diez soluciones por tres días diferentes, cada análisis se realizó por triplicado, cada solución multicomponente se preparó a partir

de las soluciones madres reportadas en la tabla 4 Para realizar estos análisis se tuvo en cuenta el punto central del rango lineal de la estandarización del método, el cual es 0,15 % m/v de glucosa y fructosa con patrón interno de arabinosa al 0,1 % m/v, estas soluciones fueron inyectadas teniendo en cuenta las condiciones reportadas en la tabla 10. Los resultados se obtuvieron mediante del software BREZEE.

Los niveles de precisión determinados fueron clasificados en repetibilidad y precisión intermedia, cada parámetro se evaluó mediante la estadística correspondiente, haciendo uso del software Minitab.

4.4.3.4 Exactitud

Para estimar la exactitud del método estandarizado, se evaluaron diez soluciones multicomponentes de glucosa y fructosa de concentración 0,15 % m/v con 0,1 % m/v de patrón interno y con las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 10. Se debe aclarar que estas soluciones se inyectaron una vez, los resultados se obtuvieron mediante el software BREZEE y la estadística se procesó mediante el software Minitab.

4.5 Validación de método por volumetría para la determinación de pureza en producto terminado de ácido cítrico.

4.5.1. Características de desempeño para la validación

Para desarrollar las características de desempeño en la validación de producto terminado de ácido cítrico se tuvo en cuenta lo siguiente: se preparó hidróxido de sodio al 1% Eq/L, luego se estandarizó con patrón primario ftalato ácido de potasio y con esta solución se realizaron los ensayos que se describen a continuación

4.5.1.1 Precisión expresada en repetibilidad y precisión intermedia

La precisión en un método se calcula con el fin de verificar cuán cerca o lejos (dispersión) están los datos de una medición en las mismas condiciones y se realizaron los siguientes ensayos.

- Repetibilidad

En la determinación de repetibilidad para la característica de pureza en ácido cítrico, se seleccionaron diferentes lotes incluido el material de referencia y fueron analizados por un mismo analista, en el mismo equipo, los resultados se analizaron mediante Minitab versión 18

- Precisión intermedia

Para realizar la precisión intermedia se realizó el mismo procedimiento, pero con diferentes analistas y en diferentes días, usando el mismo equipo, lo datos fueron analizados mediante Minitab versión 18

4.5.1.2 Exactitud expresada en forma de recuperación

Para estimar la exactitud del método de pureza para el producto terminado de ácido cítrico se evaluó mediante recuperación. Para esta característica de desempeño se evaluó en dos niveles de concentración de ácido cítrico a 90 y 110 %, para dos lotes durante tres días

4.5.1.3 Linealidad

Para determinar este parámetro se prepararon diferentes niveles de concentración para el ácido cítrico producto terminado (80; 90;100;110;120 % m/v) y el cálculo se realizó versus el valor obtenido experimentalmente.

4.5.1.4 Tabla de control

Con la tabla de control se puede diagnosticar y hacer un seguimiento al contenido de pureza en el ácido cítrico y se elaboró con dos desviaciones estándar frente al datos teóricos.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Calibración del material de vidrio

La tabla 12 muestra los resultados de la calibración de balones aforados de diferente denominación

Tabla 12. Resultados de la verificación de algunos balones aforados.

#	Peso inicial (g)	Peso final (g)	T (°C)	Tolerancia teórica	Factor Z	Valor encontrado	Valor teórico	Tolerancia encontrada
	12,703	22,6964	22,1	±0,04	1,003258	10,036	10	0,0257
1	12,704	22,6965	22,1	±0,04	1,003258	10,026	10	0,0255
	12,704	22,6964	22,1	±0,04	1,003258	10,025	10	0,0253
	12,634	22,5818	21,5	±0,04	1,00313	9,979	10	-0,0209
2	12,634	22,5819	21,5	±0,04	1,00313	9,979	10	-0,0206
	12,634	22,5817	21,5	±0,04	1,00313	9,979	10	-0,0209
	12,662	22,6686	21,4	±0,04	1,003138	10,038	10	0,0381
3	12,662	22,6687	21,4	±0,04	1,003138	10,038	10	0,0382
	12,662	22,6686	21,4	±0,04	1,003138	10,038	10	0,0380
	12,697	22,6844	21,6	±0,04	1,003174	10,019	10	0,0188
4	12,697	22,6845	21,6	±0,04	1,003174	10,019	10	0,0192
	12,697	22,6845	21,6	±0,04	1,003174	10,019	10	0,0189
	12,642	22,627	21,5	±0,04	1,00313	10,016	10	0,0156
5	12,642	22,6269	21,5	±0,04	1,00313	10,016	10	0,01575148
	12,643	22,6269	21,5	±0,04	1,00313	10,015	10	0,01545055

Se observa en la tabla 12 que los datos de tolerancia de los balones verificados están por debajo del valor de tolerancia teórico registrado en el recipiente o en el certificado.

5.2 Estandarización de un método para la determinación de glucosa y fructosa en el proceso de fermentación de ácido cítrico.

5.2.1 Evaluación de las condiciones cromatográficas.

Estas condiciones fueron evaluadas de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de los analitos glucosa y fructosa, también teniendo en cuenta las características de instrumentación y los tiempos de retención de los azúcares como se reporta en la tabla 6 (Bio-Rad, 2012.), la fase móvil usada, y el detector índice de refracción. Otro factor importante por el cual se trabajó con la columna Aminex HPX-87H fue debido a que es utilizada para otros análisis rutinarios que se realizan 24 horas, siete días a la semana y el cambio de columna y el acondicionamiento genera un gasto de tiempo.

5.2.1.1 Reconocimiento de señales cromatográficas

La respuesta de la elución de un analito en CLAR mediante un detector y obtenido mediante un software se llama cromatograma el cual contiene señales cromatográficas. Esta señal tiene un área y un tiempo de retención que se expresa en minutos, este tiempo es la permanencia del analito dentro de la columna y se mide desde que se da inicio la corrida

Al observar la figura 5 la glucosa tiene un tiempo de retención de 9,500 minutos lo cual quiere decir que es más polar al ser comparado con la fructosa figura 6 que sale con un tiempo de retención 10,367 minutos. Tanto la glucosa como la fructosa poseen el mismo número de carbonos, hidrógenos y oxígenos, la diferencia de estos dos analitos en el tiempo de retención se debe al grupo carbonilo de la cetona que tiene la fructosa que está unido a dos grupos orgánicos disminuyendo la polaridad (disminuye la reactividad), mientras que el carbonilo del aldehído está unido a un carbono y a un hidrogeno.

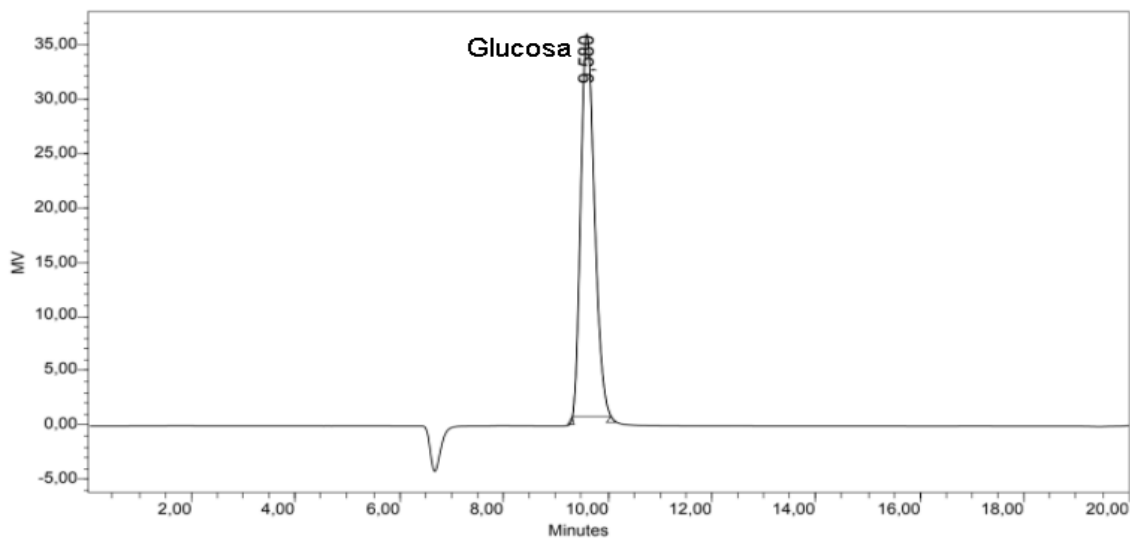


Figura 5. Cromatograma de estándar glucosa en CLAR-IR

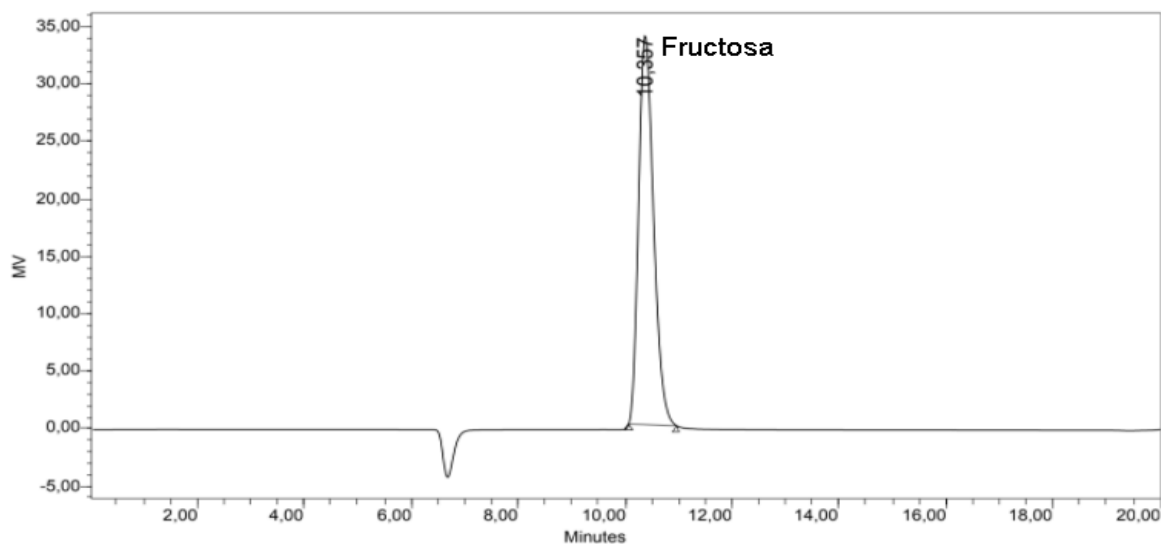


Figura 6. Cromatograma de estándar de fructosa en CLAR-IR

La columna Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm tiene un tamaño de partícula de 8 μm , está compuesta de una resina empaquetada con una matriz a base estireno (figura 7.a) divinilbenceno (figura 7.b) lo cual forman un polímero de estireno-divinilbenceno (figura 7.c), luego es sulfonada bajo ciertas condiciones de reacción con ion fijo H^+ (figura 9.d). La separación de la glucosa y la fructosa se da debido a que estas moléculas ingresan en la matriz reticulada y los oxígenos de los hidroxilos de la glucosa y fructosa con los iones fijos de la columna forman una interacción electrostática.

