

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

**VALIDACION DE UN METODO ENZIMATICO (GLUCOSA
OXIDASA) PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE
AZUCARES REDUCTORES EN JUGOS DE CAÑA DE AZUCAR**



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

MARIO MANUEL RODAS MORAN

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO

GUATEMALA, AGOSTO DE 2006

DL
06
T(2358)

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona, M.A.	Secretaria
Licda. Lilian Irving Antillón	Vocal I
Lic. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jimenez	Vocal III
Br. Ángel Damián Reyes Valenzuela	Vocal IV
Br. Ángel Jacobo Conde Pereira	Vocal V

DEDICATORIA

*Al Amor que nos hace ser solidarios
Al Amor que nos hace ser hermanos
Sencillamente,
Al Amor.
Donde quiera que este se encuentre.*

When the union's inspiration through worker's blood shall run, There can be no power greater anywhere beneath the sun; Yet what force on earth is weaker than the feeble strength of one, For the union makes us strong..

It is we who ploughed the prairies, built the cities where they trade, Dug the mines and built the workshops, endless miles of railroad laid; Now we stand outcast and starving 'mid the wonders we have made, But the union makes us strong.

They have taken untold millions that they never toiled to earn, But without our brain and muscle not a single wheel will turn; We can break their haughty power, gain our freedom when we learn; That the union makes us strong

In our hands is placed a power greater than their hoarded gold, Greater than the might of armies magnified a thousand fold; We can bring to birth a new world from the ashes of the old, For the union makes us strong.

*Ralph Chaplin, "Solidaridad para Siempre"
en Hille (comp.), The People's Song Book*

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mis Padres: Mario Axel Rodas Marotta y Amanda Morán Mérida, por su cariño y apoyo no siempre con palabras, pero sí con sacrificio, amor y esperanza.

Agradezco a mis Hermanos: Andrea Eunice y Sergio Pablo, por su apoyo y enseñanzas.

Agradezco a mis Asesores: Licda. Diana Pinagel y Lic. Oscar Monzón, por ser los profesionales que mejor conocen este tema, y depositar en mí la confianza de realizarlo, me dejaron ser investigador y redactor sin restricciones. Son muy especiales.

Agradezco a mis Formadores: Licda. Diana Pinagel, Licda. Nora Guzman, Lic. Igor Slowing, Lic. Saúl Loiza, Lic. Luis Velásquez, Lic. Pedro Jayes, Dr. Oscar Cobar, Dr. Cesar Estrada, y Lic. Pablo Oliva. Aprendí tanto de ustedes para hacer este trabajo, no solo en el área científica y técnica, sino en las ideas, en la formación de la personalidad y el criterio.

A mis Amigos: Jason, Waldo, Selvin, Renato, Jules, Luis Alberto, Claudia Arriaga, Walter Bran, Rodrigo, Omar, Willy, Abraham, Vinicio, Alejandro Manzo, Luis Armando, Daniel Aguirre, Alberto Trujillo Leche y tantos, por enseñarme la auténtica amistad, enseñarme a escuchar, a que la amistad se da no se compra y ante todo gracias por escucharme y soportarme.

A los técnicos y profesionales del Ingenio donde se realizó la investigación, Anacafé, Soluciones Analíticas y Cementos Progreso: por aceptarme como un camarada más, por enseñarme todas las técnicas e ideas que celosamente guardan para realizar su trabajo.

A mis Alumnos: Kristel Paola Valdés, Claudio Arafat, Crista Gómez, Manuel, Bárbara, Edlin García, Ligia, Rodrigo Rángel, Susan López, Astrid Gabriela, Jennifer, Rodolfo Lima, Oneida Morales, Flor Chaclán, Silvia Rivera, y Erick V. Por su curiosidad, por darme esperanza, por darme un tiempo de docencia muy divertido y agradable. Ustedes no son un producto mío, más bien, yo soy un producto de ustedes.

A mis Cuates: Bárbara, Dennis, Rita, Ángel, José Adolfo, Nancy, Karla Pamela, Flor, Víctor, Gabriela, Ceci, María Estuardo, Luis Ángel, Evelyn, Wellintong, Francisco, Renato e Ingrid. Son muy especiales, gracias por enseñarme qué es la libertad la sinceridad en cada gesto de amistad, gracias por ayudarme a encontrarme.

A David Rolo, Con todo mi agradecimiento, para la mejor luz que puede tener alguien que camina hacia la experiencia del Reino.

A mí abuelo, Manuel Morán, por tanto amor.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
3.1. Validación de Métodos Analíticos	5
3.1.1. Linealidad	6
3.1.2. Exactitud	8
3.1.3. Precisión	10
3.1.4. Especificidad	11
3.2. Proceso de Obtención de Azúcar de Caña	12
3.2.1. Corte de Caña	12
3.2.2. Molienda de Caña	14
3.2.3. Clarificación	15
3.2.4. Cristalización	16
3.3. Pruebas Analíticas Útiles al proceso de Producción Azúcar	17
3.3.1. Azúcares Reductores	17
3.3.2. Densidad	18
3.3.3. Humedad	18
3.3.4. Índice de Polarización de la Sacarosa (Pol)	19
3.4. Métodos Enzimáticos con Glucosa Oxidasa	21
3.5. Azúcares Reductores	22
IV. JUSTIFICACIÓN	24
V. OBJETIVOS	26
VI. HIPÓTESIS	27

VII. MATERIAL Y EQUIPO	28
7.1. Universo	28
7.2. Selección de Muestra	28
7.3. Medios	28
7.4. Materiales	29
7.5. Procedimiento Experimental	31
7.6. Cálculos	33
7.7. Análisis Estadístico	35
VIII. RESULTADOS	37
8.1. Análisis de Exactitud	37
8.2. Análisis de Reproducibilidad y Repetibilidad	40
8.3 Análisis de Precisión	42
8.4. Análisis de Linealidad	44
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
X. CONCLUSIONES	54
XI. RECOMENDACIONES	55
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
XIII. ANEXOS	59

I. RESUMEN

Education doesn't cost... it pays!
POSTMARK, UNIV. OF MISSISSIPPI, DEC. 78

En el presente estudio descriptivo, se realizó la validación de una metodología analítica, que consistió en un método enzimático para la determinación de Glucosa (15, 7, 17) como una alternativa para la determinación de azúcares reductores en el jugo de caña de azúcar en las distintas etapas de la producción de azúcar blanca.

Este método utiliza la oxidación selectiva de la glucosa (la cual es un azúcar reductor) por medio de una enzima, Glucosa Oxidasa; la glucosa al oxidarse, produce un mol de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la cual reacciona con 2-aminofenazona y fenol y con ayuda de otra enzima denominada Peroxidasa, forma un compuesto coloreado de la familia de la Quinoneiminas que se puede relacionar con la concentración de azúcares reductores en el Jugo de Caña.

Para este método, se realizaron algunas pruebas de carácter exploratorio para conocer efectos ambientales, con el objetivo de encontrar el óptimo de selectividad de la enzima y los reactivos, además de algunos interferentes que afecten el procedimiento.

Los Jugos utilizados para el presente trabajo fueron: Jugos de Pre-quema, Jugo de Cosecha, Jugo del primer Molino, Jugo Mezclado, Jugo Sulfitado, Jugo Alcalizado, Jugo Clarificado, todos estos forman parte de la producción de azúcar blanca. Se comparó resultados de cuantificación de Azúcares reductores medidos con el método Enzimático que utiliza Glucosa Oxidasa contra el método de Oficial ICUMSA (Eynon Lane) para conocer si el método era preciso y confiable, según el sistema de calidad del ingenio.

