

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

COMPARACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DE DOS METODOS
PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES EN EL
JUGO DE CAÑA DE AZUCAR



QUIMICO FARMACEUTICO

GUATEMALA , MARZO DEL 2,000

D2
06
+ (2066)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CC. QQ. Y FARMACIA

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A quien dedico este acto por ser siempre mi fortaleza en todo momento y permitirme alcanzar esta meta.

A LA VIRGEN MARIA

Por ser la dulce madre que guía mi camino.

A MIS PADRES

Zoila Luz Molina Santos de Figueroa
Héctor René Figueroa Pinzón
Mil gracias por su amor, apoyo y motivación para culminar esta carrera que es el mejor regalo que me pudieron heredar.

A MIS HERMANOS

Guillermo y Danny
Por su cariño y apoyo

A MIS SOBRINOS

Jorge Eduardo y Christopher
Por ser la ternura y alegría de mi vida.

A MIS CUÑADAS

Yolanda y Rosangela
Por su amistad y consejos.

A MI NOVIO

Gracias por su amor, apoyo incondicional y por ocupar un lugar tan especial en mi corazón.

A MIS ABUELITOS

Juan Molina, por ser un ejemplo a seguir y a los que fallecieron recuerdos con cariño.

A MIS TIOS Y PRIMOS

A todos y cada uno de ellos, gracias por su cariño apoyo y amistad.

A MIS AMIGOS Y
AMIGAS

Un cariño especial y a cada uno de ellos éxitos en el futuro.

AGRADECIMIENTOS A

DRA. ANA LUCIA VALLE

Por su amistad, así como colaboración en la revisión de este trabajo de tesis.

LIC. HUGO ESCOBAR

Por su dedicación y asesoría en la realización del presente trabajo de tesis.

**A TODOS Y CADA UNO
DE MIS CATEDRATICOS**

Por transmitirme sus conocimientos a lo largo de mi formación profesional.

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACION	6
5. OBJETIVOS	7
6. HIPOTESIS	8
7. MATERIALES Y METODOS	9
8. RESULTADOS	17
9. DISCUSION DE RESULTADOS	26
10. CONCLUSIONES	30
11. RECOMENDACIONES	31
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	32
13. ANEXOS	34

1. RESUMEN

El presente trabajo de tesis comparó cuantitativamente la reproducibilidad de dos métodos de análisis utilizados por el laboratorio de control de calidad de un ingenio azucarero, para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en el jugo de caña de azúcar que ingresa al ingenio.

Los métodos analíticos estudiados fueron: el método volumétrico de Fehling que es el método de rutina utilizado por los 17 laboratorios de los ingenios de Guatemala y el método de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) que es utilizado como método de referencia únicamente por los laboratorios de los ingenios azucareros que poseen este equipo. Para realizar este estudio se analizaron por duplicado 20 muestras de jugo de caña por cada método analítico.

En base a los datos obtenidos se determinó la precisión y reproducibilidad analítica de ambos métodos y se utilizó el coeficiente de concordancia (r_c) para compararlos.

Al comparar los valores de los coeficientes de concordancia de los dos métodos analíticos, se observó que ambos métodos son reproducibles; sin embargo el método HPLC tiene mayor reproducibilidad en comparación al método Fehling por tener un coeficiente de concordancia mayor. Respecto a las varianzas obtenidas por ambos métodos, el menor valor de varianza que posee el método HPLC lo hace más preciso en la obtención de datos analíticos que el método Fehling.

El análisis de la relación costo/beneficio comparativo entre los métodos analíticos indica que un análisis por HPLC representa Q 60.00 más en costo que un análisis por el método de Fehling. Este factor de costo influye bastante para que los 17 ingenios azucareros de Guatemala utilicen actualmente el método Fehling y que los ingenios que poseen equipo de HPLC lo utilicen únicamente como método de referencia.

2. INTRODUCCION

La agroindustria azucarera es una de las industrias más grandes en Guatemala, existiendo actualmente 17 ingenios azucareros localizados en su mayoría en la costa sur del país.

La materia prima utilizada para la producción de azúcar es la caña de azúcar. El laboratorio de control de calidad del ingenio azucarero es el encargado de analizar la calidad de caña que está ingresando para su procesamiento. Dentro de estos análisis realizados presenta gran importancia la determinación de azúcares reductores presentes en el jugo de caña, que son compuestos orgánicos principalmente glucosa y fructosa, los cuales durante el proceso de fabricación de azúcar provocan pérdidas de azúcar por descomposición de la sacarosa en glucosa y fructosa disminuyendo el rendimiento en la cantidad de azúcar obtenido. (1)

El análisis de azúcares reductores en jugo de caña es utilizado para determinar la calidad de caña suministrada. Durante muchos años el laboratorio de control de calidad del ingenio azucarero ha utilizado el método Fehling para el análisis de azúcares reductores en jugo de caña (2). Debido a que es importante que los laboratorios cuenten con una metodología alterna de análisis, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) parece ser una alternativa de gran precisión. Es por ello que a través de la realización del presente trabajo de tesis se comparará la reproducibilidad y la precisión analítica de estos dos métodos de análisis en la determinación de azúcares reductores en el jugo de caña de azúcar, tomando como referencia para límites aceptables de contenido de azúcares reductores valores de 0 a 1.0 %.

3. ANTECEDENTES

La determinación de azúcares reductores en el jugo de la caña de azúcar es uno de los análisis rutinarios que los laboratorios de control de calidad de los ingenios azucareros realizan en la caña utilizada como materia prima en la producción de azúcar.

Actualmente se conoce la importancia que este análisis presenta, pues los azúcares reductores producen cuantiosas pérdidas en la fabricación de azúcar, debido a que en el proceso disminuyen la recuperación de azúcar por la formación en mayor proporción de miel final, que es un subproducto que posee un precio de venta mucho menor que el azúcar y que se utiliza industrialmente para la obtención de alcohol etílico (1). El método utilizado para su determinación en jugo de caña es el método volumétrico de FEHLING, sin embargo pocos ingenios que poseen el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizan este equipo para determinar azúcares reductores y comparar el valor obtenido por HPLC con el obtenido por el método FEHLING. (3)

A la fecha no se conocen resultados acerca de la precisión y reproducibilidad del método HPLC comparado con el método FEHLING.

