

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



**"COMPARACION DE DOS METODOS PARA CUANTIFICAR
SACAROSA Y DETERMINACION DEL CONTENIDO DE
LA MISMA EN AZUCAR DE CONSUMO LOCAL"**

Ivette Cristina del Carmen Lima Portillo

QUIMICA FARMACEUTICA

Guatemala, Octubre de 1996

D6
06
T(1728)

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar.
Secretario	Lic. Oscar Federico Nave Herrera.
Vocal I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez.
Vocal II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán.
Vocal III	Lic. Rodrigo Herrera San José.
Vocal IV	Br. Ana Maria Rodas Cardona.
Vocal V	Br. Hayro Oswaldo García García.

DEDICO ESTE ACTO.

A DIOS:

Quién ha sido siempre el centro de mi vida y me ha guiado siempre y en todo lugar. A El todo el Honor y la Gloria.

A MIS PADRES:

Mario Lima Catalán quien desde el cielo comparte conmigo mis triunfos.

Thelma Portillo de Lima quien es merecedora mas que yo de éste triunfo, ya que es ella quien supo sembrar en mi el deseo de superación y ha sido ejemplo de lucha y fortaleza en mi vida.

A MIS HIJOS:

Mario Estuardo y Eduardo José quienes han sido y serán incentivos en la lucha diaria de mi vida y como ejemplo de lucha para sus vidas.

A MIS HERMANAS:

Janina é Ingrid Lima Portillo quienes han compartido y acompañado en todos los momentos de mi vida apoyándome incondicionalmente.

A MIS ABUELITAS:

Cristina Guzmán vda. de Portillo.

Carmen Catalán Matta.

Alicia Catalán Mata, con respeto y cariño.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

Especialmente a las familias Cabrera, Matteu, Herrera y Zelada, por apoyarme en todo momento,grácias.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	2
3.- ANTECEDENTES	3
4.- JUSTIFICACIONES	5
5.- OBJETIVOS	7
6.- HIPOTESIS	8
7.- MATERIALES Y METODOS	9
8.- RESULTADOS	13
9.- DISCUSION DE RESULTADOS	17
10.-CONCLUSIONES	19
11.-RECOMENDACION	20
12.-REFERENCIAS	21
13.-ANEXOS	22

1.- RESUMEN.

El presente trabajo presenta la comparación de dos métodos utilizados frecuentemente en el control de calidad de la industria azucarera, como lo es el método polarimétrico y el de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), en este caso aplicados a la cuantificación de sacarosa en distintas muestras de azúcar.

Para ello se utilizó un método cromatográfico para la cuantificación de sacarosa, para luego evaluar si el método es comparable ó no con el de polarimetría; se trabajó con estándares de concentraciones conocidas para determinar la precisión de ambos métodos, lo que con las pruebas y análisis estadísticos se determinó que si lo son.

En base a lo anterior se realizaron análisis de muestras de azúcar de uso común de 5 ingenios guatemaltecos, por polarimetría y HPLC, cuantificando sacarosa en cada uno de ellas, las pruebas se realizaron 3 veces para cada muestra, concluyéndose previo análisis estadístico que los 5 ingenios cumplen con los requerimientos de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXI) en cuanto a cantidad de sacarosa.

2. INTRODUCCION.

El azúcar dentro de la industria farmacéutica juega un papel muy importante, ya que es utilizada dentro de varios de los procesos de elaboración de medicamentos, con distintos fines. Tomando en cuenta dicha importancia, se plantea la presente tesis, involucrando parámetros importantes como la determinación de una metodología analítica alterna a la Polarimétrica, como la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), para realizar el análisis de sacarosa, aplicables en un laboratorio de control de calidad, realizándose un análisis comparativo entre ambas metodologías.

El método utilizado actualmente en Guatemala, es el de Polarimetría, pero con la introducción en muchas industrias de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), se hace necesario determinar el método a seguir para su utilización e implementación en el control de calidad dentro de la industria azucarera guatemalteca, tomando en cuenta las ventajas y desventajas que conlleva su implementación.

3. ANTECEDENTES.

El azúcar constituye una parte importante en la Industria Farmacéutica ya que es indispensable en la elaboración de jarabes, para ello se necesita que contenga no menos de 95% y no mas de 98% de sacarosa, según USP XXI.

- En Marzo de 1993, La International Commission for Uniform Methods of Sugar Abalysis (ICUMSA) da a conocer los métodos para unificar los criterios en los análisis para azúcar tomando en cuenta que es necesario crear métodos alternos para la cuantificación de sacarosa en azúcar. (1)

- En Mayo de 1994, S.Yamauchi, realizó el estudio "Alta Sensibilidad en la detección de Carbohidratos no Reductores por Cromatografía Líquida" en donde destaca la posibilidad de implementar éste método en análisis de azúcar rutinarios. (2)

- En Noviembre de 1994, Margaret Clarke, realiza el estudio titulado "Comparación de Métodos Tradicional y Moderno en Análisis de Azúcar" , que consistió en comparar el método tradicional de análisis como es el Polarimétrico con métodos alternos como Cromatografía Iónica, Cromatografía Gaseosa y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, destacando las ventajas y desventajas del uso de cada uno de ellos en análisis rutinarios de laboratorio. (3)

- En Octubre de 1994, Bob Trott, publicó su trabajo titulado "Polarimetría" en donde destaca la importancia del uso de dicho método en análisis de azúcar rutinarios. (4)

En Abril de 1995, D.A. Diez, realizó la investigación "Determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa en jugos de Caña de Azúcar por HPLC" , en donde describe los pasos a seguir en el análisis de jugos de caña de azúcar en análisis rutinarios de laboratorio . (5)

- En Abril de 1995, Claude Rouch, publicó "Historia de Análisis de Muestras de Jugos de Caña de Azúcar" como una recopilación de los distintos tipos de análisis que se han realizado a lo largo de los años en la industria azucarera. (6)

En Guatemala es escasa la información publicada acerca de estudios sobre el control de calidad de azúcar por polarimetría ó HPLC, siendo el único trabajo publicado la tesis de graduación siguiente:

- Araujo, B. (1993) "Perfeccionamiento del Análisis de Rutina del Pol de Bagazo de Caña (Método Polarimétrico)", describe el método polarimétrico utilizado en análisis de rutina en los ingenios azucareros, perfeccionando dicho análisis.(7)

4. JUSTIFICACIONES.

Se considera conveniente realizar ésta investigación por lo siguiente:

Durante años la industria del azúcar ha utilizado como método de referencia en cuantificación de sacarosa a la polarimetría, la cual cuantifica la sacarosa mediante la rotación neta de la luz en una solución, sumando algebraicamente la rotación de cada componente en la solución, no exactamente solo de sacarosa, mientras que en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) separa cada uno de los componentes del azúcar, cuantificándolos en forma directa. Por otro lado el método polarimétrico utiliza como reactivo acetato de plomo cuyo uso tiende a desaparecer por su toxicidad, mientras que en HPLC no se utilizan reactivos tóxicos.