Los estudios de Validación de Métodos llevan a su vez, estudios de Exactitud, Linealidad y Robustez, estos ayudan a evaluar el comportamiento del método a distintos cambios, dentro de Laboratorio como fuera, con el

fin de lograr un método confiable y que llene las expectativas de la industria del azúcar. Los resultados obtenidos en la comparación del método alternativo contra el oficial muestran que el método tiene un 93 % de similitud al método oficial.

Por último se concluyó que la metodología propuesta como un método alternativo para determinar azúcares reductores en jugo de caña de azúcar por vía enzimática, se puede utilizar con resultados exactos, precisos y confiables en un rango de azúcares reductores de 0.10 % a 0.60 % (p/p) de éstos en Jugo de Caña.

II. INTRODUCCIÓN

*Y al principio todo fue curiosidad
Isaac Asimov*

En la industria azucarera, los métodos analíticos utilizados, están normados por ICUMSA (Comisión Internacional para la Uniformidad de Métodos para el Análisis de Azúcar, por sus siglas en inglés).

Los métodos ICUMSA (6, 20) utilizados para mediciones de la calidad del jugo extraído de la caña, son, los sólidos disueltos refractométricos (Brix), el valor de polarización y los azúcares reductores, estos últimos son los que pueden generar disminución en el rendimiento final del azúcar (8).

Los métodos ICUMSA, proponen para cuantificar azúcares reductores, el método de Eynon Lane (6), el cuál se basa en la prueba de Fehling para azúcares reductores (6), en el que es reducido el cobre, formando un precipitado rojo, la relación entre la cantidad del azúcar reductor y el óxido de cobre generado es de 1:5, por ello se calcula un factor que permite relacionar el cobre oxidado con la concentración de azúcares reductores en el jugo de caña.

Se ha observado que las enzimas gozan de una selectividad muy particular, para varios analitos, esto se ha aprovechado en química analítica, así mismo, en 1975 Trinder (15) propuso un método cuantitativo para glucosa en sangre, este luego pasó a utilizarse en orina (15).

Este método es utilizado en la gran mayoría de laboratorios de química clínica y se basa en la formación de un compuesto coloreado, quinoneimina, la formación de este compuesto lo hace posible la enzima Glucosa Oxidasa, lo cuál hace a la glucosa cuantificable, en una relación entre la glucosa y la quinoneimina de 1:1, por lo que se realiza la medición en una forma directa (15).

El presente estudio propone realizar la comparación del método enzimático de Trinder (15), con el método ICUMSA, que es el que se utiliza de una forma estándar en la industria azucarera a nivel mundial y así validar el método de Trinder para cuantificar azúcares reductores en jugo de cosecha, primario, sulfitado, alcalizado, clarificado del proceso de fabricación de azúcar, para ello se propone someter el método a ensayos de linealidad, precisión, exactitud (comparación con método ICUMSA) y robustez (1). El trabajo de investigación puede representar una ayuda a la Industria azucarera guatemalteca, y apoyar al desarrollo de la misma.

III. ANTECEDENTES

*Las premisas de las que partimos
pueden verificarse de
forma puramente empírica*

The German Ideology

A mediados del siglo pasado se empezó a determinar la equivalencia entre métodos analíticos utilizados para medir un mismo analito, además de observar si existía un mismo procedimiento en diferentes laboratorios de análisis. En Guatemala, se encuentran estudios de validación de métodos desde la década de los años 70 del siglo XX, cuando se empezó a utilizar en Guatemala: cromatografía de gases y otros métodos para aquella época nuevos, en todos los casos se iniciaba con la finalidad de confirmar resultados generados con métodos tradicionales.

Para el proceso de acreditación de un método, si se desea validar un nuevo método analítico, es imprescindible la utilización de un método analítico de referencia que permita cuantificar de manera confiable un analito determinado. En este proceso para acreditar un método analítico, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas (16). La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, como lo son, la linealidad, exactitud, precisión y robustez (2).

3.1 Validación de Métodos Analíticos Fotométricos

Una vez desarrollado un método de análisis de una sustancia por medio de la proporcionalidad dada por intensidad del color por medio de un fotómetro, al igual que cualquier otro método de análisis, debe validarse; se debe reafirmar y en

especial documentar que los resultados generados por este método son confiables (2).

Es importante destacar que la validez de estos métodos es ampliamente discutible, ya que pueden existir diferencias entre los reactivos utilizados por una u otra casa comercial, o por el tipo o calidad del aparato, la sensibilidad del detector, el paquete electrónico utilizado; por lo anteriormente descrito es necesario validar la metodología para cada analito en particular, o para cada clase de muestra donde se localice el analito (1).

3.1.1. Linealidad:

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta de un instrumento. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples. (1)

Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado (2).

Según Comellas (2), se especifica, que cuando el método se aplica para determinaciones del analito en estudios de estabilidad se utilizará un rango más amplio desde 0,0 hasta 120,0 %. La curva de regresión se determina sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados, el eje "y", la respuesta analítica (absorbancia para métodos espectrofotométricos). Los estimadores de regresión para un nivel de significación (el cuál se conoce con la literal "a") dado (en la mayoría de trabajos químicos $a = 0,05$ [5 %]) (3) son:

3.1.1.1. Coeficiente de correlación (r): Muchos autores plantean (1,2,3) que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Sin embargo, se considera que la mejor forma de indicar la linealidad del método estudiado será realizar una prueba estadística de t (t de Student), en la cual se calculará la correlación lineal significativa (t_r) a partir de la hipótesis nula de no-correlación entre las magnitudes estudiadas (" x " y " y "). Para ello se empleará la ecuación siguiente:

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

Donde: r es el coeficiente de correlación, r^2 es el coeficiente de determinación y n es el número de réplicas. El valor de t_r obtenido se compara con el valor tabulado de t para el nivel de significación utilizado y con $n-2$ grados de libertad (donde n corresponde al número total de determinaciones del método enzimático).

3.1.1.2 Pendiente: Indica la sensibilidad de calibración o del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito. La sensibilidad analítica relaciona la aleatoriedad de la respuesta con la aleatoriedad debida a la variación de la concentración, es inversamente proporcional a la capacidad de detectar pequeñas diferencias en la concentración del analito, y se obtiene dividiendo la pendiente de la curva de calibración por la desviación estándar de las respuestas en cada punto o concentración. Se considera que a mayor pendiente, mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el coeficiente de variación de la pendiente mayor será la linealidad (2).

3.1.1.3. Intercepto: Es el estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos. El intervalo de confianza del intercepto debe incluir al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad (como se exige para el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en los métodos espectrofotométricos) (2).

Según la literatura (2) se determinará la prueba de proporcionalidad mediante una prueba t considerando como hipótesis nula que el intercepto tiene que ser cero. El valor de t se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$t_{\text{exp}} = \frac{a}{S_a} \quad (2)$$

donde: a es el valor del intercepto, S_a es la desviación estándar del intercepto y deberá ser menor que el valor tabulado de t para el nivel de significación dado.

3.1.2. Exactitud:

Este parámetro indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero (2). A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él (16).