De los antecedentes conocidos respecto a investigación sobre métodos de análisis de azúcares reductores en el jugo de caña de azúcar en Guatemala, el Manual de Análisis de Rutina para los Laboratorios Azucareros de Guatemala, elaborado en el año de 1993 por la Comisión para la Unificación de Métodos del Laboratorio Azucarero (CUMLA), es uno de los pocos documentos en los que se encuentra información los métodos analíticos utilizados por los laboratorios azucareros de Guatemala, en el análisis de azúcares reductores en jugos de caña por el método de FEHLING. (3)

Este estudio indica la alta sensibilidad en la detección de carbohidratos reductores por medio de cromatografía líquida, basado en la alta capacidad de separación de los componentes y su cuantificación, utilizando muestras pequeñas y brindando resultados en un tiempo corto.

- d) 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. (7)

Este estudio acerca del uso de HPLC en la determinación de sacarosa y glucosa, utilizando reactivos inmovilizadores de enzimas y un detector de luminiscencia química, es una técnica nueva que se plantea para la cuantificación de estos carbohidratos en jugos de caña, pero los resultados obtenidos no son tan precisos, como los obtenidos en el HPLC convencional que utilizan los laboratorios azucareros que poseen como detector un refractómetro en lugar de un detector de luminiscencia química.

4. JUSTIFICACION

El análisis de los azúcares reductores glucosa y fructosa presentes en el jugo de la caña, es utilizado como un parámetro para determinar la calidad de la caña que ingresa a un ingenio azucarero.

El método actual utilizado por los laboratorios de los 17 ingenios azucareros de Guatemala para realizar este análisis, es el de Fehling . Debido a que es importante que los laboratorios posean un método alternativo de análisis , en el presente trabajo de tesis se comparó como alternativa la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) con el método de Fehling , para determinar la precisión y reproducibilidad analítica, en análisis de azúcares reductores presentes en el jugo de caña.

En base a los resultados que se obtuvieron se establece una relación costo/beneficio, en el aspecto económico, tiempo, recurso humano, materiales utilizados, equipo. Con el propósito de proponer el método analítico que tenga una relación de beneficio mayor para los laboratorios de la agroindustria azucarera guatemalteca.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir a establecer qué método es más reproducible en la determinación de azúcares reductores presentes en el jugo de caña de azúcar cultivada en Guatemala.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Determinar una metodología analítica alternativa al método de Fehling, para realizar el análisis de azúcares reductores por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), realizando un análisis comparativo de reproducibilidad entre ambas metodologías.

5.2.2 Contribuir, a través de este estudio, a la optimización del control de calidad químico en la determinación de azúcares reductores mediante el método de Fehling y el de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), tomando como base los resultados analíticos obtenidos y la relación costo/beneficio de cada método.

6. HIPOTESIS

La reproducibilidad analítica en la determinación de azúcares reductores, por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) es mayor que la obtenida por el método de Fehling.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

- 7.1.1 Métodos: volumétrico de Fehling y cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). (3)
- 7.1.2 Jugos de caña de azúcar.
- 7.1.3 Estándares de concentraciones conocidas, sacarosa 0.80 ppm (partes por millón), glucosa 0.040 ppm, fructosa 0.040 ppm.

7.2 MEDIOS:

7.2.1 Recursos Humanos:

Autor: Br. Mildred Xiomara Figueroa M.

Asesor: Lic. Hugo Giovanni Escobar M.

7.2.2 Recursos Materiales:

- Instalaciones y equipo del laboratorio de Control de Calidad del ingenio azucarero.
- Cromatógrafo HPLC Waters 410 refractómetro diferencial.
- Beakers de 250 mL
- Balones aforados de 200 mL
- Jeringas
- Erlenmeyer
- Agua desmineralizada filtrada
- Agua destilada
- Balanza analítica

- Reactivos: solución de subacetato de plomo, solución de mezcla de oxalato y fosfato, azul de metileno, soluciones de glucosa-fructosa a diferente concentración, solución de tartrato de sodio y potasio, solución de sulfato de cobre.
- Agua desmineralizada
- Estufa magnética
- Papel filtro calibre 67

7.3 PROCEDIMIENTO:

7.3.1 Técnica por método de Fehling. (3)

- Se pesan 40 gramos de la muestra de jugo de caña y se transfieren a un balón de aforo de 200 mL.
- Agregar cinco mililitros de solución de subacetato de plomo líquido 54.3 grados brix y cinco mililitros de solución de mezcla de oxalato y fosfato, luego aforar a 200 mL con agua destilada. (volumen aforo)
- Se filtra esta solución utilizando papel filtro calibre 67.
- El filtrado obtenido, se transfiere a una bureta de 50 mL.
- Por aparte, se prepara en un erlenmeyer una mezcla de 5 mL de solución de sulfato de cobre (solución A) y 5 mL de solución de tartrato de sodio y potasio (solución B) con 25 mL de agua destilada se pone a calentar esta mezcla, en una estufa magnética y se adicionan unos 10 a 15 mL de la solución contenida en la bureta.
- Se continúa calentando el erlenmeyer y se deja hervir de 2 a 3 minutos para eliminar el oxígeno disuelto posteriormente, se le agregan 3 gotas de azul de metileno al 1%.
- Después de agregar el azul de metileno al 1% esperar por un minuto, luego se le sigue adicionando la solución contenida en la bureta, hasta que la solución contenida en el erlenmeyer tome un color ladrillo. Se anotan los mililitros consumidos en la bureta.

Procedimiento de cálculo:

$$\% \text{ azúcares reductores} = \frac{\text{Factor Fehling} * \text{volumen aforo}}{\text{Masa muestra} * \text{mL gastados bureta}} * 100$$

7.3.1.1 Determinación del Factor Fehling (3)

Para realizar la determinación de azúcares reductores en el jugo de caña por el método del Fehling, se necesita determinar el factor de Fehling el cual se utiliza en el cálculo del % de azúcares reductores. Para esto se requiere de una solución "A" (solución de sulfato de cobre), una solución "B" (solución de hidróxido de sodio y sal de Rochelle), una solución etanólica de azul de metileno al 1.0 %, una solución de glucosa al 0.2% (glucosa anhidra).

- a) Se miden 5 mL de solución "A", 5 mL de solución "B", y 25 mL de agua desmineralizada, los que se transfieren a un erlenmeyer de vidrio de 250 mL.
- b) En una bureta de 50 mL se coloca la solución de glucosa 0.2%.
- c) Se procede a calentar el erlenmeyer con las soluciones "A" y "B", adicionar 20 mL de la solución de glucosa contenida en la bureta.
- d) Se continúa calentando el erlenmeyer, se deja hervir por 2-3 minutos para eliminar el oxígeno disuelto, luego agregar 03 gotas de solución azul de metileno al 1.0%.
- e) Pasado un minuto después de agregarle el azul de metileno se le continúa gregando la solución de glucosa contenida en la bureta hasta que la solución del erlenmeyer tome un color ladrillo. Anotar los mililitros gastados de la solución de glucosa.