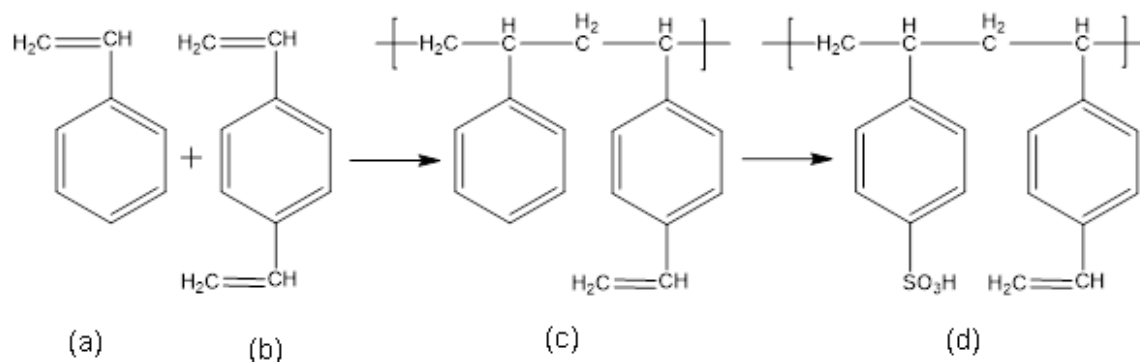


Figura 7. a) Estructura molecular del estireno b) divinilbenceno, (c) polímero de estireno-divinilbenceno, (d) polímero sulfonado con ion fijo H^+

5.2.1.2 Elección de estándar interno

Se eligió la arabinosa como patrón interno porque es un carbohidrato y se puede analizar igual que con analitos de interés mediante la columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm y el detector índice de refracción (RI), por otro lado, tiene un tiempo de retención que no interfiere con el tiempo de retención de la glucosa y fructosa y que este tiempo no está muy alejado de estos analitos como se observa en la tabla 12. Además, la arabinosa no hace parte del alimento de *Aspergillus Níger* ni interfiere en la producción de ácido cítrico específicamente en el ciclo de Krebs

Al analizar la arabinosa bajo las condiciones de la tabla 5, se obtuvo la señal cromatográfica con un tiempo de retención de 11,161 minutos como se observa en la figura 8 y se puede afirmar que este analito es idóneo como patrón interno en la estandarización.

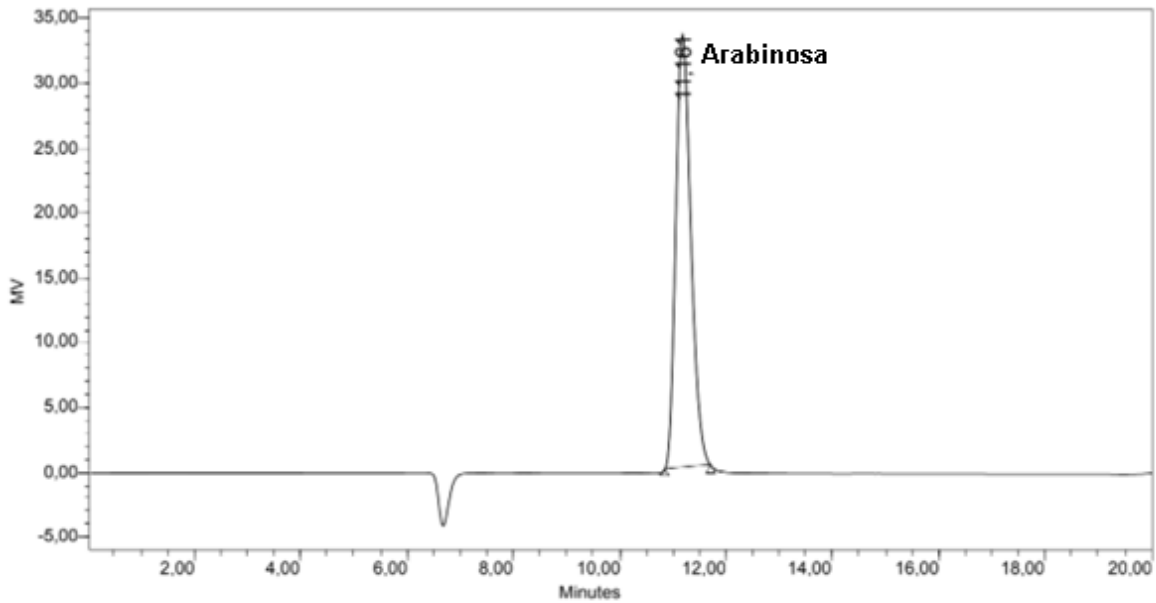


Figura 8. . Cromatograma de estándar de arabinosa en CLAR-IR

5.2.1.3 Determinación del tiempo de análisis

Se realizó una corrida de 60 minutos de la mezcla de glucosa, fructosa y arabinosa con el fin de determinar el tiempo de análisis, como se observa en la figura 9 el tiempo de análisis se puede acortar a 20 minutos, puesto que los analitos de interés salen en el cromatograma antes del minuto 16.

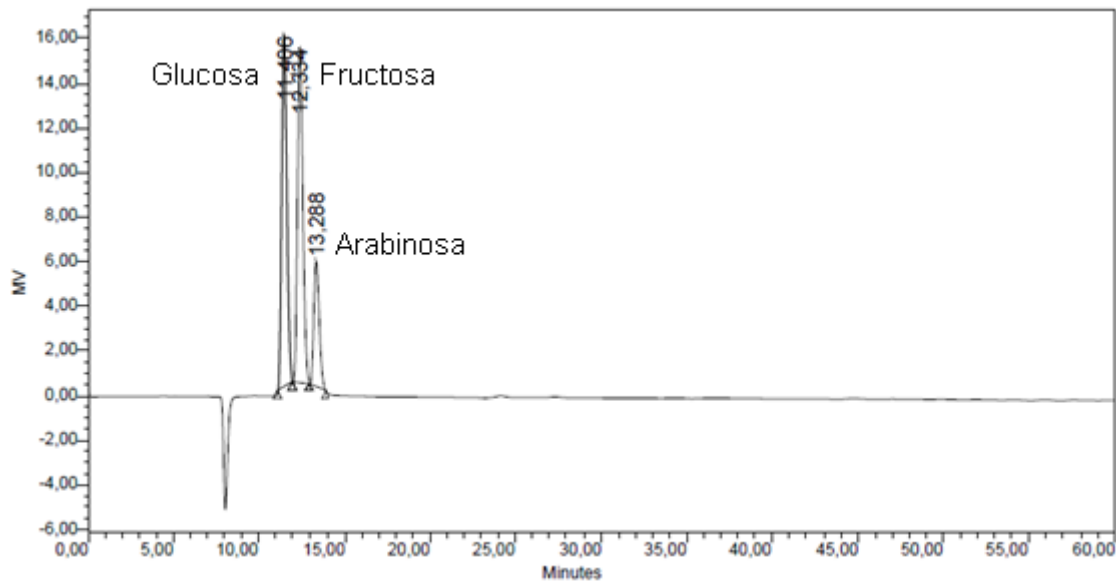


Figura 9. CLAR-IR de los estándares de glucosa, fructosa y patrón interno arabinosa a 60 minutos.

5.2.2 Optimización de la resolución

5.2.2.1 Variación de la concentración de la fase móvil y flujo en CLAR

La resolución de la cromatografía es un parámetro que nos permite evaluar si dos o más analitos fueron separados correctamente. La resolución se calcula a partir de los datos del cromatograma para dos señales consecutivas (ver ecuación 3). Una buena resolución en cromatografía debe ser igual o mayor a 1,5. (Valcárcel, M. y Gómez, A. 1988)

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_2 + w_1} \text{ (Ecu. 3)}$$

Donde,

R: Resolución

t_{R2} : tiempo de retención de la señal cromatográfica 2

t_{R1} : tiempo de retención de la señal cromatográfica 1

w_2 : Ancho de la señal cromatográfica 2

w_1 : Ancho de la señal cromatográfica 1

Los ensayos experimentales permitieron evaluar la respuesta de resolución de las señales cromatográficas de los analitos de interés glucosa y fructosa, medidos en función de la suma de las resoluciones individuales de cada una de las señales. Las variables estudiadas fueron la concentración de la fase móvil y el flujo.

Los resultados en graficas de estos experimentos fueron obtenidos por el software estadístico Minitab versión 18,0. En la figura 10 al comparar las diferentes concentraciones de la fase móvil para los dos flujos se puede observar que la mejor respuesta de resolución es con un flujo de 0,5 mL/min. Al comprar las diferentes concentraciones de la fase móvil para el flujo de 0,5 mL/min se puede afirmar que se obtiene una máxima resolución con la concentración de fase móvil de 3,5 mMol/mL de ácido sulfúrico. Por otro lado, para el flujo de 0,6 ml/min se obtiene una resolución similar para las concentraciones de 2,5 y 3,5 mMol/mL, mientras que para la concentración de 4,5 mMol/mL hay una disminución en la resolución.