Cuando existen interferencias en el método por falta de selectividad (desviación por exceso en los resultados), o cuando se trata de métodos analíticos muy laboriosos, con varias etapas, como extracciones, purificaciones, etcétera (desviación por defecto en los resultados), el método se considera no exacto (2).

Para asegurar una buena exactitud, según Hortwitz. (3) es necesario eliminar los errores que no están sujetos a tratamiento estadístico (calibración o control

incorrectos de equipos), los errores inherentes a blancos (errores constantes) y los que dependen de la cantidad del analito presente (errores proporcionales). Ellos opinan que la mejor manera de identificar estos errores será realizando una prueba ínter laboratorio.

Generalmente se utilizan los datos experimentales de la linealidad correspondientes a la concentración inferior, media y superior del intervalo lineal establecido (1). Regularmente se presenta el siguiente método para analizar resultados (2):

El primero es comparar el valor medio obtenido por el método propuesto para la determinación del analito contra el valor medio obtenido por un método ya validado o el valor teórico (100 %). Para ello se realizará una prueba t de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{m} \sqrt{n}}{S} = \frac{100 - R\sqrt{n}}{CV}$$

donde: t_{exp} es el valor experimental de t , m es el valor real, \bar{m} es el valor medio, n es el número de determinaciones, S es la desviación estándar, R es el por ciento de recobrado y CV el coeficiente de variación.

El porcentaje de recuperación puede estar entre un $\pm 10\%$ del valor teórico. Una recomendación es usar ± 4 veces la desviación estándar relativa de una tabla estadística. Para la industria farmacéutica de los Estados Unidos, $\pm 2\%$ es típico para un ensayo de principio activo en un producto medicinal. El porcentaje de recuperación puede estar entre ± 50 del valor teórico para los métodos usados en productos EPA. Los porcentajes de recuperación menores pueden ser aceptables basados en la necesidad del método (19).

3.1.3. Precisión:

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí (3). La USP XXII (United States Pharmacopoeia) expresa que la precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad (16).

3.1.3.1 Repetibilidad. Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto (16).

El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa)(1). Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media (3).

Un aspecto importante será seleccionar la cantidad o concentración de muestra que se analiza. Se plantea que el error en el porcentaje del componente hallado no deberá ser mayor que un valor aproximado. Según la teoría de Hortwitz (3) el coeficiente de variación disminuye con la disminución de la concentración en que se encuentre el analito en la muestra. Así:

$$CV (\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad (3)$$

Donde: C es la concentración de la muestra expresada como potencia de 10. De acuerdo a la teoría Hortwitz se reportan tablas que establecen el coeficiente de variación máximo aceptable de un método analítico en función del por ciento del analito en la muestra (Tabla 1. Anexo 1).

3.1.3.2 Reproducibilidad. Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad es mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad. Se plantea que para la mayoría de los métodos analíticos el coeficiente de variación de la reproducibilidad debe ser menor que un 2,0 % (16).

Según el tipo de análisis y su propósito específico, se establece un criterio acorde a un valor máximo aceptable. Para componentes menores, como es el caso de azúcares reductores en jugo de caña, debe ser menor del 5%, pero puede alcanzar un 10% en el límite de cuantificación. Estos valores están de acuerdo con la práctica de la industria farmacéutica de Estados Unidos. (19)

3.1.3.3. Robustez (tolerancia): Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la ejecución del método sobre una misma muestra variando algunas condiciones operacionales como, por ejemplo, diferentes laboratorios, reactivos, analistas, equipos, temperaturas de ensayo, etcétera. Se determina como una función de las variables seleccionadas en la ejecución y los resultados se comparan con los resultados del estudio de reproducibilidad del método para obtener una medida de la tolerancia del método analítico (16).

3.1.4. Especificidad:

Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad (2).

Los métodos espectroscópicos (UV, IR, colorimetría, etcétera) frecuentemente adolecen de selectividad. Sin embargo, se ha demostrado que la utilización de la espectrofotometría UV de derivadas incrementa considerablemente la selectividad del método, permitiendo la determinación cuantitativa simultánea de varios productos que posean un máximo de absorción en la misma zona espectral (3).

3.2. Proceso de Obtención de Azúcar de Caña

En la actualidad, los principales métodos de procesamiento empleados para la obtención de azúcar de caña, han funcionado bien después de muchos años y no es probable que cambien de forma radical en corto tiempo. Se espera que ocurran alteraciones para la conservación de energía que posiblemente reduzcan el empleo de algunos productos químicos utilizados en el proceso, pero no es probable que ocurran cambios importantes en los procesos (8).

3.2.1 Caña de Azúcar:

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado forma el

azúcar. La sacarosa es sintetizada por la caña gracias a la energía tomada del sol durante la fotosíntesis (8).

El tronco de la caña de azúcar está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua, sacarosa, otros carbohidratos y sales minerales. En ambas partes también se encuentran otras sustancias en cantidades muy pequeñas. Las proporciones de los componentes varían de acuerdo con la variedad de la caña, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos, etc.

3.2.2. Corte de Caña

Aunque se han ensayado con cierto éxito varias máquinas de cortar caña, la mayor parte de la zafra o recolección sigue haciéndose a mano en todo el mundo. El instrumento usado para cortarla suele ser un machete grande de acero con hoja de unos 50 cm de longitud y 13 cm de ancho, un pequeño gancho en la parte posterior y empuñadura de madera. La caña se abate cerca del suelo, se le quitan las hojas con el gancho del machete y se corta por el extremo superior, cerca del último nudo maduro. Las hojas se dejan en el suelo para enriquecerlo de materia orgánica.

Según Estudios realizados (4, 5, 8) se sabe que si la caña se corta muy joven, existen pérdidas de rendimiento, ya sea por el tiempo de almacenamiento o por el tiempo de maduración, los cuales aumentan el contenido de azúcares reductores en la caña (5). A esto suele sumarse la pérdida por el estilo de corte con que se cosecha la caña, para su posterior procesamiento (5).

3.2.3. Molienda de la Caña:

Lo primero que se realiza es lavar la caña para eliminar tierra, lodo y desechos. Luego es cortada y desmenuzada por equipos de preparación para facilitar separar el jugo que se extrae al pasar la caña preparada a través de una serie de

molinos, cada uno de los cuales consta de tres a cuatro rodillos acanalados que ejercen una gran presión. Se pueden agregar agua y jugos ligeros para ayudar a macerar la caña y favorecer la extracción de la sacarosa.

Antes de la molienda ocurre una pérdida, ésta se da al momento de lavar la caña en las mesas de descarga de los patios de caña, ya que siempre que se lava, ocurre cierto grado de pérdidas en azúcar debido a la acción del agua sobre los cortes y magulladuras de las cañas. Aún así, es preferible incurrir en esas pequeñas pérdidas y eliminar la parte de la basura que se lleva el lavado, pues de ese modo la proporción de basura que no se elimina se lleva sacarosa al bagazo y a la cachaza (7).

Cada molino está equipado con una turbina de alta presión o motor eléctrico. En el recorrido de la caña por el molino se agrega agua, generalmente a 55° C – 60 °C, o jugo diluido para extraer al máximo la sacarosa que contiene el material fibroso (bagazo). El proceso de extracción con agua es llamado maceración y con jugo se llama imbibición (8). Una vez extraído el jugo se tamiza para eliminar el bagazo y el bagacillo, los cuales se conducen a las calderas como combustible y uso posterior, produciendo el vapor de alta presión que se emplea en las turbinas de los molinos y otros equipos.