Es importante para el laboratorio de control de calidad de las industrias que utilizan azúcar, contar con una metodología alterna para el control de calidad de la misma, especialmente para decisiones de compra.

En Guatemala existen 18 ingenios azucareros los cuales producen diferentes calidades de azúcar, con pequeñas variaciones en la cantidad de sacarosa presente, es importante determinar si el azúcar distribuida en Guatemala cumple ó no con las especificaciones de la farmacopea de los Estados Unidos (USP XXI), para uso en industria farmacéutica, en cuanto

a concentración de sacarosa.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General.

Contribuir a determinar qué método es mas preciso en la cuantificación de sacarosa en los diferentes tipos de azúcar producidos en Guatemala.

5.2 Objetivos Específicos.

5.2.1. Determinar una metodología analítica alterna a la polarimétrica, para realizar el análisis de sacarosa por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), realizándose un análisis comparativo de precisión entre ambas metodologías.

5.2.2. Determinar si los tipos de azúcar producidos en Guatemala cumplen con la especificación, en cuanto a concentración de sacarosa, de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXI), para su adecuada utilización en la industria.

6. HIPOTESIS.

- 6.1. La precisión y reproductibilidad analítica en la determinación de sacarosa, por cromatografía líquida de alta eficiencia es mayor que la obtenida por polarimetría.
- 6.2. La sacarosa que distribuyen los proveedores en Guatemala, cumplen con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos (Edición XXI), en cuanto a concentración de sacarosa.

7. MATERIALES Y METODOS.

7.1. UNIVERSO DE TRABAJO:

7.1.1. Metodos: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y Polarimétrico.

7.1.2. Azúcar de consumo local.

7.1.3. Estándares de sacarosa de concentraciones conocidas.

7.2. MEDIOS.

7.2.1. Recursos Humanos:

Autor: Ivette Lima Portillo.

Asesor: Lic. Luis Medrano Acevedo.

7.2.2. Recursos Materiales.

- Cromatógrafo HPLC Waters 410 Differential Refractometer.
- Polarímetro Auto Pol Modelo IIS.
- Beakers.
- Balones aforados de 200 ml.
- Jeringas.
- Embudos de Buchner.
- Erlenmeyer.
- Reactivos: Metanol.
- Agua desmineralizada filtrada.

7.3. PROCEDIMIENTO.

7.3.1. Preparación de Estándares para HPLC:

- Pesar en balanza analítica cantidades exactas de sacarosa, glucosa y fructosa.
- Diluir con agua desmineralizada y filtrada.
- Aforar a 200 ml.
- Inyectar en cromatógrafo y comparar concentraciones de sacarosa.

7.3.2. Preparación de Muestras para HPLC.

- Preparar 3 muestras de concentraciones conocidas, inyectar y comparar resultados, para esto se determinó la metodología siguiente:
- Pesar 3.90 g de azúcar.
- Disolver en agua destilada.
- Aforar a 100 ml.
- Tomar 5 ml de la solución anterior y diluir, aforando a 100 ml de nuevo.
- Inyectar en HPLC
- Observar y analizar resultados.

7.3.3. Preparación de Muestras para Polarimetría.

- Tomar 20 ml. de la solución del estándar preparada en el inciso 7.3.1. y colocarla en el polarímetro para lectura y posterior comparación.
- Tomar 20 ml. de la solución de la muestra preparada en el inciso 7.3.2. y colocarla en el polarímetro para lectura y posterior comparación.

7.4. Con todos los resultados obtenidos y conociendo exactamente la concentración de sacarosa inyectada se harán las comparaciones, para ver la precisión de cada método analítico y luego analizar los distintos tipos de azúcar que se comercializan regularmente en el mercado nacional por el método más preciso.

7.5. DISEÑO DE INVESTIGACION.

- 7.5.1. Se prepararon tres estándares de concentraciones de sacarosa conocidas (0.5064 g, 0.503 g, 0.5001g) y se hicieron 3 análisis de c/u.
- 7.5.2. Como el analito (sacarosa) comercial está en un rango $> 95\%$, la comparación se hizo solo a un peso de azúcar (0.5 g) y determinación del % de sacarosa.

7.5.3. Se trabajó un diseño de bloques con 3 repeticiones cada uno: tratamiento (2): Polarímetro y , bloques (5): muestras de 5 proveedores; respuesta: % DE SACAROSA.

7.5.4. Como es medida en % y ésta se encuentra en > 98% en las mediciones, se hizo una transformación de los datos para estimar mejor la varianza ó variabilidad, aplicando la fórmula siguiente: $\text{Arcoseno} = \text{sen} \sqrt{\frac{\%}{100}}$

7.5.5. Análisis de varianza de dos vías, de donde:

Ho: Pol = HPLC

Ho: Prov 1 = Prov 2 = Prov 3 = Prov 4 = Prov 5.

8. RESULTADOS.

8.1. PARA ESTABLECER METODO CROMATOGRAFICO: Se hicieron pruebas de ensayo y error tomando los siguientes pesos de sacarosa y dando los siguientes porcentajes.

PESO DE AZUCAR.	% DE SACAROSA
0.1761 g.	98.65
0.5150 g.	98.46
0.3526 g.	98.02
0.5064 g.	97.80
0.5039 g.	97.44
0.5001 g.	97.70
0.5015 g.	97.87
0.5040 g.	97.02
0.5035 g.	97.52

Se hizo 3 veces cada determinación con cada peso arriba indicado, siendo éstos los promedios, y tomando como peso para las pruebas 0.50 g en cada determinación.

8.2. ESTANDARES CONOCIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

[sacarosa] 0.5064 g.