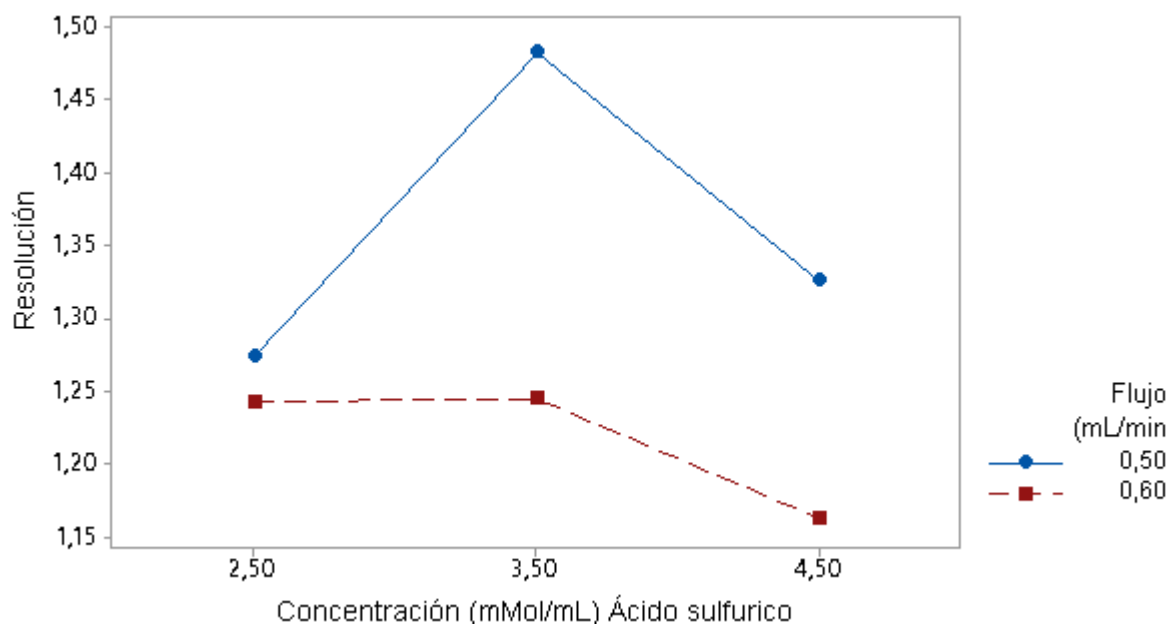


Figura 10. Resolución obtenida de la Interacción de las diferentes concentraciones de la fase móvil y los flujos.

En la figura 11 se observa la interacción del flujo y la concentración de la fase móvil, para el flujo 0,5 mL/min en las diferentes concentraciones de ácido sulfúrico no hay interacción, mientras que para el flujo de 0,6 mL/min hay interacción para las concentraciones de 2,5 y 3,5 mMol/mL debido a que se obtiene la misma resolución. Se debe destacar que con 0,5mL/min/ se obtiene una mejor resolución.

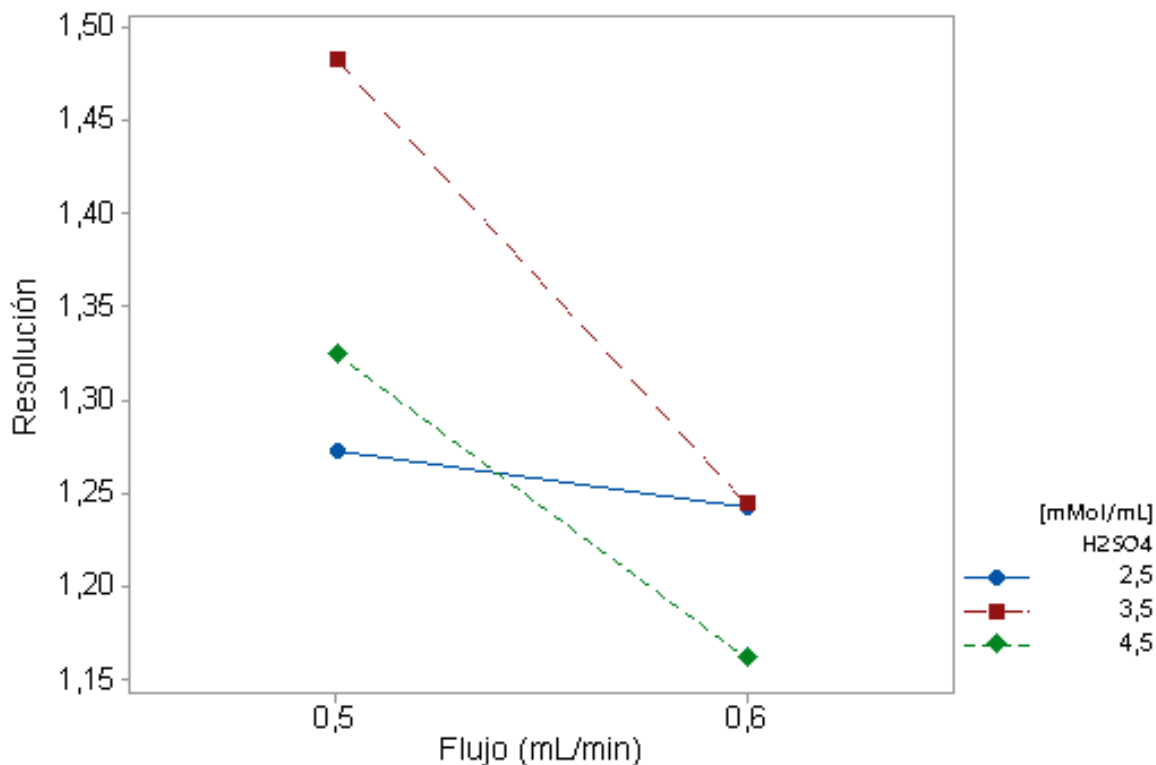


Figura 11. Resolución obtenida de la interacción de los flujos con respecto a las diferentes concentraciones de la fase móvil.

5.2.2.2 Volumen de inyección

Tabla 13. Variables estadísticas de los ensayos de resolución de 10 y 20 microlitros.

Variable estadística	10 microlitros	20 microlitros
Promedio	1,152635	1,21255
Varianza	0,00029811	0,00017293
P(T<=t) dos colas	6,92E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10092204	

La hipótesis nula establece que no hay diferencias significativas en el promedio de la resolución para 10 microlitros y en el promedio de la resolución para 20 microlitros ($P < 0,05$) y la hipótesis alterna establece que si hay diferencias significativas en promedio de las resoluciones para 10 y 20 microlitros ($P > 0,05$). Al analizar los datos de la tabla 13 se rechaza la hipótesis nula, puesto que P tiene un valor de 6,92E-08 y se concluye que hay diferencia en los volúmenes de inyección debido a que el promedio difiere en el nivel de significancia de 0,05.

5.2.3 Determinación de los parámetros de estandarización

5.2.3.1 Límites de detección y cuantificación

Para el límite de detección la concentración 0,006 %m/v de los analitos glucosa y fructosa fue 3 veces mayor que la señal que arrojó el ruido, como se menciona en apartado 4.4.3.1

esta concentración fue inyectada en el sistema 10 veces por triplicado, a los datos obtenidos de estas concentraciones se les realizó estadística descriptiva con el fin de analizar su distribución como se muestra en la tabla 14. Al analizar el coeficiente de asimetría se puede decir que el comportamiento de los datos de los límites de detección de la glucosa y fructosa presenta valores ligeramente negativos con respecto a la media, por otro lado, como la curtosis determina el grado de concentración que presenta los valores de una variable alrededor de la zona central, es decir, si la curva o distribución es escarpada o achatada, según los datos obtenidos en la tabla 14 la curtosis para los analitos de glucosa y fructosa presenta valores ligeramente negativos (platicúrtica), por lo que las distribuciones de las curvas de glucosa y fructosa son ligeramente achatadas y respecto al coeficiente de variación para la glucosa y la fructosa es menor del 2% observadas en la tabla 14, lo que nos da una idea que hay poca dispersión de los valores obtenidos entre sí.

Tabla 14. Variables estadísticas de límite de detección de los analitos de glucosa y fructosa

Variables	LD(Glucosa)	LD(Fructosa)
Promedio (respuesta detector)	538, 1930	483,0385
Desviación estándar	2,4498	2,4409
%RSD	0,4552	0,5053
Coeficiente de asimetría	-0,2939	-0,0304
Curtosis	-0,4953	-0,4835
Mediana	538,5	482,5

La concentración del límite de cuantificación de los analitos de glucosa y fructosa fue 0,06 % m/v y se realizaron diez veces por triplicado en sistema. Los datos obtenidos de las inyecciones se analizaron mediante estadística descriptiva y prueba de normalidad Ryan Joiner.

Los valores de RSD para la glucosa y fructosa fueron menores al 2 % como se indica en la tabla 15. El valor de coeficiente de asimetría para la glucosa es ligeramente positivo, lo que indica que los datos están a la derecha con respecto a la media de estos valores, caso contrario pasa con el valor de coeficiente de asimetría para la fructosa donde los datos tienen un comportamiento ligeramente negativo con respecto a la media, pero se debe destacar que los valores de asimetría para la glucosa y la fructosa se encuentran en rango permitido de -2 y +2. Por otro lado, los valores negativos de curtosis (platicúrtica) de la glucosa y fructosa nos indica que hay una menor concentración de datos respecto a la media y se encuentran en el rango permitido de -2 y +2.

Tabla 15. Variables estadísticas del límite de cuantificación de los analitos de glucosa y fructosa

Variabes	LC(Glucosa)	LC(Fructosa)
Promedio (respuesta detector)	6084,3	5778,4
Desviación estándar	44,1161	97,7403
%RSD	0,7251	1,6915
Coefficiente de asimetría	0,2371	-0,1266
Curtosis	-0,9553	-1,9399
Mediana	6078,5	5786

Se evaluó el comportamiento normal de los datos mediante la prueba Ryan Joiner donde se estable lo siguiente, si el valor de p es menor que o igual al nivel de significancia ($p \leq \alpha$), los datos no siguen una distribución normal y se debe rechazar la hipótesis nula, pero si el valor p es mayor que o igual al nivel de significancia ($p \geq \alpha$) no se debe rechazar la hipótesis nula y se debe observar el coeficiente de correlación con nivel de confianza del 95 % y si este coeficiente de correlación se encuentra cerca de uno, los datos obtenidos en los análisis tienen un comportamiento normal.

Dado que el JR (coeficiente de Ryan Joiner) calculado es mayor para la glucosa y fructosa que JR (coeficiente de Ryan Joiner) crítico y el p valor es mayor que 0,1 como se puede observar en la tabla 16, se acepta la hipótesis nula, adicionalmente el coeficiente de correlación es cercano a 1. Los anteriores resultados permiten establecer que existe una distribución normal en los datos obtenidos.

Tabla 16. Análisis de normalidad para los límites de cuantificación de glucosa y fructosa.

Analito	Tamaño de la muestra (n)	Valor p calculado	RJ Calculado	RJ tabulado ($\alpha = 0,05$)
Glucosa	30	$p > 0,100$	0,971	0,9639
Fructosa		$p > 0,100$	0,975	

Se debe tener en cuenta que el límite de cuantificación del componente glucosa-fructosa se utilizó como punto inicial para elaborar la curva de trabajo y el rango lineal.

5.2.3.2 Linealidad y rango dinámico

Se aprecia estadísticamente al observar los datos tabla 17 que la respuesta entre la señal analítica (y) y la concentración (x) es lineal, a medida que aumenta la concentración de cada solución multicomponente de glucosa y fructosa con su respectivo patrón interno (arabinosa 1% m/v) aumenta el área, generando de esta manera una correlación positiva cercana a +1 y directa entre las dos variables, obteniendo coeficientes de determinación lineal (R^2) mayores a 0,9984.