Cálculo:

$$\text{Factor de Fehling} = (\text{mL gastados de glucosa} / 100) * 0.20$$

7.3.2 Técnica por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

7.3.2.1 Preparación de estándares para HPLC:

- Pesar en balanza analítica 0.200 mg de sacarosa, 0.100 mg de glucosa y 0.100 mg de fructosa.
- Transferir a un balón aforado de 100 mL (por separado) agregar 25 mL de agua desmineralizada y filtrada.
- Aforar a 20°C, agitar para homogenizar. (aforo 1)
- Medir con una pipeta volumétrica, 40 mL de solución de sacarosa, 4 mL de solución de glucosa y 4 mL de solución de fructosa.
- Transferir a un balón aforado de 100 mL, aforar a 20°C con agua desmineralizada y filtrada, agitar la solución para homogenizar (aforo 2).
- Inyectar en cromatógrafo y comparar concentraciones de glucosa y fructosa.

Cálculo para determinar ppm de los estándares:

$$\frac{\text{Masa de estándar}}{\text{mL aforo 1}} * \frac{\text{mL dilución}}{\text{mL aforo 2}} * 1000 = \text{ppm}$$

La exactitud y precisión de los estándares es de 99.99%, cuentan con un certificado de garantía y son de grado analítico puro, calidad Merck. Además el equipo se autocalibra con la inyección de estándares. Los cuales se inyectan por cada 10 muestras de jugo analizadas por el HPLC.

7.3.2.2 Preparación de muestras para HPLC

- Pesar 0.50 g de jugo de caña en un balón aforado de 100 mL utilizando la balanza analítica.
- Aforar a 100 ml con agua destilada, a 20°C. (aforo HPLC)
- Agitar la solución para homogenizarla.
- Vertirla en un tubo de ensayo con tapón roscado, enjuagar y descartar, repetir un par de veces, este procedimiento de lavado.
- Llenar el tubo, taparlo bien y meterlo al refrigerador a 4°C para evitar el deterioro.
- Inyectar en HPLC. Para inyectar las diferentes muestras, estas tienen que estar a temperatura ambiente y debe hacerse pasar por un filtro con poro de 0.45 micrómetros.
- El cromatograma proporciona datos de glucosa y fructosa.
- Observar y analizar resultados.

Cálculo de % de azúcares reductores en la muestra analizada por HPLC, en base al cromatograma obtenido:

$$\% \text{ de azúcares reductores} = \frac{(\text{ppm glucosa} + \text{ppm fructosa}) * \text{ml aforo HPLC}}{10,000 * \text{masa de muestra}}$$

ppm glucosa= dato obtenido del cromatograma

ppm fructosa= dato obtenido del cromatograma

ml aforo HPLC= 100 ml

masa de muestra= masa de la muestra utilizada (gramos)

factor de dilución de la muestra = 10,000

- 7.3.3 Se probó la exactitud y precisión del equipo HPLC, realizando por duplicado el análisis para cada muestra.
- 7.3.4 Con todos los resultados obtenidos para los dos métodos analíticos, se realizaron las comparaciones para determinar la reproducibilidad de de cada método.
- 7.3.5 Para comparar los dos métodos analíticos estudiados, se elaboraron 10 soluciones patrón de azúcares reductores a concentraciones conocidas en el rango de 0.1% a 1%. Estas diez soluciones patrón se analizaron en duplicado por los métodos HPLC y Fehling, se realizaron gráficas con el valor conocido de las soluciones patrón (eje x) y los resultados promedio obtenidos por cada método (eje y). En base a esto se determinó una ecuación de regresión para cada método analítico, la ecuación que presentó mayor coeficiente de regresión lineal corresponde al método que es más reproducible en el análisis de soluciones patrón de azúcares reductores.

7.4 DISEÑO DE INVESTIGACION

7.4.1 Diseño Experimental

Se analizaron por el método volumétrico de Fehling y cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), 20 diferentes jugos de caña de azúcar seleccionados de manera sistemática, para la determinación individual de los azúcares reductores (AR's) presentes en el jugo. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado en los dos métodos.

7.4.2 Análisis Estadístico

Primera parte:

Para evaluar la reproducibilidad de cada método se determinó el coeficiente de concordancia (r_c) para cada uno de la siguiente manera:

Método de Fehling

No. de muestra	(AR's) Ensayo 1	(AR's) Ensayo 2
1	X ₁₁	X ₁₂
2	X ₂₁	X ₂₂
3	X ₃₁	X ₃₂
...		
20	X ₂₀₁	X ₂₀₂

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}}{S_1^2 + S_2^2 + (x_1 - x_2)^2}$$

S_1 = desviación estándar del ensayo 1,

S_2 = desviación estándar del ensayo 2

x_1 = media del ensayo 1

x_2 = media del ensayo 2

Un valor de coeficiente de concordancia mayor de 0.70 es aceptable e indica que el método es reproducible.

Método de HPLC

No. de muestra	(AR's) Ensayo 1	(AR's) Ensayo 2
1	Y ₁₁	Y ₁₂
2	Y ₂₁	Y ₂₂
3	Y ₃₁	Y ₃₂
.		
.		
20	Y ₂₀₁	Y ₂₀₂

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}}{S_1^2 + S_2^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

S₁ = desviación estándar del ensayo 1,

S₂ = desviación estándar del ensayo 2

y₁ = media del ensayo 1

y₂ = media del ensayo 2

Un valor de coeficiente de concordancia mayor de 0.70 es aceptable e indica que el método es reproducible.

Segunda parte:

Para realizar una comparación entre los dos métodos analíticos utilizados se utilizaron los coeficientes de concordancia (r_c) obtenidos para cada método en la primera parte del análisis estadístico.

HPLC --- FEHLING

r_c HPLC = r_c FEHLING =

El método que tenga el coeficiente de concordancia más alto es el más reproducible.

8. RESULTADOS

8.1 MÉTODO FELHING

Se analizaron por el método volumétrico de FEHLING, 20 diferentes jugos de caña de azúcar para la determinación de los azúcares reductores (AR's) presentes en el jugo. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.

8.2 MÉTODO HPLC

Se analizaron por el método de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), 20 jugos de caña de azúcar previamente analizados por el método FELHING, para la determinación de los azúcares reductores (AR's) presentes en el jugo. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.