	<u>POLARIMETRIA</u>	<u>HPLC</u>
Estándar 1	97.68	97.69
	97.81	97.80
	97.69	97.70

[sacarosa] 0.5039 g

Estándar 2	97.55	97.44
	97.50	97.64
	97.54	97.70

[sacarosa] 0.5001 g

Estándar 3	97.33	97.70
	97.48	97.65
	97.30	96.94

8.3. Análisis de Varianza: (Arcoseno del % de sacarosa)

<u>FUENTE</u>	<u>GL</u>	<u>SC</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>P</u>
Tratamientos	1	0.195	0.195	0.37	0.58
Bloques	2	6.081	3.040	5.77	0.02
Error	14	7.374	0.526		
Total	17				

$$H_0: \mu_{Pol} = \mu_{HPLC}$$

Ho no se rechaza ==> no existe diferencia significativa
entre los métodos.

Polarimetría : 97.54 + 0.17 CV = 0.17 %

HPLC: 97.57 + 0.26 CV = 0.26 %

CV: coeficiente de variación.

Tiende a haber más variación en HPLC.

8.4. [SACAROSA] DE DISTINTOS INGENIOS.

Ingenio A, B, C, D, E.

INGENIO A:

	<u>POLARIMETRIA.</u>	<u>HPLC</u>	<u>TEORICO</u>
Muestra 1	97.58	97.25	
Muestra 2	97.59	98.00	95-98 %
Muestra 3	97.60	98.00	

INGENIO B:

Muestra 1	97.58	97.78	
Muestra 2	97.60	97.70	95-98 %
Muestra 3	97.60	97.65	

INGENIO C:

Muestra 1	97.63	97.63	
Muestra 2	97.70	97.70	95-98%
Muestra 3	97.65	80.00	

INGENIO D:

Muestra 1	97.33	97.44	
Muestra 2	97.40	98.00	95-98 %
Muestra 3	97.30	98.00	

INGENIO E:

97.66	97.97	
97.70	98.00	95-98%
97.70	97.95	

8.5.	<u>INGENIO</u>	<u>POLARIMETRIA</u>	<u>HPLC</u>	
	(Y + S)	CV(%)	(Y+S)	CV(%)
A	97.59+0.01	0.01%	97.75+0.43	0.43%
B	97.59+0.01	0.01%	97.71+0.07	0.07%
C	97.66+0.04	0.04%	97.78+0.20	0.20%
D	97.34+0.05	0.05%	97.61+0.34	0.34%
E	97.69+0.02	0.02%	97.98+0.02	0.02%

n = 3 en cada caso.

Promedio polarimetría ($\bar{Y} + S$) = 97.584 + 0.14 (n=15)

CV = 0.14 %

Promedio HPLC ($\bar{Y} + S$) = 97.76 + 0.25 (n=15)

CV = 0.25 %

S = desviación estándar.

Los resultados tienden a ser mayores con HPLC pero presentan más variación entre ellos.

No hay diferencia significativa entre las muestras de los ingenios y todos cumplen con la concentración de sacarosa requerida en el estudio.

Para el establecimiento del método cromatográfico se realizaron pruebas de ensayo y error que pueden servir como base para una validación del método utilizado, la cual sería una nueva investigación.

Las gráficas de estándares, que se presentan en anexos, a diferentes concentraciones, con los estándares 1, 2 y 3 muestran las variaciones en los porcentajes de sacarosa determinados por polarimetría y HPLC, observándose que HPLC presenta mayor porcentaje, siendo una diferencia mínima entre ellas ya que es la misma concentración inicial en las dos determinaciones.

Las gráficas 4,5,6,7 y 8 muestran el porcentaje de sacarosa de las muestras de azúcar de los distintos ingenios, observándose que generalmente es mayor la cantidad precisada ó determinada por HPLC, siendo la variación mínima ya que es la misma muestra en las dos determinaciones.

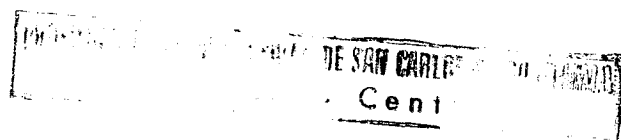
La gráfica 9 (Caja de Tuckey), presenta las diferencias en las distribuciones de los valores en los métodos utilizados para el estudio, observándose que en polarimetría la distribución es más uniforme que en HPLC, que presenta valores mas altos pero con mas variación, por lo que habría que hacer mas estudios para su validación é implementación en análisis rutinarios de laboratorio.

10. CONCLUSIONES.

- 10.1. Los métodos Polarimétrico y Cromatografía Líquida de alta eficiencia son comparables.
- 10.2. El método HPLC presentó resultados más altos que con el método Polarimétrico.
- 10.3. El método Polarimétrico presentó resultados más bajos, pero con menos variación unos de otros.
- 10.4. El azúcar de los distintos ingenios guatemaltecos cumplen con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXI) en cuanto a concentración de sacarosa.

11. RECOMENDACION.

Que se implemente el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en los laboratorios que analizan saca rosa, tomando en cuenta los buenos resultados obtenidos en ésta investigación.