Tabla 17. Coeficiente de determinación lineal obtenidos en el rango de trabajo

Intervalo (% m/v)	R ² (Glucosa)	R ² (Fructosa)
0,06-0,24	0,9996	0,9997
0,06-0,27	0,9990	0,9993
0,06-0,30	0,9984	0,9989
0,06-0,33	0,9987	0,9992

Teniendo en cuenta lo anterior se define que el rango dinámico a trabajar es 0,06-0,24%*m/v* porque presenta una buena correlación lineal de 0,9996 para la glucosa y para la fructosa 0,9997, además este es el rango que se usará para la estandarización de glucosa y fructosa por CLAR y también para ensayos futuros en el proceso de fermentación de ácido cítrico.

El rango lineal consta de 7 puntos equidistantes y fueron realizadas en tres días diferentes de las cuales se obtienen las siguientes áreas como se muestra en la tabla 18

Tabla 18. Relación de concentración del analito/patrón interno y relación de áreas analito/ patrón interno.

	Concentración del analito	Concentración del analito/ Concentración del patrón interno	Áreas de analito/ Área del patrón interno		
			Día1	Día 2	Día 3
Glucosa	0,006	0,6	0,5752	0,5767	0,5751
	0,009	0,9	0,8485	0,8474	0,8486
	0,120	1,2	1,1067	1,1067	1,1049
	0,150	1,5	1,3742	1,3745	1,3752
	0,180	1,8	1,6349	1,6362	1,6341
	0,210	2,1	1,9041	1,8982	1,9026
	0,240	2,4	2,1446	2,1421	2,1456
Fructosa	0,006	0,6	0,6286	0,6281	0,6284
	0,009	0,9	0,9229	0,9199	0,9221
	0,120	1,2	1,202	1,2028	1,2036
	0,150	1,5	1,5021	1,5039	1,5033
	0,180	1,8	1,8	1,8018	1,7998
	0,210	2,1	2,0827	2,0818	2,0801
	0,240	2,4	2,3516	2,3531	2,3546

Para la evaluación de la linealidad se utilizaron los datos de la tabla 18 y se elaboraron gráficas relacionando el área respecto al nivel de concentración para glucosa y fructosa con el patrón interno. Se aplicó el método de mínimos cuadrados y se encontró una ecuación lineal que relaciona la cantidad de cada carbohidrato con el área de la señal cromatográfica y 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 19.

Tabla 19. Evaluación de la linealidad para la estandarización de glucosa y fructosa por CLAR teniendo en cuenta los parámetros de coeficiente de determinación, pendiente e intercepto.

Carbohidrato	Día	Coeficiente de correlación (R ²)	pendiente (m)	Intercepto(b)
Glucosa	1	0,9998	0,8747	0,0577
	2	0,9998	0,8723	0,0604
	3	0,9998	0,8748	0,0572
	Desviación estándar (σ)	0	0,0014	0,0017
	Desviación estándar relativa (RSD)	0	0,1415	0,1721
Fructosa	1	0,9998	0,9627	0,0545
	2	0,9997	0,9623	0,0546
	3	0,9998	0,9632	0,054
	Desviación estándar (σ)	5,7735E-05	0,0005	0,0003
	Desviación estándar relativa (RSD)	0,0058	0,0451	0,0322

Al analizar los resultados de las pendientes y los resultados de los interceptos de los analitos de interés de glucosa y fructosa como se observa en la tabla 19 se observa que la desviación estándar relativa de estos datos tiene buena relación por no superar el 2 % de dispersión entre ellos mismo.

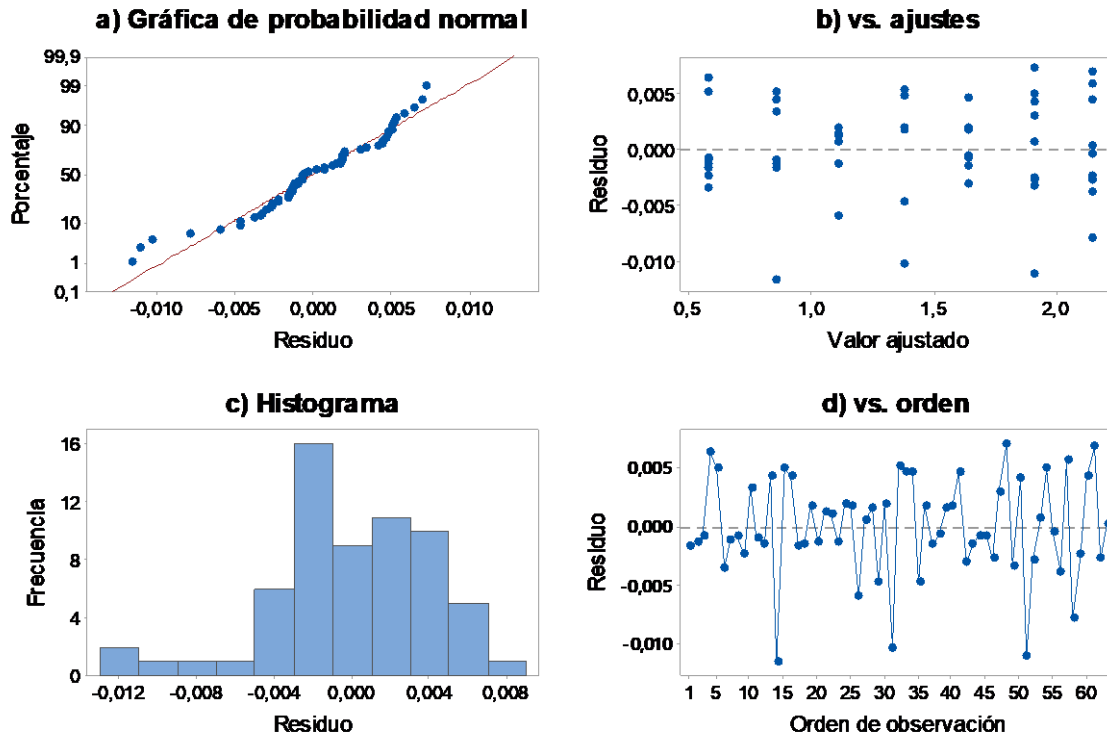


Figura 12. Graficas de residuos para glucosa, a) probabilidad normal de residuos, b) residuos vs ajuste, c) histograma, d) residuos vs orden.

En la figura 12 el análisis de la glucosa de los diferentes días permite evaluar si las suposiciones del modelo de regresión se cumplen. En la figura 12a en la gráfica de probabilidad normal se puede verificar que los datos de los extremos presentan mayor desviación, pero en la gráfica 12b residuos vs ajustes se observa que los residuos están distribuidos aleatoriamente a ambos lados del cero (datos positivos y datos negativos) y tienen una varianza constante, es decir no se presenta ningún tipo de patrón ni tendencia como se observa en la gráfica 12d residuos vs orden, además, el histograma de residuos (gráfica 12c) se puede observar que no hay valores atípicos. Con lo anterior se comprobó que los datos cumplen con los criterios de una distribución normal, independencia y homocedasticidad en los datos obtenidos.

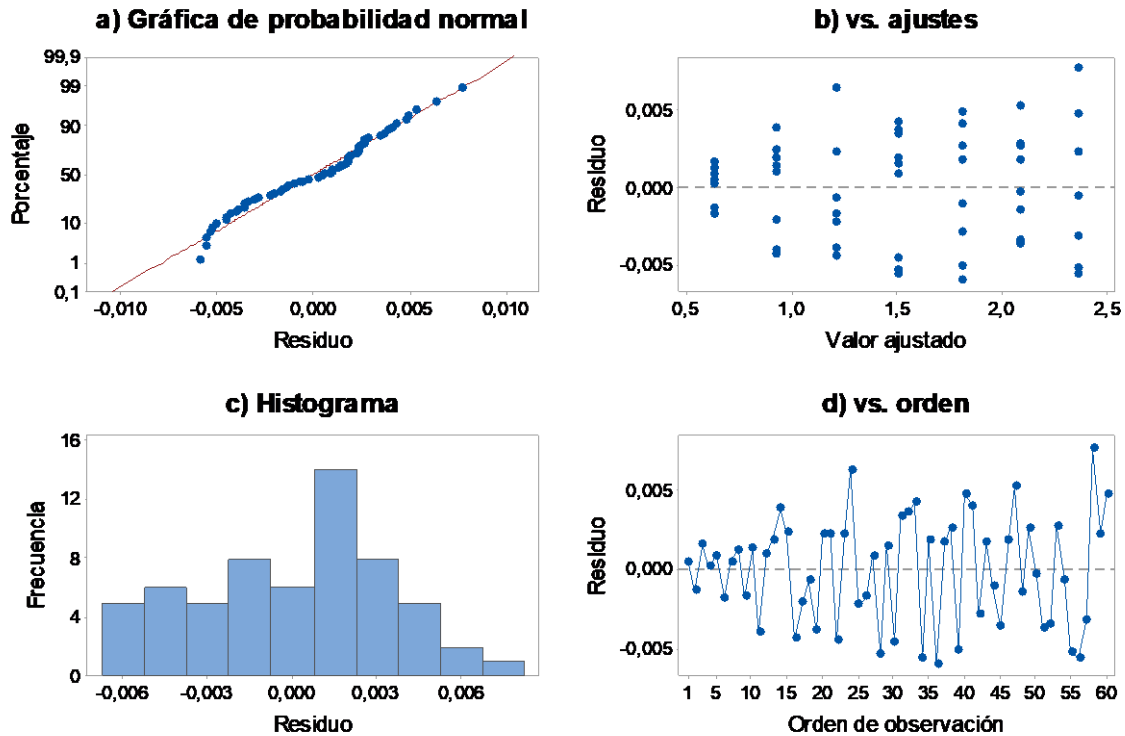


Figura 13. Gráficas de residuos para fructosa, a) probabilidad normal de residuos, b) residuos vs ajuste, c) histograma, d) residuos vs orden.

Analizando el comportamiento de los residuos para fructosa se puede decir que cumple con el supuesto de homocedasticidad como se observa en la figura 13b puesto que los datos están distribuidos aleatoriamente en cada lado de cero (datos positivos y datos negativos), también se observa independencia en los datos puesto que no hay ningún patrón figura d, al analizar el histograma se puede afirmar que no hay datos atípicos, por otro lado, hay un comportamiento normal de los datos en la gráfica de probabilidad de residuos.

5.2.3.3 Precisión

La precisión refleja la cercanía de los resultados obtenidos entre sí y 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). Los datos obtenidos de la precisión fueron analizados de acuerdo al software estadístico Minitab versión 18.