RESULTADOS MÉTODO DE FEHLING

Numero de muestra de análisis	Azúcares reductores % Ensayo 1	Azúcares reductores % Ensayo 2
1	0.89	0.80
2	0.65	0.70
3	0.93	0.85
4	0.69	0.75
5	0.74	0.80
6	1.11	1.00
7	0.76	0.70
8	1.26	1.32
9	0.64	0.58
10	1.02	1.06
11	0.67	0.72
12	1.59	1.50
13	1.09	1.17
14	1.63	1.50
15	0.75	0.78
16	0.56	0.50
17	0.98	1.04
18	0.49	0.47
19	0.86	0.81
20	0.68	0.74

Cálculo Coeficiente de Concordancia

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}}{S_1^2 + S_2^2 + (x_1 - x_2)^2}$$

S_1 = desviación estándar del ensayo 1,

S_2 = desviación estándar del ensayo 2

S_1^2 = varianza del ensayo 1

S_2^2 = varianza del ensayo 2

x_1 = media del ensayo 1

x_2 = media del ensayo 2

Datos obtenidos:

$S_1 = 0.3057$, desviación estándar del ensayo 1

$S_2 = 0.2894$, desviación estándar del ensayo 2

$S_1^2 = 0.0935$, varianza del ensayo 1

$S_2^2 = 0.084$, varianza del ensayo 2

$x_1 = 0.8995$, media del ensayo 1

$x_2 = 0.8895$, media del ensayo 2

En base a los datos obtenidos del análisis estadístico de los resultados analíticos se calcula el coeficiente de concordancia (r_c).

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = \frac{(0.3057)^2 + (0.2894)^2 - (0.3057 - 0.2894)}{(0.3057)^2 + (0.2894)^2 + (0.8895 - 0.8995)^2}$$

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = 0.908$$

RESULTADOS MÉTODO DE HPLC

Numero de muestra de análisis	Azúcares reductores % Ensayo 1	Azúcares reductores % Ensayo 2
1	0.81	0.80
2	0.51	0.51
3	0.83	0.80
4	0.55	0.54
5	0.78	0.78
6	1.05	1.04
7	0.56	0.56
8	0.96	0.94
9	0.45	0.45
10	0.95	0.94
11	0.42	0.40
12	1.12	1.05
13	0.86	0.80
14	1.56	1.52
15	0.53	0.56
16	0.41	0.45
17	0.92	0.88
18	0.64	0.62
19	0.61	0.61
20	0.66	0.70

Cálculo Coeficiente de Concordancia

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}}{S_1^2 + S_2^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

S_1 = desviación estándar del ensayo 1,

S_2 = desviación estándar del ensayo 2

S_1^2 = varianza del ensayo 1

S_2^2 = varianza del ensayo 2

y_1 = media del ensayo 1

y_2 = media del ensayo 2

Datos obtenidos:

$S_1 = 0.2787$, desviación estándar del ensayo 1

$S_2 = 0.2767$, desviación estándar del ensayo 2

$S_1^2 = 0.0780$, varianza del ensayo 1

$S_2^2 = 0.0766$, varianza del ensayo 2

$y_1 = 0.7950$, media del ensayo 1

$y_2 = 0.7525$, media del ensayo 2

En base a los datos obtenidos del análisis estadístico de los resultados analíticos se calcula el coeficiente de concordancia (r_c).

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = \frac{(0.2787)^2 + (0.2767)^2 - (0.2787 - 0.2767)}{(0.2787)^2 + (0.2767)^2 + (0.7950 - 0.7525)^2}$$

$$\text{Coeficiente de concordancia } (r_c) = 0.98$$

COMPARACION ENTRE LOS METODOS ANALITICOS FEHLING Y HPLC PARA RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE JUGOS DE CAÑA

Un coeficiente de concordancia mayor de 0.70 es aceptable e indica que el método analítico utilizado es reproducible.

Coeficiente de concordancia (r_c) método FEHLING= 0.90 , método reproducible.

Coeficiente de concordancia (r_c) método HPLC= 0.98 , método reproducible.

Para realizar una comparación entre los dos métodos analíticos utilizados se utilizaron los coeficientes de concordancia (r_c) obtenidos para cada método.

FEHLING -- HPLC

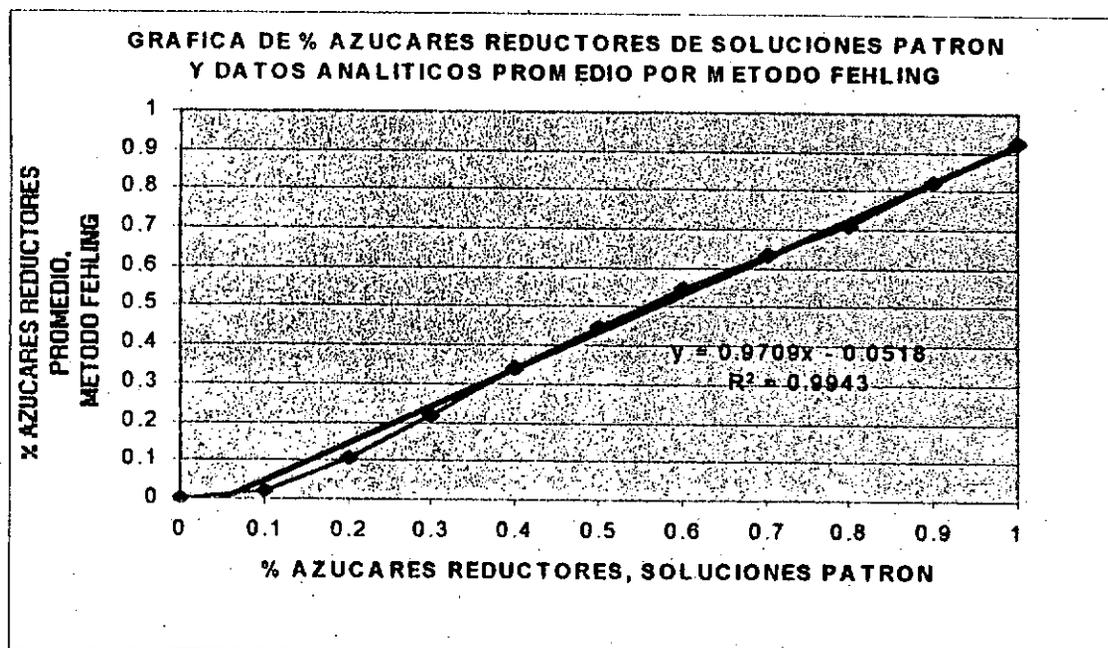
r_c FEHLING= 0.908

r_c HPLC= 0.98

El método que tenga el coeficiente de concordancia más alto es el más reproducible, por lo tanto el método más reproducible es el de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