12. REFERENCIAS.

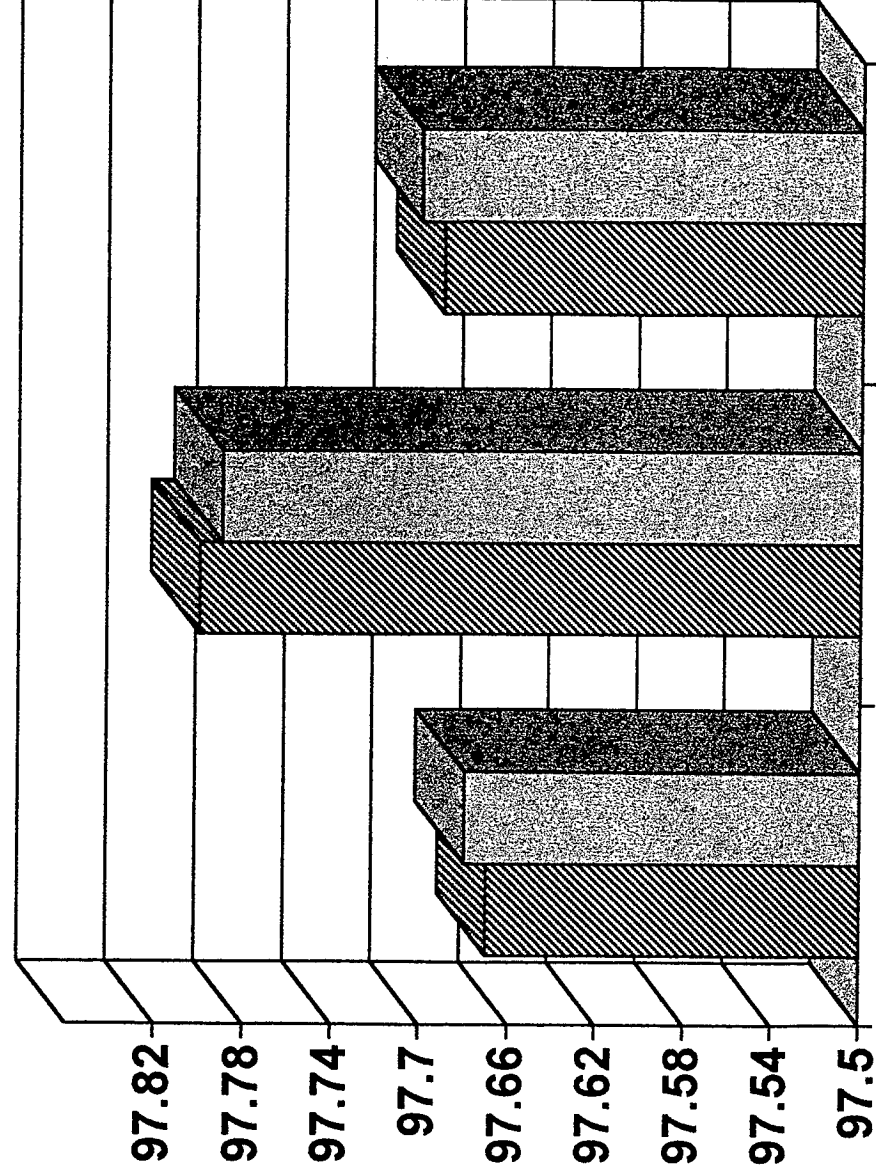
- 12.1. ICUMSA. Methods Book. International Sugar Journal. Vol XCVII, March 1993. Latin American Edition. (pp 134).
- 12.2. Yamauchi C. Higly Sensitive Detection of Non reducing carbohydrates by liquid chromatography. U.S.A. 1994. International Sugar Journal. Vol 96 pp (15 A).
- 12.3. Sharon V. Margaret Clark. "Comparison of Modern and Traditional methods of sugar analysis". U.S.A. 1994. International Sugar Journal. Vol 96. (pp 437-445).
- 12.4. Middleton AW. Determination of Sucrose and Glucose by HPLC using immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detector. U.S.A. 1995. International Sugar Journal. Vol 97. pp (87).
- 12.5. O.A. Diez. Determination of Sucrose, glucose and fructose in sugar cane juice by HPLC. U.S.A. 1995. International Sugar Journal. Vol 97. pp (283).
- 12.6. Claude Roush. Storage and analysis of cane juice samples. U.S.A. 1995. International Sugar Journal. Vol 97. pp (154-159).