- **Repetibilidad**

Los resultados de repetibilidad presentados en la tabla 20 muestran desviaciones estándar relativas menores al 2% según el criterio de aceptación que se reporta en la USP (Farmacopea de Estados Unidos, 2022.) En el caso de glucosa se obtuvo un RSD de 0,3366 y para la fructosa un RSD de 0,4612.

Tabla 20. Desviación estándar relativa para la glucosa y fructosa

Soluciones multicomponentes	Día Glucosa (%m/v)	Día Fructosa (%m/v)
1	0,153	0,151
2	0,153	0,151
3	0,153	0,151
4	0,153	0,151
5	0,153	0,151
6	0,153	0,152
7	0,154	0,153
8	0,154	0,152
9	0,154	0,152
10	0,154	0,152
Promedio	0,1534	0,1516
Desviación estándar	0,0005164	0,00069921
Desviación estándar Relativa (RSD)	0,3366348	0,46121761

- **Precisión intermedia**

El comportamiento de los datos obtenidos en días diferentes se analizó mediante una ANOVA de un factor con tres niveles (días diferentes) en el software Minitab 18, para examinar estadísticamente las diferencias de las medias.

Para determinar la diferencia entre las medias de los ensayos realizados para la glucosa estadísticamente significativa se comparó el valor P con el nivel de significancia, el valor P 0,5023 es mayor que el nivel de significancia (denotado como α o alfa 0,05) tabla 21, por lo que se acepta la hipótesis nula y se puede afirmar que no hay diferencias entre las medias de los tres niveles del factor y para confirmar lo anterior, se observa que F calculado es menor que a F tabulado o crítico (Figura 14) lo cual significa que no existe diferencia estadística significativa en los ensayos realizados.

Tabla 21. Análisis de varianza para la glucosa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados (SC Ajust)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MC Ajust)	F Calculado	Prob (P)	F tabulado
Entre grupos	5,78E-07	2	2,889E-07	0,7	0,5023	3,2199
Dentro de los grupos	1,73E-05	42	4,127E-07			
Total	1,791E-05	44				

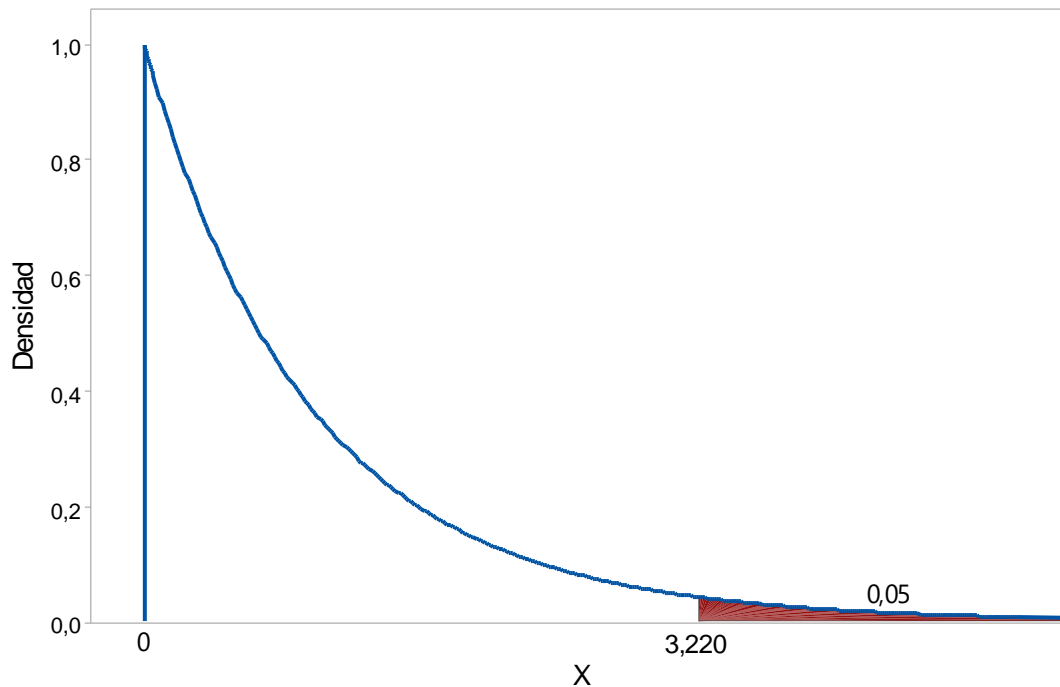


Figura 14. Distribución de F de Fisher, grado de libertad de numerador 2 y grado de libertad del denominador 42

En el caso de la fructosa al comparar el valor P 0,4012 (tabla 22) con el nivel estadístico de significancia P 0,05 se puede afirmar que es mayor, por lo que se acepta la hipótesis nula y por lo tanto no hay diferencias significativas en los tres niveles del factor, además el F calculado es menor que el F tabulado, lo que significa que los datos están fuera de la zona de rechazo como se observa en la figura 14.

Tabla 22. Análisis de varianza para la fructosa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados (SC Ajust)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MC Ajust)	F	P(prob)	Valor crítico F
Entre grupos	1,24E-06	2	6,22E-07	0,9331	0,4012	3,2199
Dentro de los grupos	2,8E-05	42	6,67E-07			
Total	2,924E-05	44				

5.2.3.4 Exactitud

La exactitud se realizó con material de referencia certificado y se evaluó mediante el análisis de 10 soluciones multicomponente de glucosa y fructosa, cuya “concentración real (C real)”

se muestra en la tabla 23, estas soluciones se compararon frente al valor experimental que se obtuvo tras ejecutar el respectivo análisis cromatográfico, este valor también se muestra en la tabla 23 (C exp). La exactitud se expresa en función del porcentaje de error relativo (%Error). Para la glucosa se obtuvo un valor de 1,56 % y para fructosa 1,53 %, estos valores están por debajo de criterio de aceptación que es del 2%

Tabla 23. Error relativo porcentual obtenido para 10 soluciones multicomponentes de glucosa y fructosa y con su respectivo patrón interno

Analito	C real	C exp	Error relativo porcentual
Glucosa	99,5	101,31	1,56
Fructosa	99	100,65	1,53

5.3 Validación de método por volumetría para la determinación de pureza en producto terminado de ácido cítrico.

Como se mencionó en el ítem 4.5 también se realizó la determinación de pureza de ácido cítrico mediante volumetría teniendo en cuenta lo siguiente

5.3.1. Características de desempeño para la validación

5.3.1.1 Linealidad de la validación

Con el fin de demostrar que existe correlación significativa entre las dos variables se realiza el siguiente análisis descrito en la tabla 24.

Tabla 24. Análisis de varianza para la linealidad de producto terminado de ácido cítrico

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados (SC Ajust)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MC Ajust)	F Calculado	F tabulado
Entre grupos	2886.82	1	2886.82	29221.34	3,54E-23
Dentro de los grupos	1,28	13	0,098		
Total	2888.10	14			

Dado que el F calculado es mayor que F crítico se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, se concluye que la pendiente de la recta es diferente de cero y tiene una correlación estadísticamente significativa entre concentración experimental y concentración teórica con un nivel de confianza del 95,0%.

Por otro lado, el estadístico R-Cuadrado indica que el modelo se ajusta a un 99.96% para la variabilidad de la concentración experimental. El coeficiente de correlación es igual a 0,9998 indicando una relación fuerte entre las variables (Anexo 4).

5.3.1.2 Precisión expresada en repetibilidad y precisión intermedia de la validación

Lo datos (% pureza) de repetibilidad y precisión intermedia de producto terminado de ácido cítrico son analizados mediante ANOVA de un factor, los resultados se presentan en la tabla 25.

Tabla 25. Análisis de varianza de un solo factor para la precisión de producto terminado de ácido cítrico.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados (SC Ajust)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MC Ajust)	F calculado	Prob (P)	F crítico
Entre grupos	0,042	17	0,0025	0,819	0,662	1,915
Dentro de los grupos	0,109	36	0,0030			
Total	0,151	53				

De los resultados de la tabla 25 se puede afirmar que no hay diferencia estadística significativa entre las medias del contenido de pureza en ácido cítrico puesto que el valor P 0,662 es mayor que la significancia ($\alpha=0.05$) para los diferentes tratamientos evaluados tales como, diferentes lotes (incluido estándar de referencia), analistas y días y para confirmar lo anterior se observa que el F calculado es menor que el F tabulado o crítico por lo que no hay diferencia estadística en los ensayos realizados. Por otro lado, la repetibilidad y la precisión cumplen con el criterio de aceptación como se expresa en la tabla 26.

Tabla 26. Precisión del método expresado en repetibilidad y precisión intermedia

Parámetro	Valor de la medición	Criterio de aceptación	Declaración de la medición
Repetibilidad	0,055	% RSD <2%	Cumple
Precisión intermedia	0,057	%RSD<2%	Cumple

5.3.1.3 Exactitud expresada en forma de recuperación de la validación

En la tabla 27 se observa que los resultados de la exactitud en la validación de ácido cítrico en producto terminado para las diferentes contracciones al 90 y 110% cumplen con los criterios de aceptación.

Tabla 27. Exactitud del método expresado en recuperación tratados en dos niveles de concentración

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Declaración de la medición
Recuperación nivel bajo	99-101	100,59	Cumple
Recuperación nivel alto	99-101	99,96	Cumple

5.3.1.4 Seguimiento y control al producto terminado de ácido cítrico

Los gráficos de control de calidad son herramientas que sirven para saber si un proceso está bajo control o si es necesario hacer ajuste y si son viables, también para verificar la estabilidad del proceso.

Para el control en la determinación de pureza de ácido cítrico se tuvo en cuenta límite inferior (LCI) y límite superior (LCS) y dos desviaciones estándar y de esta manera reconocer cuando un dato que está por debajo de 99,89 o por encima 100,09 es un dato atípico. Como se observa en la figura 15 los datos se encuentran dentro del rango y no hay ningún dato por fuera de especificación.