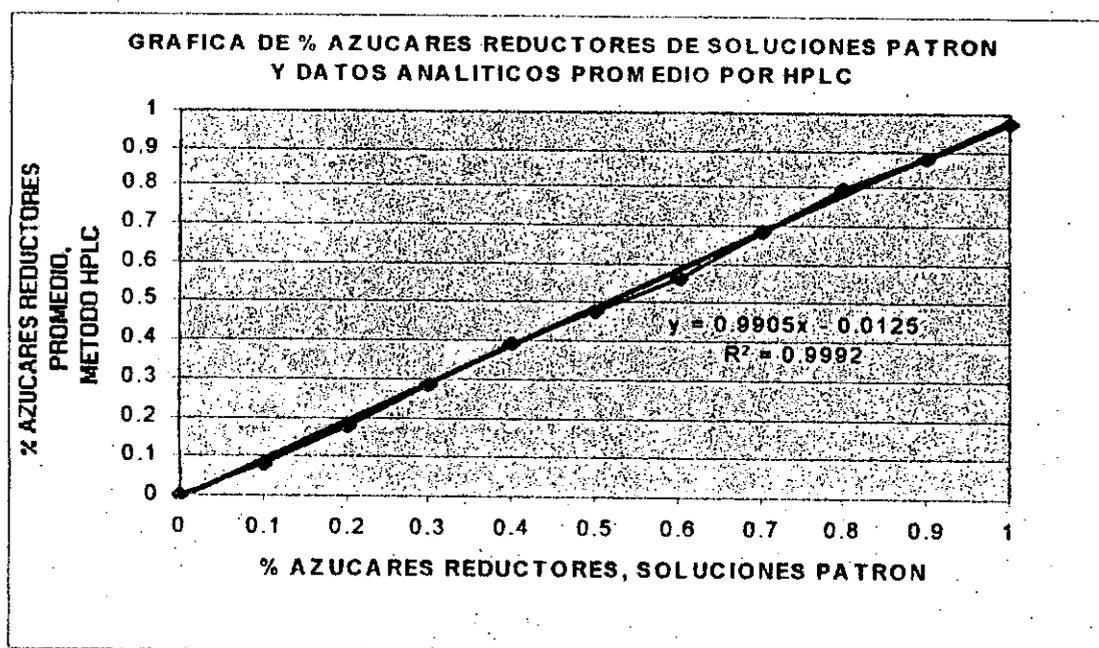
**RESULTADOS MÉTODO DE FEHLING, ANALISIS DE
SOLUCIONES PATRON DE CONCENTRACION CONOCIDA**

Azúcares reductores %, soluciones patrón	Azúcares reductores % Ensayo 1	Azúcares reductores % Ensayo 2	Promedio Ensayos
0	0	0	0
0.10	0.02	0.02	0.02
0.20	0.11	0.10	0.105
0.30	0.22	0.22	0.22
0.40	0.35	0.33	0.34
0.50	0.45	0.44	0.445
0.60	0.57	0.53	0.55
0.70	0.62	0.65	0.635
0.80	0.71	0.71	0.71
0.90	0.83	0.81	0.82
1.00	0.91	0.94	0.925



**RESULTADOS MÉTODO DE HPLC, ANALISIS DE
SOLUCIONES PATRON DE CONCENTRACION CONOCIDA**

Azúcares reductores %, soluciones patrón	Azúcares reductores % Análisis 1	Azúcares reductores % Análisis 2	Promedio Análisis
0	0	0	0
0.10	0.08	0.08	0.08
0.20	0.185	0.175	0.18
0.30	0.285	0.28	0.282
0.40	0.39	0.39	0.39
0.50	0.47	0.48	0.475
0.60	0.56	0.57	0.565
0.70	0.68	0.69	0.685
0.80	0.79	0.80	0.795
0.90	0.88	0.88	0.88
1.00	0.97	0.98	0.975



RELACION BENEFICIO/COSTO , COMPARATIVO MÉTODOS DE ANÁLISIS FEHLING Y HPLC

- Tiempo promedio utilizado para un análisis de azúcares reductores en jugo de caña de azúcar:
Método Fehling: 30 minutos
Método HPLC: 25 minutos
- Costo promedio de un análisis de azúcares reductores en jugo de caña de azúcar (datos proporcionados por el Laboratorio de Control de Calidad del Ingenio Azucarero):
Método Fehling: Q 20.00
Método HPLC: Q 80.00
 $\text{Costo HPLC/Costo Fehling} = \text{Q } 80.00 / \text{Q } 20.00 = 4/1$
El costo de un análisis de HPLC es 4 veces mayor que el costo de un análisis por Fehling.
- Personal empleado para realizar un análisis de azúcares reductores en jugo de caña de azúcar:
Método Fehling: 1 persona (un analista de laboratorio sin especialización)
Método HPLC: 1 persona (un analista de laboratorio con especialización en equipo HPLC).
- Equipo empleado para realizar un análisis de azúcares reductores en jugo de caña de azúcar:
Método Fehling: cristalería de laboratorio, estufas eléctricas y otros.
Método HPLC: cristalería de laboratorio y equipo HPLC (equipo que requiere un cuidado especial).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

En base al coeficiente de concordancia (r_c) obtenido para cada uno de los dos métodos analíticos comparados en este trabajo de tesis, ambos métodos obtuvieron un valor r_c mayor de 0.70, el método Fehling con 0.908 y el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con 0.98, lo cual indica que ambos métodos analíticos son reproducibles. Al comparar los valores de los coeficientes de concordancia de los dos métodos analíticos, el método HPLC es más reproducible que el método Fehling por tener un coeficiente de concordancia mayor.

Según los datos analíticos obtenidos de las 20 muestras analizadas por duplicado para cada uno de los métodos, el método Fehling presenta mayor varianza (desviación estándar al cuadrado) en los ensayos realizados, la varianza del ensayo 1 es 0.0935 y la varianza del ensayo 2 es 0.084, con una varianza promedio para los dos ensayos de 0.0888. Por su parte el método HPLC presenta valores de 0.078 para la varianza del ensayo 1 y 0.0766 la varianza del ensayo 2, con una varianza promedio de 0.0773 para los dos ensayos. Si se comparan las varianzas promedio de los dos métodos analíticos, 0.0888 el método Fehling y 0.0773 el método HPLC; el método Fehling tiene una varianza 1.15 veces mayor que el método HPLC. Debido al menor valor de varianza que posee el método HPLC es más preciso en la obtención de datos analíticos que el método Fehling.

Los promedios de cada ensayo del método HPLC, 0.759 ensayo 1 y 0.7525 ensayo 2, con una diferencia de 0.0065, es un indicador de la poca variabilidad que existe entre un ensayo y otro para cada muestra analizada en el equipo HPLC.