ANEXOS

GRAFICA No. 1

ESTANDARES CONOCIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES

SACAROSA = 0.5064 g



DETERMINACIONES CON ESTANDAR 1

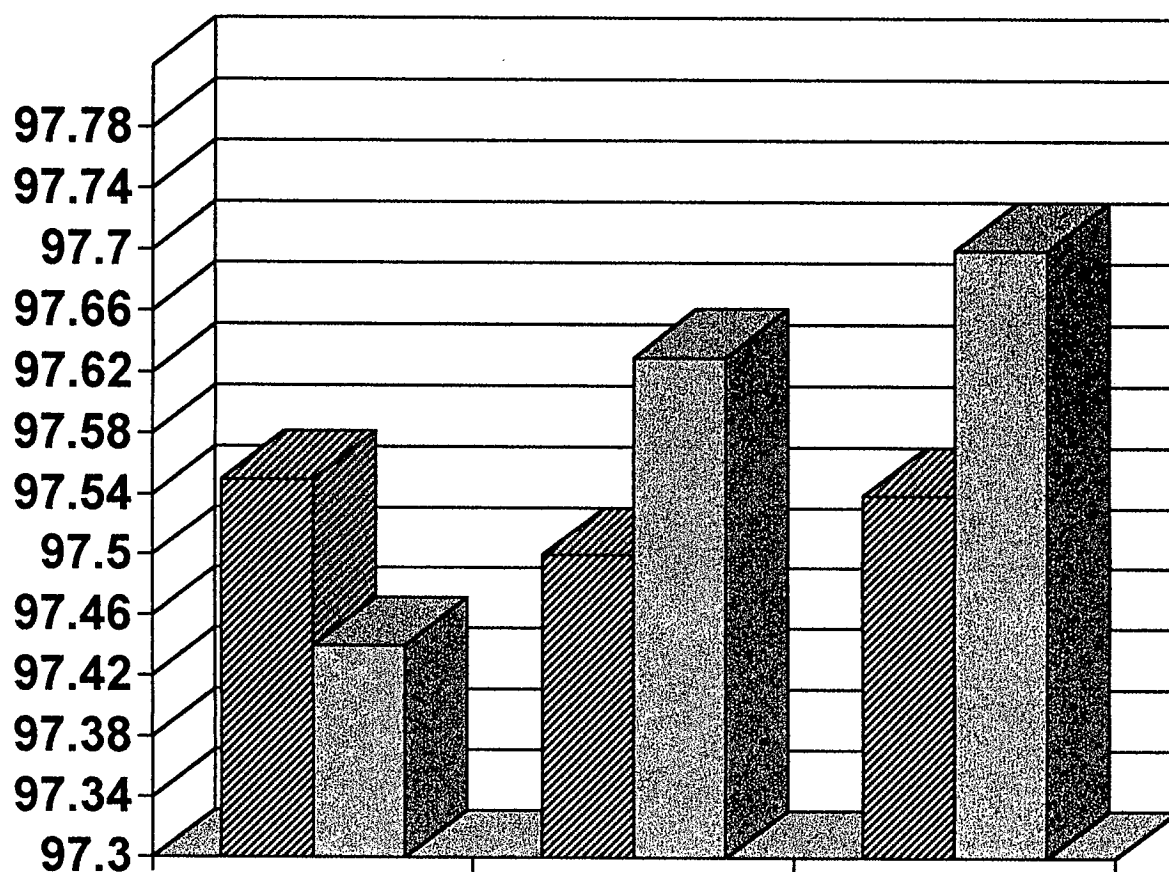
▨ Polarimetría

■ HPLC

GRAFICA No. 2

ESTANDARES CONOCIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES

SACAROSA = 0.5039 g



DETERMINACIONES CON ESTANDAR 2

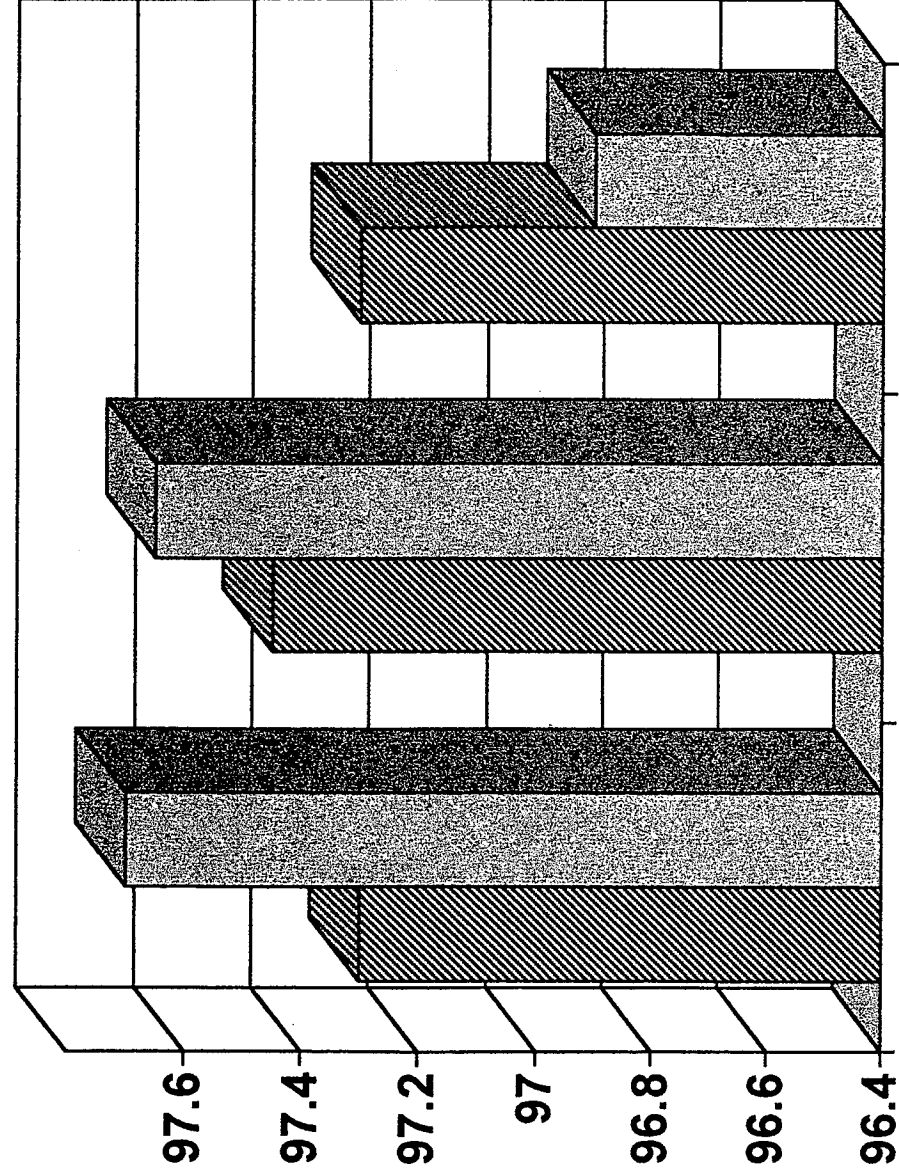
▨ Polarimetría