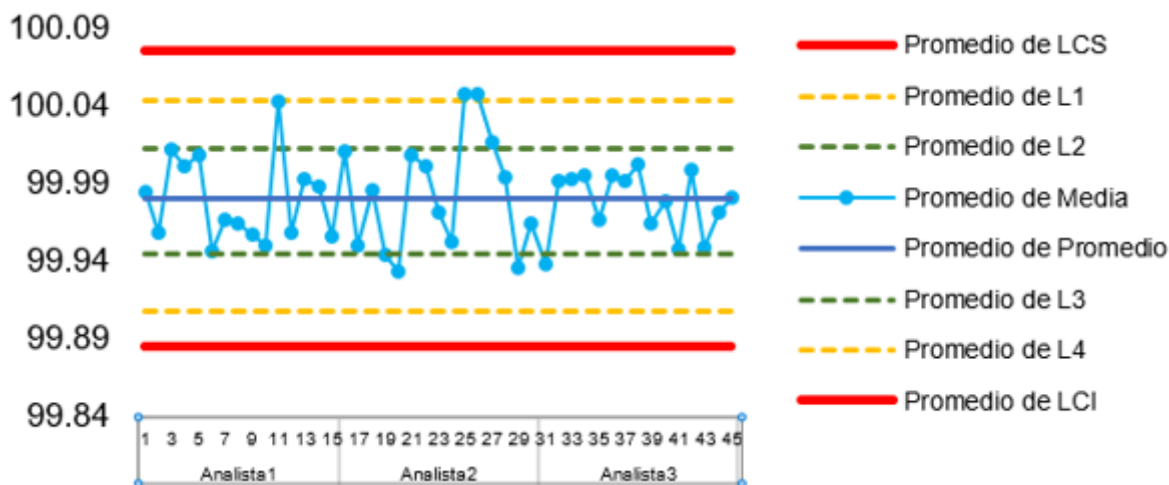


Figura 15. Figura. Gráfico de control de pureza de producto terminado de ácido cítrico

6. Conclusiones

- Se realizó una estandarización para la cuantificación de glucosa y fructosa mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) donde los valores óptimos de flujo, concentración de solvente, volumen de inyección y columna (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, con fase móvil de solución de ácido sulfúrico 3,5 mM isocráticamente) mostraron buenos resultados en cuanto a la capacidad de separación y cuantificación de los analitos de interés
- Los parámetros de estandarización de la glucosa y fructosa mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) fueron adecuados, puesto que los valores obtenidos tienen un comportamiento normal según la estadística descriptiva e inferencial y cumplieron con los criterios de establecidos en cada prueba.
- En el caso de la validación en la determinación de pureza mediante volumetría en titulador automático en producto terminado de ácido cítrico se concluyó que las características de desempeño tales como, linealidad, precisión y exactitud cumplen con los criterios de aceptación.
- Con la carta o grafica de control para la pureza de ácido cítrico por volumetría utilizando titulador automático se determinó que los resultados de diferentes ensayos estaban dentro los límites establecidos de acuerdo al promedio, desviación estándar y varianza.

7. Bibliografía

- Ajala, A. S., Adeoye, A. O., Olaniyan, S. A., & Fasoyin, O. T. (2020). A study on effect of fermentation conditions on citric acid production from cassava peels. *Scientific African*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00396>
- Blaubrand. (2015). *Aparatos volumétricos y picnómetros. Instrucciones de calibrado (SOP)*, p. 5-11. Recuperado 25 julio del 2021 desde: https://www.brand.de/brand/contentserv_data/Context/BRAND%20GMBH%20%2B%20CO%20KG/Dokumente/Produkte/SOP/BLAUBRAND/SOP_BLAUBRAND_ES.pdf
- Bio-Rad. (2012) *Descripción general y estrategias para la cromatografía de purificación de moléculas bioorgánicas*. p 11. Recuperado 20 de agosto del 2020 desde: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1928.pdf
- De Sá, L. R. V., de Oliveira, M. A. L., Cammarota, M. C., Matos, A., & Ferreira-Leitão, V. S. (2011). Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(23), 15177–15186. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.08.056>
- Duarte-Delgado, D., Narváez-Cuenca, C. E., Restrepo-Sánchez, L. P., Kushalappa, A., & Mosquera-Vásquez, T. (2015). Development and validation of a liquid chromatographic method to quantify sucrose, glucose, and fructose in tubers of *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 975, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.039>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (NTC-ISO/IEC 17025). (2017). *Requisitos Generales para la Competencia de los laboratorios de Ensayo y Calibración. Definiciones generales, segunda actualización*. Pp. 6, 14
- Farmacopea de Estados Unidos (USP). (2022). Validación de Procedimientos Farmacopeicos. Cap 1225, 1039
- Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. (2018). Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In *Modern Techniques for Food Authentication* (pp. 459–526). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x>
- Lucía, A., & Schouben, G. (2012). *Efecto de la variación de los niveles de P & K en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de Aspergillus niger*.
- Miller, N. y Miller, J. (Ed). (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica, 4 edición*. Madrid, España: Pearson educación S.A. p.138.
- Mores, S., Vandenberghe, L. P. de S., Magalhães Júnior, A. I., de Carvalho, J. C., de Mello, A. F. M., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2021). Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. In *Bioresource Technology* (Vol. 320). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124426>

- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25(3), 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>
- Piñeros-Castro, Y., Gloria; Velasco, A., Proaños, J., Cortes, W., & Ballesteros, I. (n.d.). *Producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión con vapor*, Recuperado el 18 de septiembre del 2022 desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/rion/v24n2/v24n2a04.pdf>
- Robards, K., Haddad, P. R., & Jackson, P. E. (2004). High-performance Liquid Chromatography—Separations. In *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods* (pp. 305–380). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-057178-2.50009-1>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., & Mora Lugo, E. de la. (n.d.). *Fundamentos De Química Analítica* (9a. Ed). México DF, *Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R., Crouch; traducción Dr. Eugenio de la Mora Lugo, M. en C. Jesús Miguel Torres Flores.*
- Sucroal S.A. (20 de diciembre del 2021). *Una historia que nace en la naturaleza*. Recuperado 20 de diciembre del 2021 desde <https://sucroal.com.co/historia-sucroal/>
- Sun, Y., Xu, Z., Zhang, F., Li, Z., & Yang, B. (2022). A reagent-free acid-base titration method via an electro-dialytic titrant generator. *Talanta*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122964>
- Tapia Julio César, E., Sylvie, L., Hernández Roberto, O., Guerrero Maribel, H., Reyes Leonardo, G., & Ramírez Juan Gabriel, V. (n.d.). Validación de método analítico para la cuantificación de compuestos de fermentación por HPLC-RI-UV. In *Universidad Autónoma Metropolitana Revista tediq* (Vol. 6, Issue 6). Retrieved September 17, 2022, from http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/7694/Validacion_de_metodo_analitico_2020.pdf?sequence=1
- Valcárcel, M. y Gómez, A. (Ed.). (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona, España:Editorial Reverté, p.375-378.

ANEXOS 1

1.1 Certificado de la balanza analítica

Certificado No: LMS-BOG-4445 Laboratorio de masa Página 1 de 3	 Ciencia al servicio de la medición	 ACREDITADO ONAC ORGANISMO NACIONAL DE Acreditación de Colombia ISO/IEC 17025:2017 11-LAC-001
--	--	---

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

Este certificado es emitido a cordé con los requisitos del estándar internacional ISO/IEC 17025 de acuerdo con la edición relacionada en el certificado de acreditación 11-LAC-001 vigente a la fecha y los criterios de acreditación para laboratorios de calibración del Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC).

Este certificado de calibración no puede ser reproducido sin la autorización del laboratorio excepto cuando se garantiza que se reproduce totalmente.

Información del solicitante:

Razón social:	SUCROAL S.A.
Dirección:	Recta Cal Palmira Kilometro 18 desvío a Candelaria
Ciudad, Departamento:	Palmira, Valle del cauca
Fecha de recepción:	2021-03-18
Número de reporte:	11227-3

Información del instrumento bajo calibración:

Descripción del instrumento:	Juego de masas de 1 g a 500 g
Fabricante:	METTLER TOLEDO
Modelo:	Cilíndricas
Serie:	15888
Identificación:	SL0147
Fecha de calibración:	2021-03-29
Lugar de calibración:	SIGMA, Laboratorio de masa. Avenida el Dorado No. 85D - 55, Bogotá D.C.

Método de calibración utilizado:

El instrumento fue calibrado utilizando el método de comparación directa con masas patrón, siguiendo el esquema de pesaje ABBA tal como se menciona en el anexo C. de la norma técnica colombiana NTC 1848:2007 "Pesas de clase E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3, M3. Parte 1: requisitos metroológicos y técnicos. Generalidades." y se encuentra documentado en el procedimiento interno PEM-05.

Número de páginas del certificado incluyendo anexos: 3

Firma Autorizada	Fecha de emisión
Firmado digitalmente por:	
Milena Rojas Reyes Metrólogo Máster LABORATORIOS DE METROLOGIA SIGMA LTDA	2021-04-06

Sello
**FIRMADO
DIGITALMENTE**



FEM-27 ED-06 2020-11-24

LABORATORIOS DE METROLOGIA SIGMA LTDA
Av. El dorado No. 85D - 55 Local E-35. Telefax: 571 - 410 73 74 Bogotá, Colombia.
E-mail: dircomercial@laboratoriosigma.com, Web: www.laboratoriosigma.com

Activ
Ve a C

1.2 Certificado de la micropipeta 100-1000 µL

MM-V-000135	
ÁREA <i>Area</i>	VOLUMEN
INSTRUMENTO <i>Instrument</i>	PIPETA DE PISTÓN
FABRICANTE <i>Manufacturer</i>	BRAND
MODELO <i>Model</i>	TRANSFERPETTE® S
CÓDIGO <i>Identification Code</i>	LCAVV01
INTERVALO DE MEDIDA <i>Measuring Interval</i>	100 µL a 1000 µL
SOLICITANTE <i>Customer</i>	SUCROAL S.A.
DIRECCIÓN <i>Address</i>	Recta Cali - Palmira, km 18 desvío Candelaria Palmira - Valle del Cauca
FECHA DE RECEPCIÓN <i>Date of Receipt</i>	2021-03-24
FECHA DE CALIBRACIÓN <i>Date of Calibration</i>	2021-03-29
FECHA DE EMISIÓN <i>Date of Issue</i>	2021-03-30
CALIBRADO POR <i>Calibrated by</i>	Miguel A. Naranjo R. Técnico de Laboratorio
NUMERO DE PAGINAS DEL CERTIFICADO <i>Number of pages of this Certificate</i>	3



IVAN FERNANDO VIVEROS MILLAN
Documento Firmado Digitalmente
Cali - Valle del Cauca
2021-03-30
14:12:03-05007

Iván Fernando Viveros M.
Director del Laboratorio

Activ
Ve a C

1.3 Certificado de la calibración de equipo CLAR WATERS



INFORME MANTENIMIENTO PREVENTIVO
SISTEMAS MODULARES HPLC
F24/2 PR ST 02

Modulares MQ

No.: 00050

MANTENIMIENTO PREVENTIVO

Fecha	2021/04/08
Nombre del Equipo	HPLC Breeze

MÓDULOS

S/N	H0815P566A
Módulo	1515

S/N	J08CHM603M
Módulo	CHM

S/N	E08487540M
Módulo	2487

S/N	H0871P930M
Módulo	717+

S/N	J08214755M
Módulo	2414

Realizado por	Diego Mosquera
Recibido por	Jesús Plazas
Ubicación	Laboratorio Control de Calidad Citrico
Cliente	Sucroal
Ciudad	Palmira

1.4 Descripción y especificaciones del titulador automático.



SI Analytics™ Titronic™ 300 Piston Burette

Precise dosing instrument for dispensable liquids, solvents, and titrating agents. SI Analytics™ TITRONIC™ 300 Piston Burette is the perfect motor-driven burette for manual titration.