Las diferencias obtenidas para cada una de las veinte muestras analizadas por ambos métodos, puede deberse principalmente al principio que utiliza cada uno de los métodos analíticos. El método Fehling es un método analítico volumétrico, cuyo principio es la reducción del ion cobre +3 a cobre +2 por parte de azúcares capaces de reducir iones cobre en solución. Debe ser tomado muy en

cuenta que además de los azúcares reductores glucosa y fructosa existen otro tipo de carbohidratos en el jugo de caña que también tienen la capacidad de reaccionar con el sulfato de cobre reduciendo el ión cobre. Entre estos carbohidratos se encuentran: la manosa y dextranas (cadenas de moléculas de glucosa producidas por la degradación de sacarosa debido a la acción de la bacteria Leuconostoc mesenteroides). Debido a la existencia de este tipo de carbohidratos es posible que el método Fehling tenga limitantes de origen químico que afectan la reacción de titulación, modificando el resultado analítico a valores mayores en el método Fehling y menores los obtenidos por HPLC, lo cual puede observarse en las tablas de tabulación de los resultados analíticos obtenidos en donde el método Fehling presenta la mayor cantidad de valores altos, dado que el método Fehling cuantifica carbohidratos capaces de reducir el ión cobre presentes en la solución, y el método HPLC cuantifica únicamente los carbohidratos glucosa y fructosa. También debe considerarse el factor humano, pues a diferencia del método HPLC, el resultado del método Fehling depende en gran parte de la persona que efectúa el análisis, debido a que puede introducir un porcentaje de error al análisis si éste no es efectuado correctamente, además por este método existe mayor tiempo de contacto con la muestra.

El método de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) utiliza el principio de la separación, aislación e identificación de los componentes de una mezcla de compuestos químicos presentes en una solución. En el caso del equipo HPLC Waters 410 con refractómetro diferencial utilizado en los ensayos analíticos, el principio que utiliza es la interacción de la muestra (jugo de caña) con una resina de intercambio catiónico (columnas del equipo HPLC), por medio de lo cual se pueden cuantificar de mejor manera las concentraciones de glucosa y fructosa presentes en la muestra analizada.

Los resultados de los ensayos analíticos realizados evidencian que el equipo HPLC ofrece menos variación en los resultados analíticos, y es más reproducible que el método Fehling.

Respecto al análisis de la relación beneficio/costo comparativo entre los métodos de análisis Fehling y HPLC, se puede observar que el método HPLC utiliza en promedio 5 minutos menos que el método Fehling en el análisis de azúcares reductores en un jugo de caña de azúcar. Pero este ahorro de tiempo no se compensa con la diferencia en costos entre ambos métodos de análisis, un

análisis por HPLC es Q 60.00 más costoso que un análisis por el método de Fehling. Además el analista que realiza el análisis de Fehling no es tan especializado como el analista que realiza el análisis por HPLC, el cual posee una educación y conocimientos más amplios que el analista que utiliza el método de Fehling. Es muy importante hacer notar el cuidado en cuanto al manejo de equipo en la realización de los análisis por ambos métodos analíticos, pues en el método de HPLC se utiliza un equipo de un costo muy alto y con cuidado más específico tanto en su mantenimiento como en su uso, mientras que en el análisis por el método Fehling se utiliza cristalería de laboratorio, estufas eléctricos y otros equipos sencillos, que no tienen un costo tan elevado y que además no requieren de un manejo y mantenimiento tan específico como el equipo HPLC.

Estos factores inciden en que el método actual utilizado por los laboratorios de los 17 ingenios azucareros de Guatemala para realizar el análisis de azúcares reductores en jugos de caña sea el método Fehling y que los ingenios que poseen equipo de HPLC lo utilicen únicamente como método de referencia, pues aunque presenta más reproductibilidad y precisión analítica que el método Fehling, el costo del método HPLC es mucho mayor.

Si se considera que en un día de zafra se pueden realizar 48 análisis de azúcares reductores por el método Fehling máximo por día, esto representaría un costo de Q 960.00. Si esta misma cantidad de análisis, 48, se realizarán por el método HPLC, esto representaría un costo de Q 3840. Por lo cual el laboratorio al utilizar el método Fehling como método analítico de rutina, estaría ahorrando Q 2880.00 en costo por día de zafra en el análisis de azúcares reductores en jugo de caña. Esta es una razón principal por la cual los ingenios que poseen HPLC, utilizan para este análisis como método de rutina el método Fehling, y el método HPLC lo utilizan como método alternativo, cuando se quieren realizar comparaciones de resultados.

Los resultados de los análisis de correlación de los porcentajes de azúcares reductores de las diferentes soluciones patrón evaluadas, indican que el método HPLC presenta datos analíticos promedio similares al valor conocido de éstas soluciones patrón, respecto a los obtenidos por el método Fehling. Para comparar estos resultados se realizaron dos gráficas diferentes en las que se evaluaron los resultados de ambos métodos respecto a las soluciones patrón, determinándose que la gráfica de regresión del método HPLC presenta mayor linealidad y coeficiente de regresión lineal (la ecuación de regresión es $y = 0.9905 x - 0.0125$, con un coeficiente de regresión lineal de 0.999) que la gráfica del método Fehling (la ecuación de regresión es $y = 0.9709 x - 0.0518$, con coeficiente de regresión lineal de 0.997), lo cual indica que el método HPLC es más preciso que el método Fehling, en la cuantificación de azúcares reductores en soluciones de concentración conocida.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 En base al coeficiente de concordancia (r_c) obtenido para cada uno de los dos métodos analíticos comparados en este trabajo de tesis, el método Fehling con 0.908 y el método HPLC con 0.98, se concluye que ambos métodos analíticos son reproducibles.
- 10.2 Al comparar los valores de los coeficientes de concordancia de los dos métodos analíticos estudiados, el método HPLC es más reproducible que el método Fehling por tener un coeficiente de concordancia mayor.
- 10.3 Debido al menor valor de varianza que posee el método HPLC, es más preciso en la obtención de datos analíticos que el método Fehling.
- 10.4 Al analizar por ambos métodos soluciones patrón de concentraciones conocidas se determinó que el método HPLC presenta mayor precisión y repetibilidad que el método de Fehling.
- 10.5 La diferencia de costo existente en la realización del análisis de azúcares reductores por el método Fehling (Q 20.00) y el método HPLC (Q 80.00), es la causa principal de que los laboratorios de los ingenios utilicen actualmente el método Fehling, como el método de rutina para este análisis por su bajo costo.
- 10.6 Los laboratorios de los ingenios azucareros que poseen equipo HPLC, utilizan actualmente el método analítico de Fehling como rutinario y el método por HPLC lo utilizan únicamente como referencia para comparar datos analíticos.