▣ HPLC

GRAFICA No. 3

ESTANDARES CONOCIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES

SACAROSA = 0.5001 g



DETERMINACIONES CON ESTANDAR 3

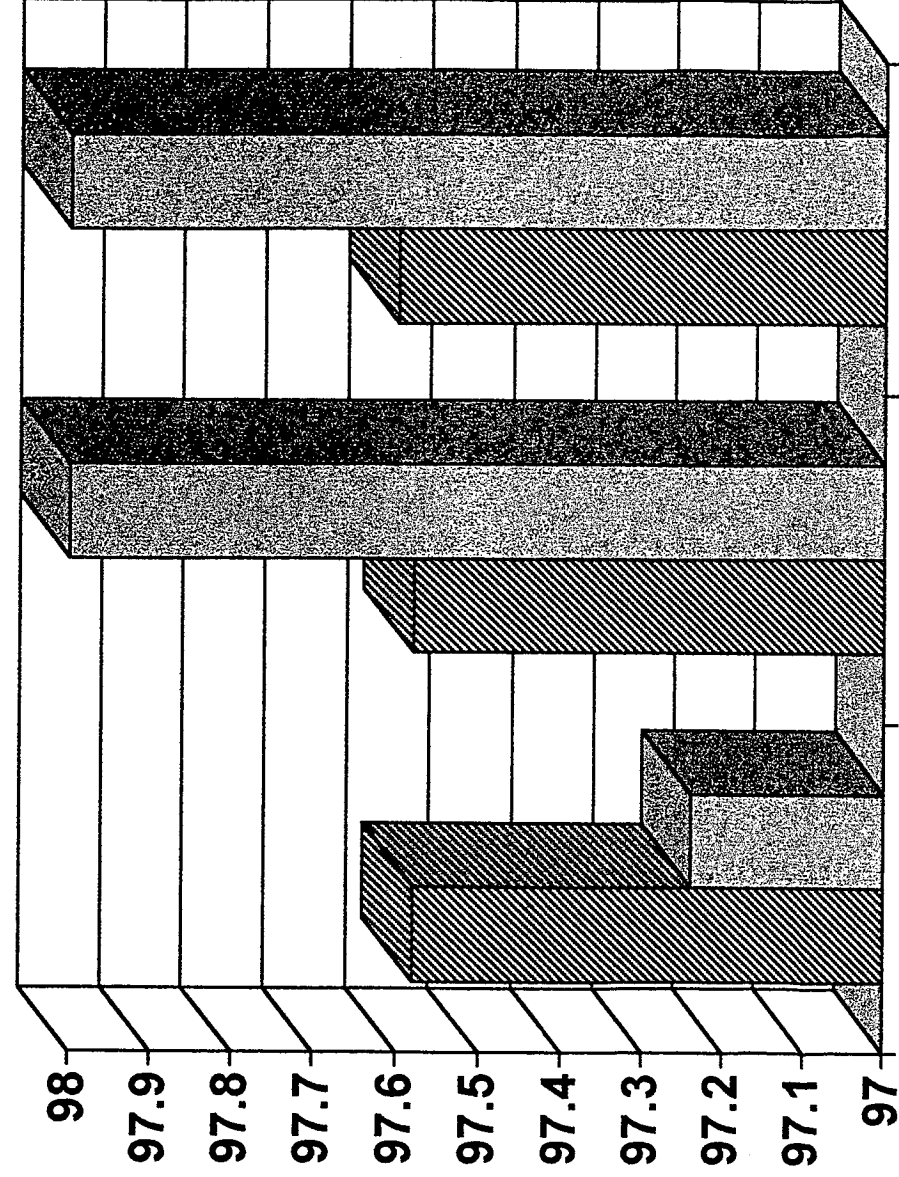
▨ Polarimetría

■ HPLC

GRAFICA No. 4

CONCENTRACION SACAROSA

INGENIO "A"



DETERMINACIONES

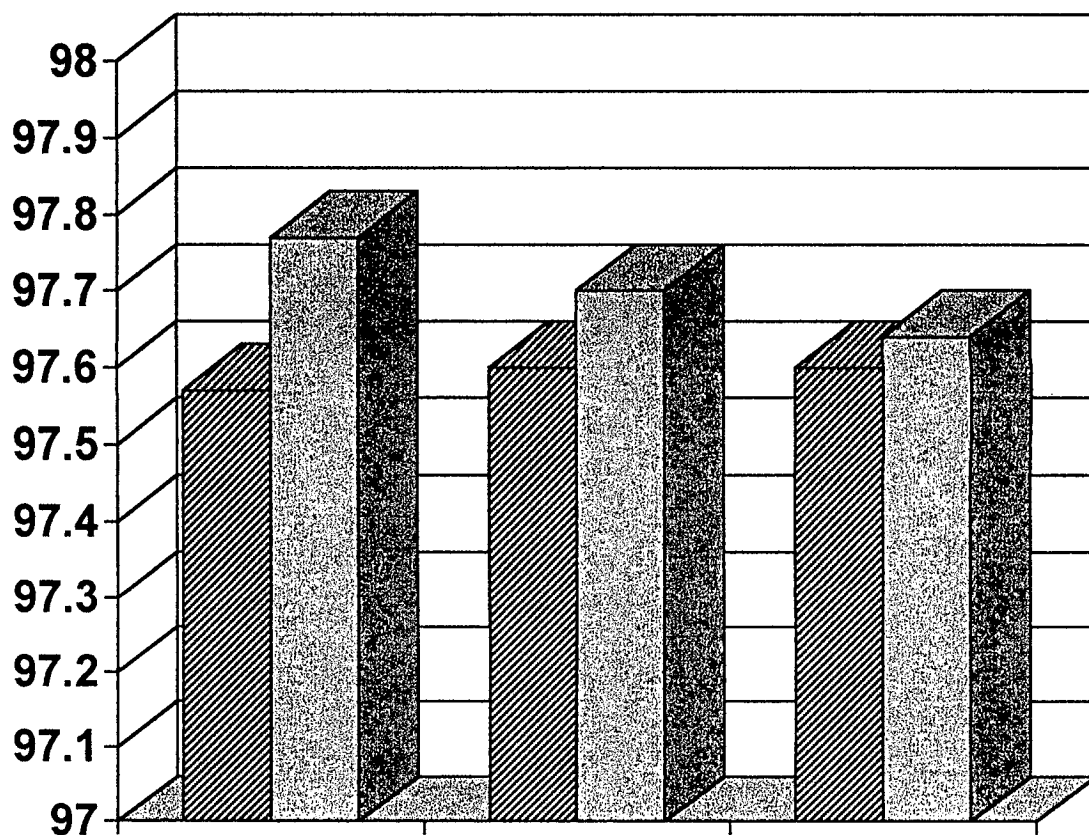
▨ Polarimetría

▨ HPLC

GRAFICA No. 5

CONCENTRACION SACAROSA

INGENIO "B"