El jugo extraído por los molinos constituye un caldo de cultivo ideal para el desarrollo acelerado de los diferentes microorganismos que se encuentran naturalmente en las cañas. Además esta infección natural está aumentada, en cantidades exageradas, especialmente cuando las cañas ya están parcialmente deterioradas. En el caso de cañas frescas, si éstas tienen un alto contenido de materias extrañas, se agrega una fuente de inóculo enorme que puede producir pérdidas en el tándem (línea de producción), en un lapso relativamente corto, debido a la transformación de la sacarosa en azúcares invertidos, alcohol, ácido acético y otros (7).

3.2.4. Clarificación:

El jugo obtenido en la etapa de molienda es de carácter ácido (pH aproximado: 5.2), éste se trata con lechada de cal, la cual eleva el pH con el objetivo de minimizar las posibles pérdidas de sacarosa. El pH suele encontrarse de 7.0 a 7.5, lo cual da un jugo brillante, aumenta la temperatura entre el jugo mixto y clarificado y se evita la destrucción de la sacarosa e inversiones posteriores.

Para una buena clarificación se necesita que la cantidad de cal sea la indicada en función de la calidad de los jugos que se obtienen (13).

La temperatura de calentamiento varía entre 95 y 99 °C, por lo general se calienta a la temperatura de ebullición o ligeramente más. En la clarificación del jugo por sedimentación, los sólidos no azúcares se precipitan en forma de lodo llamado cachaza, el jugo clarificado queda en la parte superior del tanque; el sólido residual se envía para ser desechada al campo, para el mejoramiento de los suelos pobres en materia orgánica (8).

Un procedimiento auxiliar de la clarificación es la sulfitación, el cual se hace en un sulfitador de Quarez, este es llamado así en honor a su inventor, este consiste en un tanque de madera rectangular dividido en dos compartimientos desiguales que comunican. El jugo por sulfitarse llega al compartimiento más pequeño, ahí lo toma una bomba que lo envía a la columna de SO₂, la que está diseñada en la forma de sifón que sigue el principio habitual de un eyector. De esta manera se produce una aspiración de gas sulfuroso y la sulfitación se efectúa por contacto y mezcla en la columna vertical descendente que retorna el jugo al tanque (13).

En Guatemala por lo regular se utiliza la sulfitación en frío, partiendo de jugo mezclado, éste entra al sulfitador a un pH ácido, la sulfitación se interrumpe a un pH de 4 o 4.5, según los resultados que se encuentren (13).

Las pérdidas por inversión se producen por alta temperatura, bajo pH y por el tiempo de retención en los clarificadores. Cuando el rango del pH del clarificado está entre 6.7 y 7.0 la acidez no es un factor que aumente mucho la inversión, pero cuando se sulfita y se baja hasta 6.2 y 6.4, si es considerable esta pérdida.

El grado de sulfitación necesario está en función de la calidad de la materia prima y de la calidad de la azúcar deseada. En condiciones normales en Guatemala esto se logra usando de 150 a 200 gramos de azufre por tonelada de caña.

Es importante utilizar la cantidad mínima requerida de azufre pues el SO_2 y los sulfitos producen corrosión e incrustaciones graves al reaccionar con el agua de enfriamiento y evitar la producción de SO_3 , así como procurar que el aire sea lo más seco posible. El SO_3 al reaccionar con el agua del jugo produce ácido sulfúrico que aumenta la inversión y pérdida de sacarosa (11).

3.2.5. Cristalización:

El jugo procedente del sistema de clarificación se recibe en los evaporadores con un porcentaje de sólidos solubles entre 12 a 15 % y se obtiene una meladura o jarabe con una concentración aproximada de sólidos solubles del 60 % (8).

Este proceso se da en evaporadores de múltiples efectos al vacío, que consisten en un conjunto de celdas de ebullición dispuestas en serie. El jugo entra primero en el preevaporador y se calienta hasta el punto de ebullición. Al comenzar a ebullición se generan vapores los cuales sirven para calentar el jugo en el siguiente efecto, logrando así el menor punto de ebullición en cada evaporador.

Una vez que la muestra tiene el grado de evaporación requerido, por la parte inferior se abre una compuerta y se descarga el producto. La meladura es purificada en un clarificador cuando así se requiere por la calidad de azúcar a obtener (8).

La cristalización se realiza en los tachos, que son aparatos de simple efecto que se usan para procesar la meladura y mieles con el objeto de producir azúcar cristalizada mediante la aplicación de calor. El material resultante que contiene líquido (miel) y cristales (azúcar) se denomina masa cocida. Esta mezcla se conduce a un cristizador, que es un tanque de agitación horizontal equipado con serpentines de enfriamiento. Aquí se deposita más sacarosa sobre los cristales ya formados y se completa la cristalización (13).

La masa cocida pasa a las centrifugas donde se obtiene el azúcar húmedo que pasa a las secadoras, que son cilindros rotatorios donde el azúcar queda en contacto con el aire caliente que entra en contracorriente. El azúcar debe tener baja humedad, aproximadamente 0.05 %, para evitar los terrones (8).

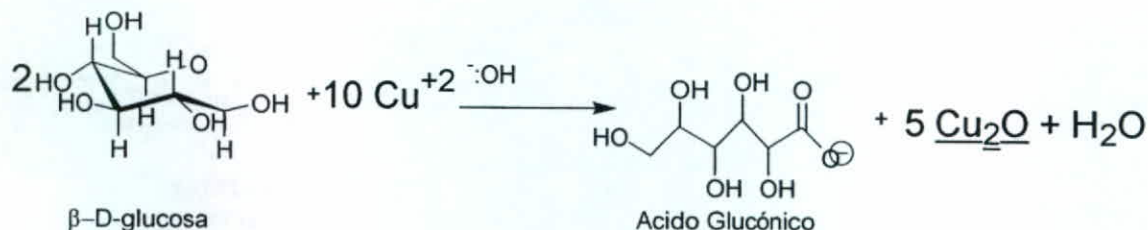
Los arrastres continuos de material azucarado de los distintos vasos debidos a mala operación o defectos de diseño son una fuente grande de pérdidas indeterminadas de sacarosa. Los vasos se deben operar con los niveles de jugo lo más bajos posibles y deben estar provistos de baffles y separadores de arrastres de diseño y construcción adecuados y la distribución del material debe ser uniforme en el fondo del vaso. El laboratorio debe chequear regularmente las aguas de retorno de los condensadores para localizar arrastres (13).

3.3. Pruebas Analíticas Útiles al Proceso de Producción de Azúcar:

3.3.1. Azúcares Reductores:

El método de Eynon – Lane, se basa en la propiedad que tiene el cobre (II), en medio alcalino y acomplejado con el tartrato, de oxidar a los azúcares reductores, reduciéndose a cobre (I). Este proceso de oxidorreducción requiere que la concentración de los reactivos, la temperatura, la velocidad y el tiempo de calentamiento, así como el volumen final de la solución resultante, sean estrictamente controlados. (9) La reacción se muestra en el esquema 1.

Esquema 1:



El método de Eynon Lane, utiliza el reactivo de Fehling a temperatura de ebullición y utiliza la solución de jugo de caña como titulante, es importante mencionar que el punto final está afectado grandemente por el factor humano de apreciación, con un color inicial azul a un color rojo ladrillo. Este método es el utilizado en todos los ingenios de la industria azucarera como referencia, ya que es el que se encuentra documentado como método ICUMSA para la determinación de azúcares reductores (9) Este método es aplicable a jugos, meladura, miel final y azúcar crudo.