11. RECOMENDACIONES

Por reducción de costos los laboratorios de los ingenios azucareros utilizan el método Fehling para la determinación de azúcares reductores en jugo de caña, es recomendable realizar otros estudios para determinar con mayor exactitud la variación del método Fehling, debido principalmente a la limitación química que este método posee por la reducción del cobre debido a contaminantes presentes en el jugo de caña.

En base al costo por análisis de azúcares reductores en jugo de caña y por la alta cantidad de análisis de este tipo que el laboratorio del ingenio realiza en un día de zafra se recomienda utilizar el método de Fehling como método de rutina.

Para los laboratorios que poseen equipo HPLC se recomienda utilizar el método de análisis de azúcares reductores por HPLC, como alternativa debido a que éste método presenta más precisión y repetibilidad que el método de Fehling.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 12.1 CHEN C.P James. Manual del azúcar de caña.
10 a. edición. Editorial Limusa, México, 1991 , pp 724-730.
- 12.2 GEPLACEA. Manual de Técnicas analíticas de jugos, azúcares y mieles
para América Latina y el Caribe. GEPLACEA, México, 1984, 77 pp.
- 12.3 COMISION PARA LA UNIFICACION DE METODOS DE LABORATORIO
AZUCARERO (CUMLA). Manual de análisis de rutina para los
laboratorios azucareros de Guatemala. Guatemala, 1993, 44 pp.
- 12.4 ICUMSA. Methods Book . International Sugar Journal.
Vol XCVII, March 1993. Latin American Edition , pp 134.
- 12.5 DIEZ O.A. 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 YAMAUCHI C. Highly sensitive detection of non reducing carbohydrates
by liquid chromatography. U.S.A 1994. International Sugar Journal.
U.S.A 1994. International Sugar Journal. Vol. 97 pp 15A.
- 12.7 MIDDLETON AW. Determination of sucrose an glucose by HPLC using
immobilized enzyme reactors and chemiluniscense detector.
U.S.A 1995. International Sugar Journal. Vol. 97 pp 87.

- 12.8 ASOCIACION DE AZUCAREROS DE GUATEMALA (ASAZGUA).
Simposio: Análisis de resultados de la zafra 1997-1997. Resumen de presentaciones. CENGICAÑA, Guatemala, agosto 1997, pp 3-9.
- 12.9 SOTO, G.J. Prototipo varietal de caña de azúcar.
Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA). Documento técnico No. 5, Escuintla, Guatemala, 1995, 14 pp.
- 12.10 SPENSER- MEADE. Manual del Azúcar de Caña.
9 a. edición. Editorial Montaner y Simón, S.A . Barcelona, España, 1987, pp 25-40.
- 12.11 TECNICAÑA. Manual de laboratorio para la industria azucarera.
Sociedad colombiana de técnicos de la caña de azúcar. Cali, Colombia, 1989, pp 72-77.
- 12.12 LINDSAY, Sandy. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
Thames Polytechnic, London Great Britain, 1987, 244 pp.
- 12.13 ROUSH. Claude. Storage and analysis of cane juice samples.
U.S.A 1995. International Sugar Journal. Vol. 97 pp 154-159.

13. ANEXOS

13.1 AGROINDUSTRIA AZUCARERA GUATEMALTECA

En los años actuales, la producción azucarera de Guatemala ha tomado más importancia, debido a que en las cosechas recientes se han alcanzado niveles récord de producción, ocupando en el último año el tercer lugar como exportador más grande de Latinoamérica y el Caribe y el sexto en importancia a nivel mundial. Este hecho representa significativos beneficios económicos para el país, sobre todo, por la generación de divisas y por el empleo que la industria azucarera provee.

La agroindustria azucarera de Guatemala está constituida por 17 ingenios activos: Pantaleón, Concepción, El Baúl, Tululá, El Pilar, San Diego, Los Tarros, La Sonrisa, Guadalupe, Santa Ana, Tierra Buena, Palo Gordo, Madre Tierra, Santa Teresa, La Unión, Magdalena y Trinidad.

De los ingenios indicados, con la excepción de Santa Teresa y La Sonrisa, todos se encuentran ubicados en la costa sur del país, en los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez y Retalhuleu. Se estima una capacidad instalada de procesamiento de caña de todos los ingenios, del orden de 95,000 toneladas por día y el rendimiento promedio en la zafra 1997/1998 fue de 202 libras por tonelada de caña.

El desarrollo de la agroindustria de Guatemala ha sido creciente, especialmente a partir de la década de la zafra 83/84 hasta la 97/97. Se llegó a alcanzar en ésta, una producción de 1.4 millones de toneladas métricas de azúcar, superior en 7.8% con respecto a la obtenida en la temporada anterior (1.3 millones de toneladas). Cabría atribuir el aumento a un incremento de 7% en el área de cultivo, como efecto del estímulo de la apertura de nuevos mercados, así como un mayor rendimiento de caña de azúcar por hectárea. Estos hechos se vinculan con la productividad de las plantaciones que han sido renovadas en los últimos años,

utilizando nuevas variedades y con la intensificación de las prácticas culturales (fertilización, riego, mecanización, etc.), además del esfuerzo de los ingenios, los cuales en su mayoría han incrementado su producción y capacidad instalada. (8)

13.2 CAÑA DE AZUCAR

La caña de azúcar es una planta que pertenece a la familia de las gramíneas, de la cual se aprovecha todo el contenido de sus tallos. Es una planta perenne, que tiene la ventaja de ser la más eficiente en transformar la energía solar en azúcares y biomasa. También, genera igual cantidad de oxígeno que cualquier bosque tropical. La caña cuando se planta produce de 4 a 7 cortes anuales (rétos), sin necesidad de plantarla cada año. (1)

La caña de azúcar tiene un tallo parecido al bambú, crece a una altura de 3 a 5 metros y contiene de 11 a 15% de sacarosa en peso. La caña se planta comúnmente con cortes que se hacen a los tallos maduros, que echan raíces y producen una buena cantidad de nuevos tallos. Se pueden obtener hasta siete cosechas sucesivas de una sola plantación en el caso de contar con condiciones favorables. La cosecha se realiza a mano con machetes o por medio de cortadoras mecánicas, además de quemarla para eliminar las hojas. No debe transcurrir mucho tiempo al transportar la caña recién cortada a la fábrica porque de no procesarse dentro de las 24 horas después del corte se producen pérdidas por inversión de glucosa y fructosa. (1)

Como todo cultivo, la caña de azúcar necesita de ciertos cuidados que incluyen: control de malezas, control de plagas y enfermedades, aplicación de fertilizantes y aplicación de riego. (9)

13.3 AZUCARES REDUCTORES

Bajo esta denominación se sitúan todos los azúcares capaces de reducir iones metálicos, tales como el cobre en las soluciones de Fehling (sulfato de cobre + solución alcalina de tartrato), siendo esta en la industria azucarera la denominación normal de una mezcla equimolar de alfa-D-glucosa (dextrosa) y beta-D-fructosa (levulosa), normalmente presente en el jugo de caña debido al metabolismo propio de la misma o a condiciones de descomposición producida por enfermedades o retardo entre el corte y el ingreso al proceso. El caso de enfermedades puede dar origen a mezclas no equimolares en las que los efectos en las mediciones del proceso pueden ser desvirtuadas en grado apreciable y de hecho indica la existencia de problemas mayores.