Marca: SI Analytics™ 285225820

Detalles adicionales : Peso : 3.69420kg

⚠ Este artículo no es se puede devolver. Vea la política de devoluciones

[Descripción](#) [Especificaciones](#)

Descripción

Titrador TITRONIC™ 300

- Bureta motorizada para titulación manual y dosificación precisa
- Excelente rentabilidad para aplicaciones de laboratorio que exigen alta precisión y flexibilidad
- Titulación con controlador manual (ratón) que puede ajustarse en cinco pasos distintos para optimizar su velocidad y precisión
- Cálculo automático de resultados en distintas unidades y exportación a una impresora o una unidad de memoria USB
- Registro automático del peso cuando hay una balanza conectada
- Dosificación y velocidad de llenado ajustables para cada método
- La función de llenado inteligente comprueba si una etapa de dosificación es factible sin un llenado previo, reduciendo los fallos durante el proceso de dosificación en serie.
- Conexión del agitador: TM 50, fuente de alimentación directamente a través de la bureta de pistón
- Interfaces: 1 x USB-A y 1 x USB-B, 2 x RS232C
- Pantalla: TFT con capacidad gráfica
- Visualización de volumen: 0 a 9999,99mL
- Resolución de la pantalla: 0,005-0,025mL (en función de la unidad de dosificación)
- Velocidad de dosificación: máx. 100mL/min (con unidad de 50mL)
- Velocidad de llenado: mín. 30 s a 999 s ajustable (el tiempo depende del volumen del cilindro)
- Unidades de dosificación: de 20mL y 50mL, intercambiable
- Resolución de la bureta: 8000
- Precisión de dosificación: error sistemático 0,15%, error aleatorio 0,05% en conformidad con la norma EN ISO 8655-6

Especificaciones

Número de	T 300/20 M2
Incluye	Magnetic Stirrer
Resolución	Resolución de pantalla: de 0.005 a 0.025 ml; resolución de bureta: 8000
Fondo (métrico)	20.5cm
Anchura (métrico)	13.5cm

Descripción	Titronic™ 300 Basic
Aplicaciones	Para aplicaciones en el laboratorio, donde se requiere alta precisión y flexibilidad.
Tipo de pantalla	TFT compatible con gráficos
Intervalo de temperatura ambiente (métrico)	10 to 40°C

ANEXO 2

2.1 Certificado de análisis para el biftalato ácido de potasio.



Certificate of Analysis

1.04874.0000 Potassium hydrogen phthalate for analysis EMSURE® Reag. Ph Eur
Batch A1235374

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (Perchloric acid titration from dried substance)	≥ 99.5	%	100.0	%
Identity (IR-spectrum)	passes test		passes test	
In water insoluble matter	≤ 0.005	%	≤ 0.005	%
Chloride (Cl)	≤ 0.002	%	≤ 0.002	%
Sulfur compounds (as SO ₄)	≤ 0.005	%	≤ 0.005	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Cu (Copper)	≤ 0.0002	%	≤ 0.0002	%
Fe (Iron)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Na (Sodium)	≤ 0.01	%	≤ 0.01	%
Pb (Lead)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Loss on Drying (105°C)	≤ 0.2	%	≤ 0.2	%

Corresponds to Reag. Ph Eur

Date of release (DD.MM.YYYY) 17.11.2017
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.11.2022

Claudia Wiegand
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

2.2 Certificado de análisis para el hidróxido de sodio



Scharlab S.L.

Gato Pérez, 33. Pol. Ind. Mas d'en Cisa

08181 Sentmenat

☎ +34937456400

✉ helpdesk@scharlab.com

Recepción 17/07/2019

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Sodium hydroxide, pellets, reagent grade, ACS, ISO, Reag. Ph Eur		Batch 18933202
SO0425		Quality release date 22/05/2018
		Expiry date 05/2023
Analysis	Batch value	Specifications
Assay (Acidimetric)	98,96 %	≥ 98,5
Identity	passes test	passes test
Appearance of solution	passes test	passes test
Carbonates (as Na ₂ CO ₃)	0,19 %	≤ 1,0
Chlorides (Cl)	< 0,0010 %	≤ 0,001
Phosphates (as PO ₄)	< 0,0004 %	≤ 0,0005
Silicates (SiO ₂)	< 0,0005 %	≤ 0,001
Sulfates (SO ₄)	< 0,0005 %	≤ 0,0005
Ammonium hydroxide precipitate	< 0,02 %	≤ 0,02
Total nitrogen (as N)	< 0,0005 %	≤ 0,0005
Aluminium (Al)	< 0,0005 %	≤ 0,0005
Arsenic (As)	< 0,0001 %	≤ 0,0001
Calcium (Ca)	< 0,0010 %	≤ 0,001
Copper (Cu)	< 0,0005 %	≤ 0,0005
Heavy metals (as Ag)	< 0,002 %	≤ 0,002
Iron (Fe)	< 0,0005 %	≤ 0,0005
Lead (Pb)	< 0,00004 %	≤ 0,0002
Magnesium (Mg)	< 0,0005 %	≤ 0,0005
Mercury (Hg)	< 0,00001 %	≤ 0,00001
Nickel (Ni)	< 0,0003 %	≤ 0,0005
Potassium (K)	< 0,0200 %	≤ 0,02
Zinc (Zn)	< 0,001 %	≤ 0,001

2.3 Certificado de análisis para la fenolftaleína



Certificate of Analysis

1.07233.0000 Phenolphthalein indicator ACS, Reag. Ph Eur
Batch K50083133

	Spec. Values		Batch Values	
Identity (UV/VIS-Spectrum)	passes test		passes test	
Appearance	White to yellowish white powder		passes test	
Clarity of the alcoholic solution (10 g/l ethanol)	passes test		passes test	
Absorption maximum λ_{\max} . (buffer pH 9.8)	551 - 554	nm	551 - 554	nm
Spec. Absorptivity A 1%/1cm (λ_{\max} ; 0.01 g/l; buffer pH 9.8; calculated on dried substance)	700 - 750		714	
Transition range	pH 8.2 - pH 9.8 almost colorless - red-violet		passes test	
Transition range (according to ACS)	passes test		passes test	
Transition interval (according Reag. Ph Eur)	passes test		passes test	
Loss on drying (105 °C)	≤ 1	%	< 1	%

Date of release (DD.MM.YYYY) 09.03.2018
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2023

Dr. Ralf Burgert
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

2.4. Certificado de análisis de ácido cítrico (lote AF19J191AF)



Certificate of Analysis

SEND TO : _____

ATTN: **QCLab**

PRODUCT: **ACIDO CITRICO FINO * 50 LB [50 SACOS]**

Customer PO #:

ORDER #:

MATERIAL #: **16885**

REPORT DATE: **24/07/20**

Qty Shipped:

ANALYTICAL DATA

LOT NUMBER: **AF19J131CF**
 MFG DATE (dd/mm/yy): **13/09/19**
 EXP DATE (dd/mm/yy): **13/09/22**
 PACKAGE SIZE: **22.68 KG**

REQUIREMENTS	UNITS	RESULTS	SPECIFICATIONS	
			MIN	MAX
ASSAY (Anhydrous basis)	% w/w	100.02	99.50	100.50
WATER (Karl Fischer)	% w/w	0.057	0.000	0.500
COLOR OF SOLUTION (sol. 40% w/v, 420 nm)	% T	100.0	99.0	100.0
CLARITY OF SOLUTION (sol. 40% w/v)	NTU	0.58	0.00	3.00
**LEAD (as Pb)	ppm	0.002	0.000	0.500
**CALCIUM (as Ca)	ppm	1.71	0.00	75.00
**ARSENIC (as As)	ppm	0.038	0.000	1.000
**MERCURY (as Hg)	ppm	Not detec.	0.000	1.000
**IRON (as Fe, sol 40% w/v, 670 nm)	ppm	0.28	0.00	5.00
**RESIDUE ON IGNITION	% w/w	0.019	0.000	0.050
**EVALUATION OF INSOLUBLES	-	PASS	PASS	PASS
**FOREIGN MATTER	-	PASS	PASS	PASS
**IDENTIFICATION (test IR)	-	PASS	PASS	PASS
**RELATED SUBSTANCES (isocitric acid)	-	PASS	PASS	PASS
*UV ABSORBANCE	-	PASS	PASS	PASS
*ORGANIC VOLATILE IMPURITIES	-	PASS	PASS	PASS
CARBONIZABLE SUBSTANCES (1g, 470 nm)	-	PASS	PASS	PASS
ODOR (Characteristic odor)	-	PASS	PASS	PASS
APPEARANCE	-	WHITE CRYSTAL	PASS	PASS
TASTE (Strong acid taste)	-	ACIDIC	ACIDIC	ACIDIC
**OXALATE (as oxalic acid dihydrate, 520nm)	ppm	<100	0	100
**HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<5.0	0.0	5.0
**SULPHATES (as sulphate, sol. 40% w/v)	ppm	<150	0	150
*TRIDODECYLAMINE	ppm	<0.1	0.0	0.1
SALMONELLA	25 g	ABSENT	ABSENT	ABSENT
RETAINED ON 600 um US STD 30	% w/w	0.02	0.00	1.00
PASS THRU 150 um US STD 100	% w/w	0.12	0.00	5.00

2.5. Certificado de análisis de ácido cítrico (lote AF19J161AF)



Certificate of Analysis

SEND TO : _____

ATTN: QCLab

PRODUCT: ACIDO CITRICO ANHIDRO FINO * 25 KG

Customer PO #:

ORDER #:

MATERIAL #: 20561

REPORT DATE: 24/07/20

Qty Shipped:

ANALYTICAL DATA

LOT NUMBER: AF19J161AF
 MFG DATE (dd/mm/yy): 16/09/19
 EXP DATE (dd/mm/yy): 16/09/22
 PACKAGE SIZE: 25.00 KG