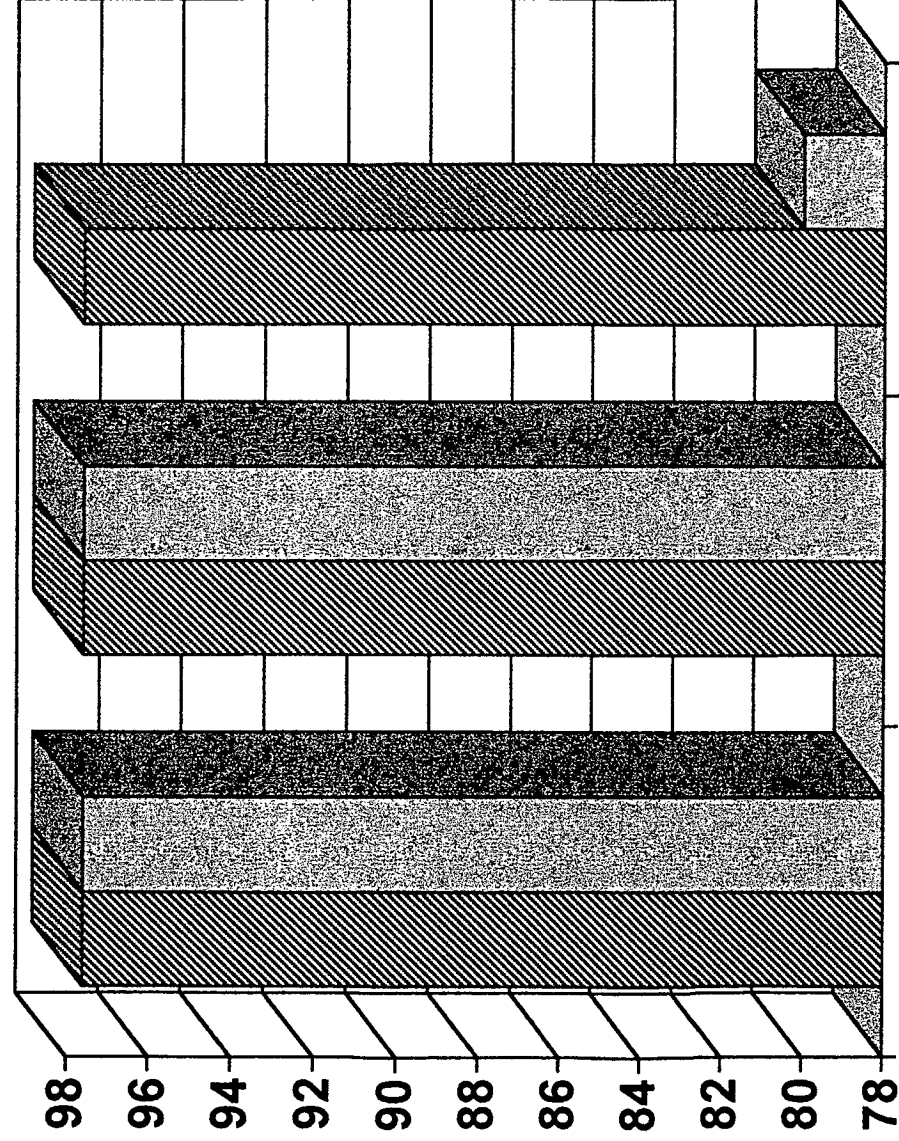
DETERMINACIONES

▨ Polarimetría

▩ HPLC

GRAFICA No. 6
**CONCENTRACION
SACAROSA**

INGENIO "C"



DETERMINACIONES

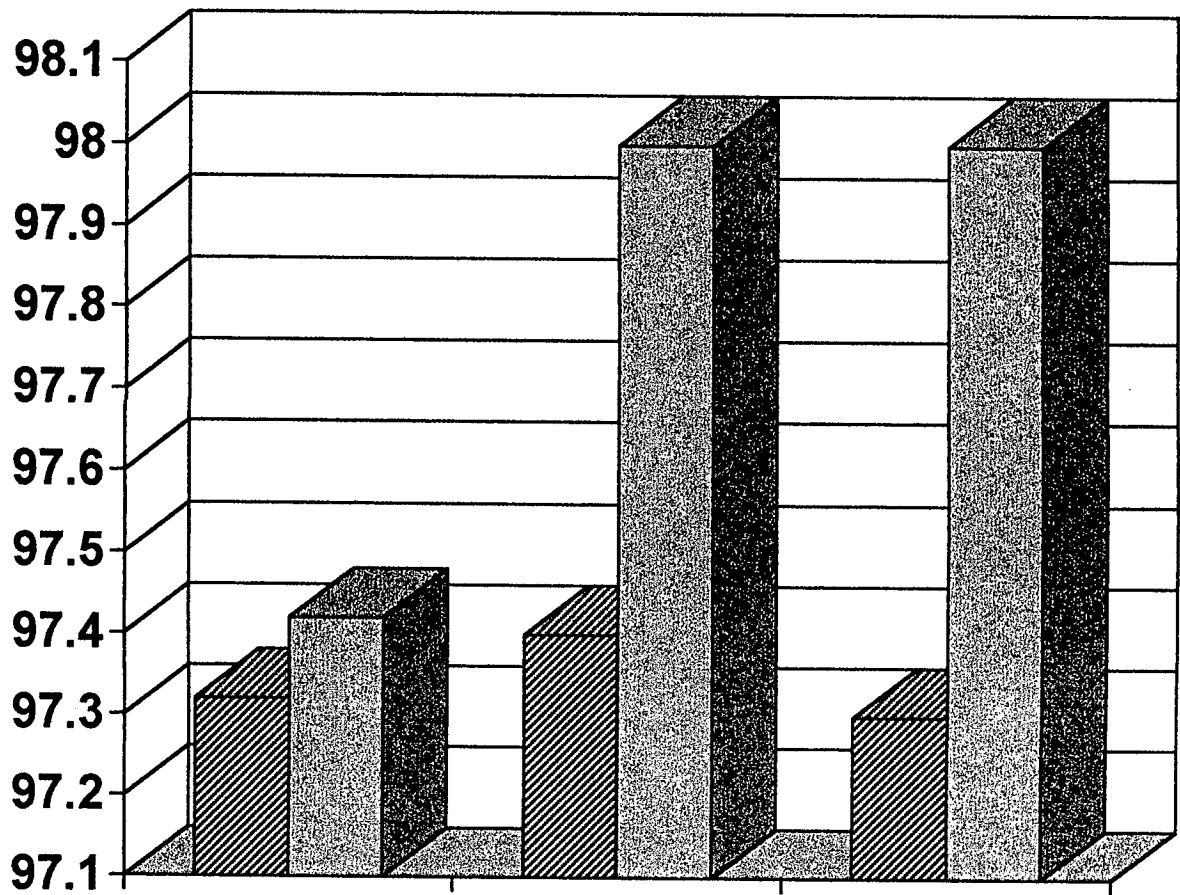
▨ Polarimetría

▩ HPLC

GRAFICA No. 7

CONCENTRACION SACAROSA

INGENIO "D"