Las propiedades físicas y químicas de interés para glucosa y fructosa son:

- a) Presentan mutarrotación en solución, dado que existe un equilibrio lento entre las formas alfa y beta, tanto de la glucosa como de la fructosa (en esta última también existe un equilibrio entre la forma furanósica y la piranósica).
- b) El peso normal de dextrosa para fines de análisis es de 32.231 gramos, para aplicar el mismo estándar utilizado en la sacarosa. El peso normal de la fructosa es de 19.003 gramos, en similares condiciones.
- c) La solubilidad del azúcar invertido (mezcla de glucosa y fructosa) está limitada por la solubilidad de la glucosa.
- d) El peso molecular de ambos compuestos es 180.17 g/mol y la fórmula empírica es $C_7H_{12}O_5$. (10).

13.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRECISION (HPLC)

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuída entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria. (12)

La cromatografía líquida de alta precisión es una técnica donde se utilizan columnas de diámetro reducido, rellenas de materiales especiales, la columna es muy eficaz pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, por ésta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión. (12)

La muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión o por válvulas de inyección. Un detector proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un cromatograma.

Los requerimientos de la muestra a ser analizada, es que sea soluble en la fase móvil, las moléculas pueden ser orgánicas o inorgánicas de peso molecular intermedio-alto. La cantidad mínima detectable por el equipo es de $1 \cdot 10^{-7}$ gramos. (12)

Los campos de aplicación más importantes de HPLC son: análisis de alimentos, análisis medioambiental, sustancias naturales, sustancias biológicas (bioquímica), química farmacéutica, química clínica y otros. (5)

Elección de la fase móvil: es necesario seleccionar los disolventes a utilizar como fase móvil, no puede utilizarse como fase móvil un líquido en el cual sea totalmente insoluble la muestra a analizar, la evaluación de la solubilidad es esencial para evitar una fase móvil que pueda precipitar en el equipo toda la muestra o parte de ella. La evaluación del disolvente no resulta completa si no se ensaya también la estabilidad de la muestra en el disolvente cromatográfico. Los disolventes cromatográficos más utilizados son: hexano, tolueno, cloroformo, acetonitrilo, metanol y agua. (12)

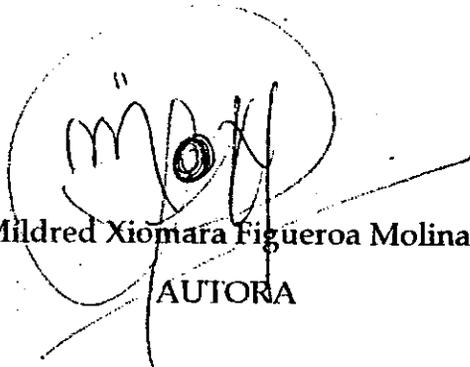
La selección de la fase móvil depende de algunas consideraciones relacionadas con el detector. Cuando se utilizan detectores de índice de refracción (utilizado en los laboratorios azucareros) hay que comparar el índice de refracción de los disolventes con el de los componentes de la muestra, ya que cuanto mayor sea la diferencia mayor será la sensibilidad. (12)

En HPLC es importante que tanto la dilución de la muestra como los disolventes de la fase móvil sean líquidos puros, libres de cualquier partícula sólida. Por tanto, hay que filtrar la disolución de la muestra antes de su inyección en el cromatógrafo. También deben filtrarse los disolventes utilizados en la fase móvil a través del mismo tipo de filtro que el empleado para la muestra. Es corriente realizar la filtración a través de filtros de 0.45 micrómetros, lo cual se considera seguro. (12)

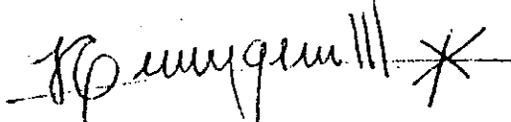
Fase estacionaria: la fase estacionaria en la técnica de HPLC está constituida por columnas de diámetro reducido, rellenas de materiales especiales que permiten separar componentes de una mezcla de químicos. En los laboratorios de los ingenios azucareros se utilizan normalmente columnas marca Bio-Rad que poseen una resina hecha a base de sílice, la cual por medio de intercambio iónico permite la separación de los carbohidratos que se deseen cuantificar. (12)

Elección de la fase estacionaria: la elección de la fase estacionaria es una cuestión muy compleja y depende de diversos factores, como las características y la complejidad de la muestra, así como del tipo de separación elegido.

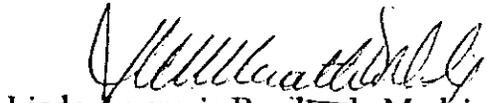
Es importante la elección adecuada de las columnas de HPLC, la mayoría de estas disponibles hoy en día tienen un diámetro interno de 2- 2.7 mm o 4.7- 5 mm. Las columnas de HPLC normalizadas son de 25 cm de longitud y si se precisa de una columna más larga es preferible conectar en serie 2 o más columnas normalizadas que una única columna de longitud comparable (12).



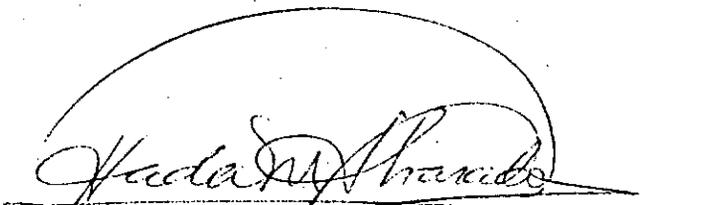
Mildred Xiomara Figueroa Molina
AUTORA



Lic. Hugo Giovanni Escobar M.
ASESOR



Licda. ~~Lucrecia Peralta de Madriz~~
DIRECTORA



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
DECANA