El Método de Munson y Walter (20) es conveniente para un análisis ocasional en el cual el óxido cuproso reducido se determina en forma gravimétrica. El método de Ofner se utiliza hasta para 10 % de azúcar invertido. El óxido cuproso reducido se trata con exceso de yodo normalizado, el cual después se retitula. Las pequeñas cantidades de azúcares reductores en la sacarosa se determinan por el método de Knight y Allen. Después de que el azúcar reacciona con el reactivo de cobre, el exceso de cobre sin reducir se determina con EDTA (sal sódica del ácido etilendiamintetraacético). Se determinan cantidades muy pequeñas de azúcares reductores por el método de Emmerich. Se basa en la formación de un complejo colorido de ácido 3,6-dinitroftálico y azúcar invertido (9).

3.3.2. Densidad:

La densidad, es medida por el hidrómetro o huso patrón, se utiliza mucho para determinar la concentración de azúcar en jarabes, licores y jugos. Los aerómetros graduados en concentración de sacarosa se llaman hidrómetros Brix o "pesa jarabes Brix"; las lecturas se llaman grados Brix. Éstos equivalen al porcentaje en peso de sacarosa en solución.

El índice de refracción es otra forma de medir la concentración de azúcar en solución. Muchos refractómetros tienen escalas Brix incorporadas.

La determinación del Brix tiene gran importancia en la industria azucarera, ya que asociado a la Pol (Índice de Polarización en Materiales Azucarados), permite controlar el proceso fabril, calcular su eficiencia y evaluar la calidad de algunos productos azucareros en transacciones comerciales. El método aerométrico determina el mismo parámetro que el refractométrico, sin embargo, cuando se analizan soluciones industriales los valores del Brix difieren ligeramente a causa de la naturaleza de las impurezas. El método aerométrico mantiene el nivel aceptado según la ICUMSA (6).

3.3.3 Determinación de la humedad

La determinación de la humedad tiene una importancia capital, tanto en azúcares, ya que es uno de los índices de alta prioridad para la comercialización, como en el bagazo y la cachaza, pues permite conocer el grado de eficiencia de los molinos y los filtros. El método empleado para determinar la humedad es rápido, sencillo y rinde buenos resultados. En la ICUMSA, mantiene el nivel de oficial cuando se aplica al azúcar crudo.

El método es aplicable a todos los azúcares que contengan más de 0.15 % m/m

de humedad, así como al bagazo y a la cachaza. Este se basa en la desecación de la muestra a temperatura regulada, controlando estrictamente las condiciones (en especial las de enfriamiento en el caso de azúcar crudo), y la determinación gravimétrica de la pérdida de masa experimentada (6).

3.3.4. Determinación de Índice de Polarización en Materiales Azucarados (Pol)

El método de Schmitz-Horne se caracteriza por la rapidez y facilidad con que se realizan los análisis de jugos, ya que no es necesario pesar ni medir volúmenes exactos. Entre las desventajas del método se podría mencionar el excesivo gasto de acetato básico de plomo (II) (ABP), que incide en la contaminación ambiental, la alta peligrosidad para los analistas, a causa de la frecuente manipulación del ABP en polvo, y la dificultad que presentan algunas sustancias, en especial los jugos, para lograr clarificar todas las muestras.

Una gran ventaja del método se debe a las propiedades preservativas del ABP que permite la conservación y clarificación simultánea de las muestras de jugos compuestas acumuladas durante períodos de 4 y 8 horas (6).

Este método, aunque fue elaborado para jugos, se ha extendido a meladura, masas cocidas, mieles, grano fino, semilla y aguas residuales. Se basa, como todos los métodos sacarimétricos para determinar Pol, en la propiedad de la sacarosa de rotar el plano de la luz polarizada en una magnitud directamente proporcional a su concentración en solución acuosa.

El Pol viene dado por la suma algebraica de las sustancias ópticamente activas presentes en la solución clarificada, midiéndose siempre la sacarosa aparente.

3.4. Métodos Enzimáticos con Glucosa Oxidasa:

La historia de la investigación de carbohidratos se encuentra íntimamente ligada al desarrollo de la bioquímica. El esfuerzo por entender la estructura de los azúcares, el proceso de fermentación, la naturaleza de las enzimas, la catálisis biológica, y la ruta del carbono asimilado durante la fotosíntesis y el seguimiento del curso de las rutas metabólicas, a menudo involucran el estudio de los carbohidratos (9).

Aunque los científicos de esa época (principios del siglo XX) percibieron el potencial que tenían estas enzimas para el análisis específico de carbohidratos, sus esfuerzos en esta dirección se vieron frustrados ya que las preparaciones de enzimas usadas en esa época eran impuras, conteniendo más de una actividad (9).

Aunque la glucosa puede determinarse por métodos químicos, estos en su mayoría carecen de especificidad y no pueden distinguir la glucosa de otros monosacáridos. Tanto en análisis clínicos como en la industria alimenticia y farmacéutica se utilizan métodos enzimáticos para la determinación de glucosa. La glucosa oxidasa es una flavo proteína altamente específica que cataliza la oxidación de la glucosa a β -D-gluconolactona, sin que ningún otro azúcar natural reaccione en extensión apreciable.

Esta reacción en la que se consume oxígeno podría seguirse manométricamente o mediante un electrodo de oxígeno. Sin embargo, para poder seguir el curso de esta reacción espectrofotométricamente es necesario acoplar a la misma una segunda reacción enzimática indicadora adecuada.

Para la determinación colorimétrica de glucosa por el método de la oxidasa, se añade al medio peroxidasa de rábano silvestre (HRP), que elimina el peróxido de hidrógeno a medida que se forma, a la vez que se genera un colorante adecuado.

Se podrían utilizar como aceptores de oxígeno benzidina, o-toluidina, o-dianisidina. Sin embargo, la naturaleza carcinogénica de estos compuestos ha impulsado la búsqueda de aceptores alternativos. Uno de estos sistemas es la 4-aminoantipirina, que reacciona con el p-hidroxibencensulfonato y el peróxido de hidrógeno en presencia de HRP para formar un colorante quinonaimina con un máximo de absorción a 505 nm (nanómetros), (anexo 2) (15).

El método Enzimático para cuantificar glucosa, propuesto por Trinder (15) en 1972, fue el empleado en esta investigación para la determinación cuantitativa de glucosa para luego establecer una relación para cuantificar azúcares reductores en distintos jugos de caña. La cantidad de colorante generada, y por tanto la absorbancia medida a 505 nm, será directamente proporcional a la cantidad de glucosa (15).

3.4. Azúcares Reductores:

El azúcar de mesa, sacarosa, es un disacárido formado por fructosa y glucosa, es el disacárido más abundante en el reino Plantae. La sacarosa no es reductora, pues el enlace entre los dos monosacáridos está formado por los hidroxilos de los carbonos anoméricos.

Sin embargo puede hidrolizarse, formando azúcar invertido, posteriormente hay mutarrotación (es el cambio gradual de rotación óptica hasta llegar a un punto de equilibrio que se produce cuando se disuelve un anómero de azúcar puro) en los componentes del azúcar invertido quedando finalmente, en una hidrólisis perfecta:

α -D-Glucopiranososa (18%)

β -D-Glucopiranososa (32%)

α -D-Fructofuranosa (16%)

β -D-Fructopiranososa (34%)

3.4.1. Fructosa

Composición.