DETERMINACIONES

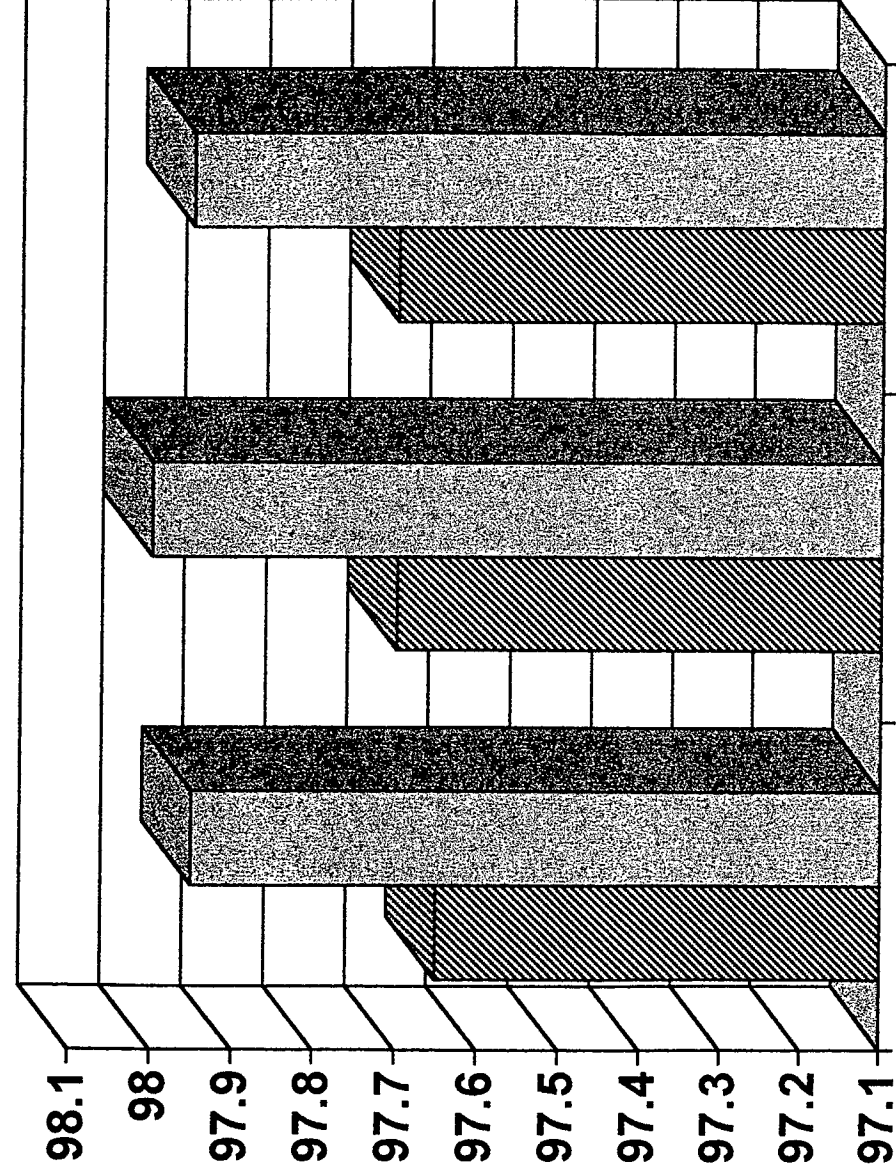
▨ Polarimetría

■ HPLC

GRAFICA No. 8

CONCENTRACION SACAROSA

INGENIO "E"



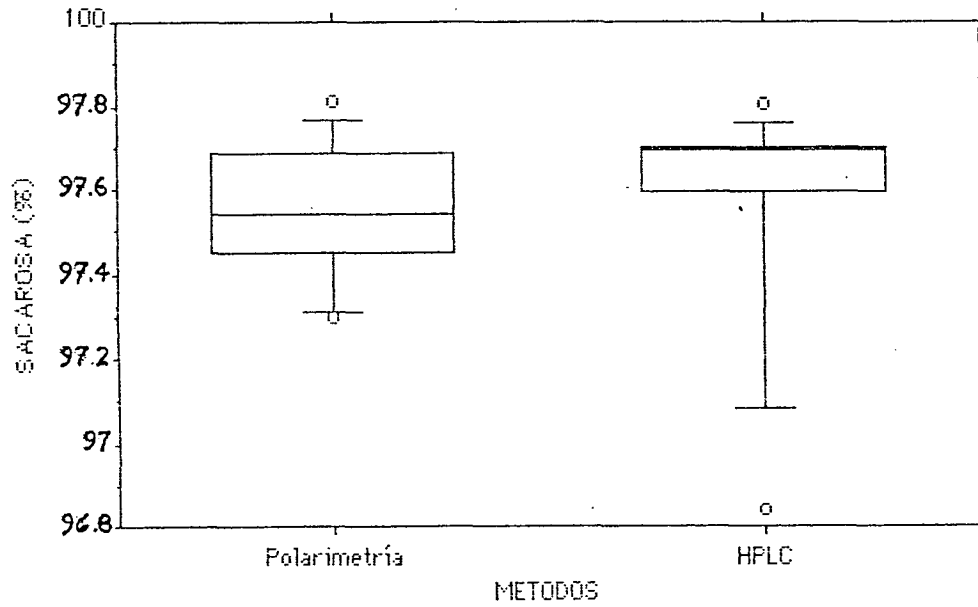
DETERMINACIONES

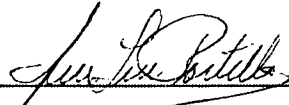
▨ Polarimetría

▨ HPLC

GRAFICA No 9.

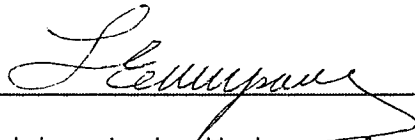
COMPARACION DE METODOS PARA DETERMINAR % DE SACAROSA UTILIZANDO ESTANDARES DE CONCENTRACION CONOCIDA





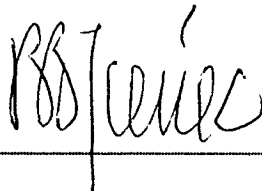
Ivette Cristina del Carmen Lima Portillo.

Autora.



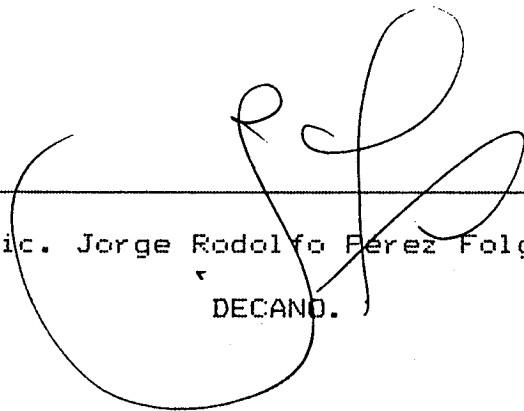
Lic. Luis Medrano Acevedo.

Asesor.



Lic. Beatriz Batres de Jimenez.

Directora de Escuela.



Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar.

DECANO.