REQUIREMENTS	UNITS	RESULTS	SPECIFICATIONS	
			MIN	MAX
ASSAY (Anhydrous basis)	% w/w	100,03	99,50	100,50
WATER (Karl Fischer)	% w/w	0,056	0,000	0,500
COLOR OF SOLUTION (sol. 40% w/v, 420 nm)	% T	100,0	99,0	100,0
CLARITY OF SOLUTION (sol. 40% w/v)	NTU	0,73	0,00	3,00
**LEAD (as Pb)	ppm	0,002	0,000	0,500
**CALCIUM (as Ca)	ppm	1,71	0,00	75,00
**ARSENIC (as As)	ppm	0,038	0,000	1,000
**MERCURY (as Hg)	ppm	Not detec.	0,000	1,000
**IRON (as Fe, sol 40% w/v, 670 nm)	ppm	0,28	0,00	5,00
**RESIDUE ON IGNITION	% w/w	0,019	0,000	0,050
**EVALUATION OF INSOLUBLES	-	PASS	PASS	PASS
**FOREIGN MATTER	-	PASS	PASS	PASS
**IDENTIFICATION (test IR)	-	PASS	PASS	PASS
**RELATED SUBSTANCES (isocitric acid)	-	PASS	PASS	PASS
*UV ABSORBANCE	-	PASS	PASS	PASS
*ORGANIC VOLATILE IMPURITIES	-	PASS	PASS	PASS
CARBONIZABLE SUBSTANCES (1g, 470 nm)	-	PASS	PASS	PASS
ODOR (Characteristic odor)	-	PASS	PASS	PASS
APPEARANCE	-	WHITE CRYSTAL	PASS	PASS
TASTE (Strong acid taste)	-	ACIDIC	ACIDIC	ACIDIC
**OXALATE (as oxalic acid dihydrate, 520nm)	ppm	<100	0	100
**HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<5,0	0,0	5,0
**SULPHATES (as sulphate, sol.40% w/v)	ppm	<150	0	150
*TRIDODECYLAMINE	ppm	<0,1	0,0	0,1
SALMONELLA	25 g	ABSENT	ABSENT	ABSENT
RETAINED ON 600 um US STD 30	% w/w	0,01	0,00	1,00
PASS THRU 150 um US STD 100	% w/w	0,22	0,00	5,00

2.6. Certificado de análisis de ácido cítrico (lote AF19C201AF)



Certificate of Analysis

SEND TO : _____

ATTN: QCLab

PRODUCT: ACIDO CITRICO FINO * 25 KG POLIPROPILENO

Customer PO #:

ORDER #:

MATERIAL #: 13633

REPORT DATE: 13/09/19

Qty Shipped:

ANALYTICAL DATA

LOT NUMBER: AF19C072AF
 MFG DATE (mm/yy): 03/19
 EXP DATE (mm/yy): 03/22
 PACKAGE SIZE: 25.00 KG

REQUIREMENTS	UNITS	RESULTS	SPECIFICATIONS	
			MIN	MAX
**MERCURY (as Hg)	ppm	0,000	0,000	1,000
**EVALUATION OF INSOLUBLES	-	PASS	PASS	PASS
**FOREIGN MATTER	-	PASS	PASS	PASS
**IDENTIFICATION (test IR)	-	PASS	PASS	PASS
**RELATED SUBSTANCES (isocitric acid)	-	PASS	PASS	PASS
*UV ABSORBANCE	-	PASS	PASS	PASS
*ORGANIC VOLATILE IMPURITIES	-	PASS	PASS	PASS
CARBONIZABLE SUBSTANCES (1g, 470 nm)	-	PASS	PASS	PASS
ODOR(Characteristic odor)	-	PASS	PASS	PASS
APPEARANCE	-	WHITE CRYSTAL	PASS	PASS
TASTE (Strong acid taste)	-	ACIDIC	ACIDIC	ACIDIC
**OXALATE (as oxalic acid dihydrate,520nm)	ppm	<100	0	100
**HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<5,0	0,0	5,0
**SULPHATES (as sulphate, sol.40% w/v)	ppm	<150	0	150
*TRIDODECYLAMINE	ppm	<0,1	0,0	0,1
ASSAY (Anhydrous basis)	%w/w	100,04	99,50	100,50
WATER (Karl Fischer)	%w/w	0,077	0,000	0,500
COLOR OF SOLUTION (sol. 40% w/v, 420 nm)	%T	100,0	99,0	100,0
CLARITY OF SOLUTION (sol. 40% w/v)	NTU	0,62	0,00	3,00
RETAINED ON 600 um US STD 30	%w/w	0,05	0,00	1,00
PASS THRU 150 um US STD 100	%w/w	0,07	0,00	5,00
**LEAD (as Pb)	ppm	0,001	0,000	0,500
**CALCIUM (as Ca)	ppm	0,64	0,00	75,00
**ARSENIC (as As)	ppm	0,081	0,000	1,000
**IRON (as Fe, sol 40% w/v, 670 nm)	ppm	0,48	0,00	5,00
**RESIDUE ON IGNITION	%w/w	0,014	0,000	0,050


2.7. Certificado de análisis de ácido sulfúrico

Certificate of Analysis

1.00731.2510 Sulfuric acid 95-97% for analysis EMSURE® ISO
Batch K51248031

	Spec. Values		Batch Values	
	95.0 - 97.0	%	96.2	%
Assay (alkalimetric)	≤ 10	Hazen	< 10	Hazen
Color	≤ 0.1	ppm	< 0.1	ppm
Chloride (Cl)	≤ 0.2	ppm	< 0.2	ppm
Nitrate (NO ₃)	≤ 0.5	ppm	< 0.3	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.010	ppm	< 0.002	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.050	ppm	< 0.005	ppm
Au (Gold)	≤ 0.060	ppm	< 0.010	ppm
B (Boron)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Be (Beryllium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.100	ppm	< 0.010	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.010	ppm	< 0.020	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.020	ppm	< 0.005	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.010	ppm	0.010	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Ga (Gallium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ge (Germanium)	≤ 0.100	ppm	< 0.010	ppm
In (Indium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
K (Potassium)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.005	ppm	< 0.010	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Mo (Molybdenum)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Na (Sodium)	≤ 1	ppm	< 1	ppm
NH ₄ (Ammonium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.100	ppm	< 0.010	ppm
Pt (Platinum)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Sn (Tin)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.020	ppm	< 0.005	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Tl (Thallium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
V (Vanadium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Zn (Zinc)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Zr (Zirconium)	≤ 2	ppm	< 2	ppm
Substances reducing potassium permanganate (as SO ₂)	≤ 3	ppm	< 3	ppm
Residue on ignition				

2.8. Certificado de análisis de etanol grado USP.

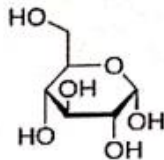
 Sucroal <small>biotecnología en movimiento</small>		CERTIFICATE OF ANALYSIS CERTIFICADO DE ANALISIS DE CALIDAD		Page: 1 DATE: 24/07/20	
Fábrica Oficinas: Km.18 Recta Cali-Palmira, Vereda La Herradura Ventas Teléfonos: División Alimentos 57(2)4310643 División Industrial 57(2)4310650 PBX 57(2)4310500 www.sucroal.com.co		CUSTOMER (Cliente):			
PRODUCT(Producto) : 13593 ALCOHOL ETILICO GRADO A SIN DESNATURALIZAR		SALES ORDER (Orden de venta): SHIPPING DATE (Fecha de envío):			
LOT NUMBER: 1908238866 MANUFACTURING DATE (DD.MM.YYYY) : 23.08.2019 EXPIRATION DATE (DD.MM.YYYY) : 23.08.2021 DESCRIPCIÓN: Líquido transparente, olor característico.					
ANALYSIS	ANALISIS	UNIDADES	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
			MINIMO	MAXIMO	
Identification A	Identificación A	-	PASA	PASA	PASA
Clarity of solution	Transparencia de la solución	-	PASA	PASA	PASA
Color	Color	-	PASA	PASA	PASA
Identification B	Identificación B	-	PASA	PASA	PASA
Organic Impurities, Acetaldehyde	I. Orgánicas, Acetaldehído	µl/l	-	10	0
Organic Impurities, Benzene	I. Orgánicas, Benceno	µl/l	-	2	0
Alcoholimetric Title	Título Alcoholimétrico	%v/v	94,9	96,0	95,8
Specific Gravity (15.56°C)	Gravedad Específica a 15.56°C	-	0,812	0,816	0,813
Nonvolatile Residue	Residuo No Volátil	mg/100mL	-	2,5	0,2
Ultraviolet Abs. 240nm	Abs. Ultravioleta 240nm	ABS	-	0,400	0,200
Ultraviolet Abs. 250-260nm	Abs. Ultravioleta 250-260nm	ABS	-	0,300	0,080
Ultraviolet Abs. 270-340nm	Abs. Ultravioleta 270-340nm	ABS	-	0,100	0,015
Organic Impurities, Methanol	I. Orgánicas, Metanol	µl/l	-	0,5	0,1
Organic I. Other impurities	I. Orgánicas, Otras Impurezas	µl/l	-	300	7
Acidity	Acidez	µl/l	-	30	3
NOTA: Este producto cumple los requerimientos para Alcohol de la USP.					
			Javier Dario Díaz González Director: Calidad Alcoquímica Tel: 57 (2) 4310762 jddiaz@sucroal.com.co		

2.9. Certificado de análisis de Fructosa.

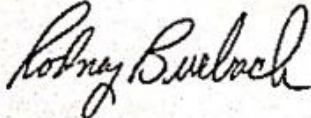
Certificate of Analysis

Product Name:
D-(+)-Glucose - $\geq 99.5\%$ (GC)

Product Number: G8270
Batch Number: SLBR5156V
Brand: SIGMA
CAS Number: 50-99-7
MDL Number: MFCD00063774
Formula: C₆H₁₂O₆
Formula Weight: 180.16 g/mol
Quality Release Date: 09 JUN 2016
Recommended Retest Date: JUN 2022



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
2 g + 15 mL, H ₂ O		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	$> 99.5\%$	100.0 %


Rodney Burbach, Manager

Activar Windows
Vé a Configuración

2.10. Certificado de análisis de Glucosa.

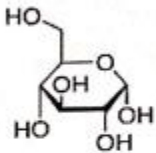
SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.es

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
D-(+)-Glucose - $\geq 99.5\%$ (GC)

Product Number: **G8270**
 Batch Number: **SLBR5156V**
 Brand: **SIGMA**
 CAS Number: **50-99-7**
 MDL Number: **MFCD00063774**
 Formula: **C₆H₁₂O₆**
 Formula Weight: **180.16 g/mol**
 Quality Release Date: **09 JUN 2016**
 Recommended Retest Date: **JUN 2022**



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
2 g + 15 mL, H ₂ O		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	$\geq 99.5\%$	100.0 %

Rodney Burbach
 Rodney Burbach, Manager

Activar W
Ve a Configu