Fórmula: $C_6 H_{12} O_6$, oxígeno 53,29%, carbono 40,00%, hidrógeno 6,72%.

Peso molecular: 180,16 g/mol

La fructosa es un monosacárido levo-rotatorio (gira a la izquierda la luz polarizada) con un sabor mucho más dulce que la glucosa y la sacarosa, razón por la cual se prefiere en muchos usos alimentarios que requieren un endulzado intensivo. Está presente en gran cantidad de frutas y en la miel. Se da en las formas furanosa y piranosa. A 20 °C una solución acuosa contiene un 20% de la forma furanosa (18).

3.4.2. Glucosa

Composición: Fórmula: $C_6 H_{12} O_6$, oxígeno 53,29%, carbono 40,00%, hidrógeno 6,72%.

Peso molecular: 180,16 g/mol.

La glucosa es un monosacárido dextro-rotatorio (gira a la derecha la luz polarizada). Es una fuente principal de energía para los organismos vivos. Se da naturalmente y en estado libre en las frutas y otras partes de las plantas. Se obtiene de los cereales con alto contenido de almidón, tales como trigo, maíz, arroz, papas, etc., o por inversión de la sacarosa. La sangre humana normal contiene entre 0,08 y 0,10% de glucosa (18).

IV. JUSTIFICACIÓN

En Ciencia Aplicada y en técnica dar prioridad a las necesidades básicas de la población y a las líneas más promisorias de desarrollo económico.

Mario Bunge.

En Guatemala, la industria del azúcar alcanza un impacto importante en la vida económica del país, ya que cerca de 45, 000 asalariados en Guatemala se encuentran trabajando en esta línea de producción en época de zafra (Noviembre y Abril) y dependen de este ingreso cerca de 220,000 guatemaltecos. Esta industria produce según datos recientes de Cengicaña (Centro Guatemalteco de la Investigación de la Caña) cerca del 8.5 -13% del producto interno bruto (PIB) agrícola guatemalteco, lo que constituye el 3 % de PIB total. Guatemala es el tercer exportador a nivel de América Latina de azúcar de mesa, con cerca de 1,200,000 toneladas métricas anuales al mercado mundial (incluyendo a Estados Unidos), según datos de la zafra 2000 / 2001 (21).

Guatemala es el mayor productor y exportador de azúcar en el Istmo Centroamericano, posee el mayor porcentaje de hectáreas cultivadas en el Istmo con el 41 % de la tierra cultivada para el azúcar en toda Centroamérica, además el mayor rendimiento de la región, que a su vez es creciente (21).

Sin embargo este crecimiento no es proporcional al gasto en investigación del proceso de la caña de azúcar, ya que los principales estudios van enfocados principalmente hacia estudios de ingeniería industrial, por lo que se conoce poco acerca de procesos químicos internos, lo que hace útil cualquier estudio que pueda ayudar a investigar estos parámetros, lo que incidirá en reducción de costos y optimizar la producción, para que pueda competir mejor a nivel mundial y el producto pueda llegar a tener mejor aceptación en el mercado.

Actualmente, en la industria del azúcar, se utiliza el método de Fehling (Eynon-Lane), para la cuantificación de azúcares reductores. Este método por ser volumétrico es exacto, pero posee la deficiencia de tener un punto estequiométrico poco perceptible, y un tiempo largo de análisis, el cual es extenso para fines industriales. Otro método utilizado, sólo en algunos ingenios por el costo del aparato, es el uso de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con detector de índice de refracción, este método, es caro y el detector que posee no es selectivo. Por lo que este nuevo método enzimático es una buena alternativa, rápida y precisa, ya que el método de Eynon Lane, tiene un tiempo medio de 3 horas 20 minutos para 20 muestras, mientras el método enzimático se estima en aproximadamente 1 hora 30 minutos por cada 50 muestras (6).

En cuanto a Implicaciones ambientales, existe la posibilidad de eliminar la carga de cobre al medio al utilizar el método de Eynon Lane, que al llegar a cuerpos de agua receptores, pueden empeorar la calidad del agua, mientras que para métodos fotométricos, existen metodologías para tratar compuestos coloreados por lo que este método es mucho más amigable con el ambiente que el método de referencia.

Al lograr cuantificar azúcares reductores puede conocerse la calidad del producto, por ello es un análisis importante en la línea de producción, y más importante en la producción de azúcar en Guatemala, donde se tiene una de las mejores eficiencias a nivel mundial y donde la pérdida de rendimiento por hidrólisis de la sacarosa es baja. Además este análisis debe realizarse a lo largo de la cadena de producción, para monitorear el rendimiento e identificar los puntos de pérdida.

V. OBJETIVOS

*Ustedes no pueden conocerse a sí mismos
sin objetivarse a sí mismos; es decir, sin hacer
de sí mismos un objeto de conocimiento.*

Hegel, The Phenomenology of Mind

5.1. Objetivo General:

1. Validar un método enzimático para la determinación de azúcares reductores en jugo de caña, presentes a lo largo de la producción de azúcar, utilizando como referencia y comparación los datos obtenidos por el método de Eynon Lane.

5.2. Objetivos Específicos:

1. Encontrar la precisión del método enzimático para la cuantificación de azúcares reductores en jugo de caña.
2. Encontrar la exactitud del método enzimático para la cuantificación de azúcares reductores en jugo de caña.
3. Encontrar la sensibilidad del método enzimático para la cuantificación de azúcares reductores en jugo de caña.
4. Implementar una metodología más económica y rápida para la cuantificación de azúcares reductores, por vía enzimática (glucosa oxidasa) en un ingenio de la zona sur de la República de Guatemala.

VI. HIPÓTESIS

Primum Vivere, Deinde Philosophari
Adagio atribuido a Aristóteles

No existe una diferencia mayor al 10% al realizar una comparación de los resultados analíticos obtenidos en el análisis de azúcares reductores en muestras de jugo de caña de azúcar en el proceso de elaboración de azúcar (jugos de cosecha, molinos, sulfitado, alcalizado y clarificado) entre un método enzimático (Glucosa Oxidasa) y el método de Eynon Lane.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

*El mundo no ha cambiado por la política
sino por la técnica.*
Friedrich Dürrenmatt

7.1. Universo de trabajo:

Jugo de las distintas etapas de producción de azúcar blanca y cruda (cosecha, molinos, sulfitado, alcalizado y clarificado). Muestras de Trabajo: 60 gramos de jugo que pasa desde su evaluación en cosecha hasta su clarificación. Se recolectaron 76 muestras en distintos procesos de producción para análisis de precisión.

7.2. Selección de muestra:

El muestreo se realizó por medio de un equipo de muestreo (tuberías instaladas en cada área de producción llamados muestreadores), el cual toma muestra de forma automática dentro de la misma línea de producción, así se logra un muestreo real con el cuál puede tomarse medidas correctivas, por lo que el equipo ya está instalado en el parque industrial (ingenio), estas muestras deben ser analizadas en los primeros 30 minutos después de su recolección, ya que por acción bacteriana pueden descomponerse.

7.3. Medios:

7.3.1. Humanos:

Estudiante: Mario Manuel Rodas Morán

Asesores: Licda. Diana Pinagel Cifuentes

Lic. Oscar Monzón Barrientos.

Colaboradores: Personal Técnico y profesional del Laboratorio de un Ingenio en la

zona sur de la República de Guatemala

7.3.2. Institucionales:

Biblioteca de Cengicaña, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Biblioteca del Departamento de Química Orgánica y Laboratorio de análisis de un Ingenio en la zona sur de la República de Guatemala

7.4. Materiales:

7.4.1. Equipo:

1. Pipeta automática ajustable de 2-20 microlitros.
2. Pipeta automática ajustable de 1-5 mililitros.
3. Espectrómetro UV – Visible, marca Perkin Elmer, modelo Lamda II.
4. Cubeta de cuarzo de 1 cm.
5. Estufa.
6. Balanza semianalítica marca "OHAUS".
7. Balanza analítica marca Metler.
8. Agitador tipo Vortex.
9. Cronómetro.
10. Cápsula de porcelana
11. Cápsula de metal.
12. Agitador magnético.

7.4.2. Cristalería:

1. Tubos de ensayo de 3 mL.
2. Vasos de precipitados de 100 mililitros, 250 mililitros y 1000 mililitros.
3. Balones aforados de 100 mL., 250 mL. Y 500 mL.

4. Puntas para pipeta automática.
5. Puntas para pipeta volumétrica.
6. Pipeta volumétrica de 10 mL.
7. Bureta de 25 mL ó 50 mL.
8. Matraz erlenmayer de 250 mL.
9. Agitador magnético.
10. Embudo de vidrio.
11. Varilla de agitación.

7.4.4. Otros:

1. Papel filtro de poro fino, (Whatman® N. 29).
2. Gradilla.
3. Bulbo para pipeta.
4. Soporte universal.
5. Pinza para bureta.
6. Vaso para muestreo.
7. Pizeta

7.4.3 Reactivos:

1. Solución de Glucosa
2. Reactivo de Glucosa oxidasa con las siguientes especificaciones (este es vendido comercialmente):
 - a.1) 4 aminofenazona (0.5 mmol/L)
 - a.2) Fenol (10 mmol/L)
 - a.3) Glucosa oxidasa –GOD-(15 U/L)
 - a.4) Peroxidasa del rábano –HRP- (10U/L)
 - a.5) Solución amortiguadora de Fosfatos.

3. Solución de Cloruro de sodio (9 g / L) (opcional)
4. Solución de Oxalato de potasio al 5%
5. Solución de Sulfato de cobre (Fehling "A")
6. Solución de Tartrato de sodio, potasio e hidróxido de sodio (Fehling "B")
7. Subacetato de plomo (solución al 5% p / v)
8. Oxalato de potasio.
9. Indicador Azul de metileno.
10. Agua desmineralizada.

7.5. Metodología:

7.5.1 Método de Eynon Lane:

7.5.1.1. Se pesó 40 gramos de jugo de caña en cápsula, pesados en balanza semianalítica.

7.5.1.2. Se depositó en un balón aforado de 200 mililitros. Realizar trasvase cuantitativo.

7.5.1.3. Se adicionó 5 mililitros de Subacetato de plomo al 5 % y 5 mililitros de oxalato de potasio al 10 % p/V, seguidamente, se aforó con agua el balón hasta un volumen de 200 mililitros.

7.5.1.4. Se filtró esta solución.

7.5.1.5. Se colocó este filtrado en la bureta de 100 mililitros.

- 7.5.1.6. Se colocó 5 mililitros de solución Fehling "A" y 5 mililitros de solución de Fehling "B", además 25 mililitros de agua destilada en un matraz erlenmeyer.
- 7.5.1.7. Se agitó la mezcla y se colocó seguidamente en la estufa para llevarla a ebullición.
- 7.5.1.8. Cuando se llevó a ebullición se adicionó 3 gotas de indicador azul de metileno.
- 7.5.1.9. Se agregó 15 mililitros de la solución contenida en la bureta.
- 7.5.1.10. Se esperó por 30 segundos para que la solución reaccione con la solución de Fehling.
- 7.5.1.11. La titulación continúa, por efecto de adición de filtrado, dependiendo del viraje que presente. La titulación se debió hacer en menos de 3 minutos y por duplicado.
- 7.5.1.12. El punto se determinó por la formación de precipitado color rojo ladrillo y decoloración del indicador azul de metileno.

7.5.2. Método Enzimático (Glucosa Oxidasa)

- 7.5.2.1. Preparación de curva de comparación:
- Soluciones recomendadas por la calidad del jugo de Caña de azúcar en Guatemala son: 2.00, 4.00, 8.00 y 12.0 mM de Glucosa, para ello se pesó con exactitud 36.04g de glucosa en un balón aforado de 1000 mililitros.

- De estas soluciones se tomó 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6mL y 8mL y se agregaron en diferentes balones aforados de 100 mL.

7.5.2.2. Desarrollo de Color:

Se tomaron 6 tubos de ensayo de 5 mL, en ellos se colocó, con ayuda de una pipeta automática, 2.0 mL de solución de reactivo de glucosa oxidasa. En uno se colocó 20.00 μ L de agua destilada o desionizada, este fue el blanco, ahora se continuó con cada tubo, agregando 20.00 μ L de cada solución patrón. Se agitan con ayuda de agitador tipo vortex, estos se dejan reposar por un tiempo de 20 minutos, a partir de ahí, el color es estable por 60 minutos, luego se obtuvo la absorbancia con ayuda de un espectrofotometro UV/VIS, a un longitud de onda de 505 nanómetros.

7.5.2.3. Preparación de la muestra:

Se pesó con exactitud 60.0 g de jugo de caña, en un balón aforado de 200 mL, se agregan 5 mL de oxalato de potasio al 10% p/v, para eliminar el calcio presente que pueda acomplejar a la glucosa. Este se afora a volumen de 200 mL con agua.

7.5.2.4. Desarrollo de Color:

Se tomó tubos de ensayo de acuerdo al número de muestra, en cada tubo se agregó 2.0 mL de solución de reactivo de Glucosa Oxidasa, y se agregó a cada tubo 20.00 μ L de muestra, se agitan con un agitador vortex, la mezcla se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo, la mezcla es estable por 60 minutos, se obtuvo la absorbancia a una longitud de onda de 505.0 nm, en una cubeta de cuarzo de 1 cm.

7.5.2.6. Desechar en envase de vidrio.

7.6. Cálculos:

Para el Método de Eynon Lane:

Los cálculos de los azúcares reductores se realizaron por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Azúcares reductores} = \frac{(\text{factor Fehling}) (\text{volumen de aforo})}{(\text{masa de muestra}) (\text{mililitros gastados})} * 100$$

Para el método enzimático:

Con las soluciones patrón de Glucosa se realizó una curva de calibración de la forma:

$$[\text{Glucosa}] = m [\text{Absorbancia}] + b$$

Donde: m es la pendiente y b el intercepto

Se sabe que 5.0 mmol es equivalente a 0.9g de glucosa y una solución 5.0 milimolar contiene 0.09 g de glucosa/100 ml.

Ya teniendo la concentración de glucosa en g por decilitro los gramos de glucosa y fructosa contenidos en la muestra se calculó así:

$$\text{g de Glucosa} = \frac{\text{Concentración de glucosa (g/dl)} * \text{volumen de aforo}}{100}$$

Debido al equilibrio glucosa - fructosa de 1:1 se calculó los g de fructosa

$$\text{g de Fructosa} = \frac{\text{g de Glucosa}}{1}$$

Entonces el porcentaje de azúcares reductores en el jugo de caña se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Azúcares reductores} = \frac{\text{g de Glucosa} + \text{g de Fructosa}}{\text{masa de la muestra}} * 100$$

7.7. Análisis estadístico:

El tratamiento estadístico consistió en medir el coeficiente de variación en porcentaje que presente el método enzimático (Glucosa Oxidasa) y el método de referencia (Eynon Lane).

Como prueba estadística se utilizó estadística inferencial, del tipo t de student, para evaluar diferencias significativas respecto a las medias de ambos métodos. Además análisis de Varianza unidireccional como Análisis factorial de Varianzas, para encontrar Repetibilidad y Reproducibilidad del método.

Para el análisis de resultados y poder tener conclusiones válidas se encontraron las posibles diferencias cuantificables entre los dos métodos por lo que se plantearon las siguientes variables estadísticas:

$$H_i \equiv X_1 = X_2$$

$$H_o \equiv X_1 \neq X_2$$

Donde: X_1 se define como concentración de azúcares reductores por método enzimático.

X_2 se define como concentración de azúcares reductores por medio de método de Referencia de Eynon Lane.

VIII. Resultados:

As far as the laws of mathematics refer to reality they are not certain; and as far as they are certain. They do not refer to reality
Albert Einstein

8.1. Análisis de Exactitud

Tabla 8.1.1

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas
(Método ICUMSA contra Método Alternativo)

	%AR/Eynon L	%AR/enzimatico
Media	0.48	0.43
Varianza	0.025	0.021
Observaciones	77	77
Coefficiente de correlación de Pearson	0.992	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	76	
Estadístico t	18.39	
P(T<=t) una cola	5.15E-30	
Valor crítico de t (una cola)	1.67	
P(T<=t) dos colas	1.031E-29	
Valor crítico de t (dos colas)	1.99	

Tabla 8.1.2

Análisis de Concordancia entre Métodos

	%AR/Eynon L	%AR/enzimatico
Media	0.48	0.43
Varianza	0.025	0.021
Varianza de Diferencias	0.00060	
Diferencia de medias	0.051	
r_c	0.93	

Tabla 8.1.3

Estadística de Recta de Comparación

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.992
Coefficiente de determinación R ²	0.984
R ² ajustado	0.983
Error típico	0.0184
Observaciones	77

Tabla 8.1.4
Análisis de Varianza para Recta de Comparación.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Significancia de F
Regresión	1	1.54	1.54	4527.79	8.28E-69
Residuos	75	0.025	0.00034		
Total	76	1.56			

Tabla 8.1.5.
Prueba de Hipótesis.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
A	-0.0017	0.0068	-0.26	0.80	-0.015	0.012
B	0.90	0.013	67.29	8.28E-69	0.87	0.92

Pruebas de hipótesis sobre la pendiente y el intercepto (t de student)

Ho $\beta=1.00$

T -7.72
p<0.00001

Ho $\alpha = 0.00$

T -0.28
p=0.80

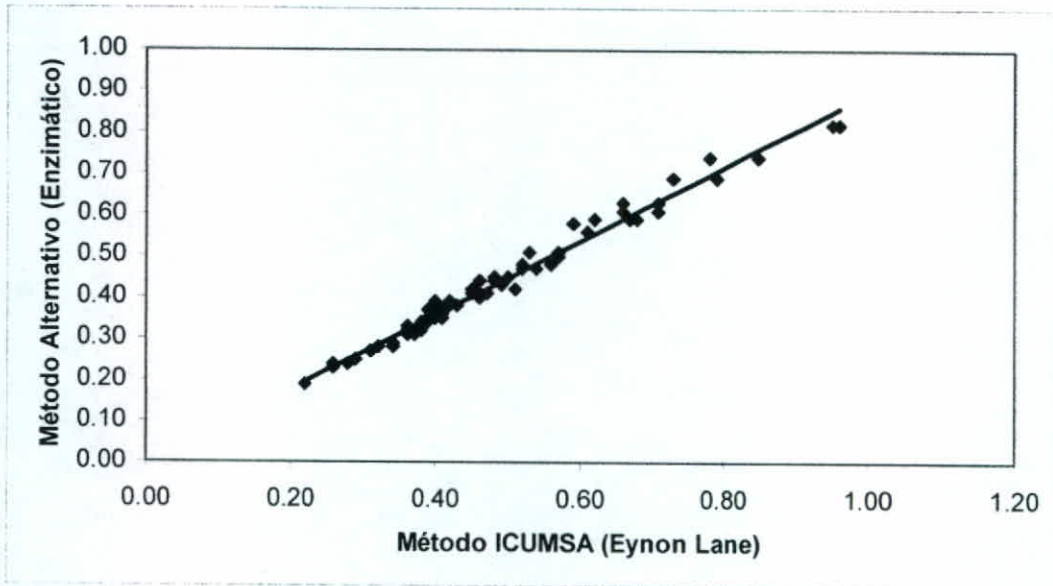
Al utilizar solo un rango de 0.1 % a 0.6% de azúcares reductores en jugo de caña entonces se obtiene los siguientes coeficientes:

Tabla 8.1.6
Coeficientes para un rango de 0.1 % a 0.6 % de Azúcares Reductores

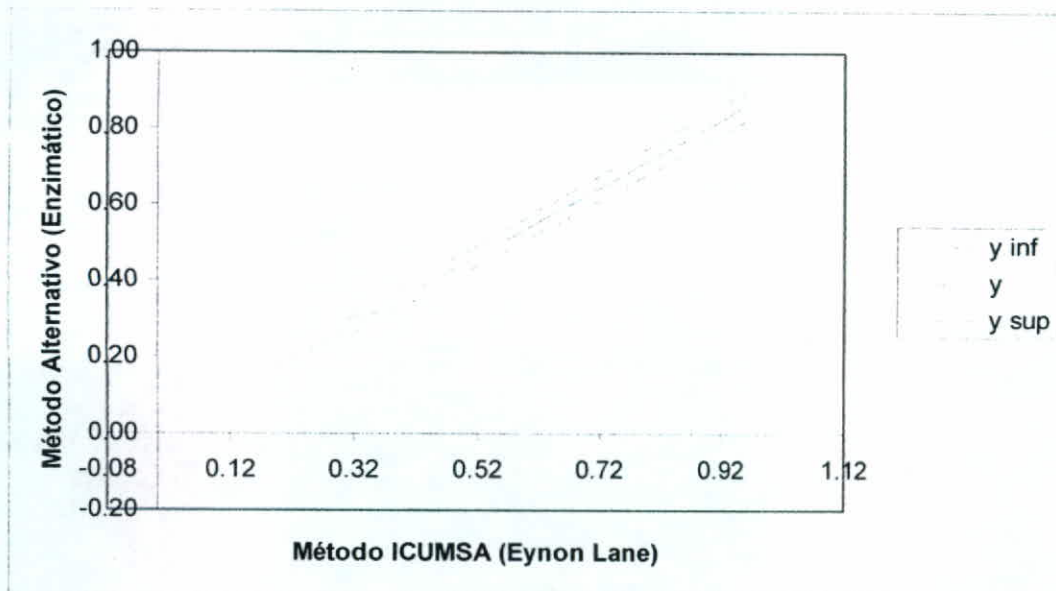
Variable	Coefficiente
Intercepto	-0.0020
Pendiente	0.96

Con estos coeficientes se logra significancia estadística.

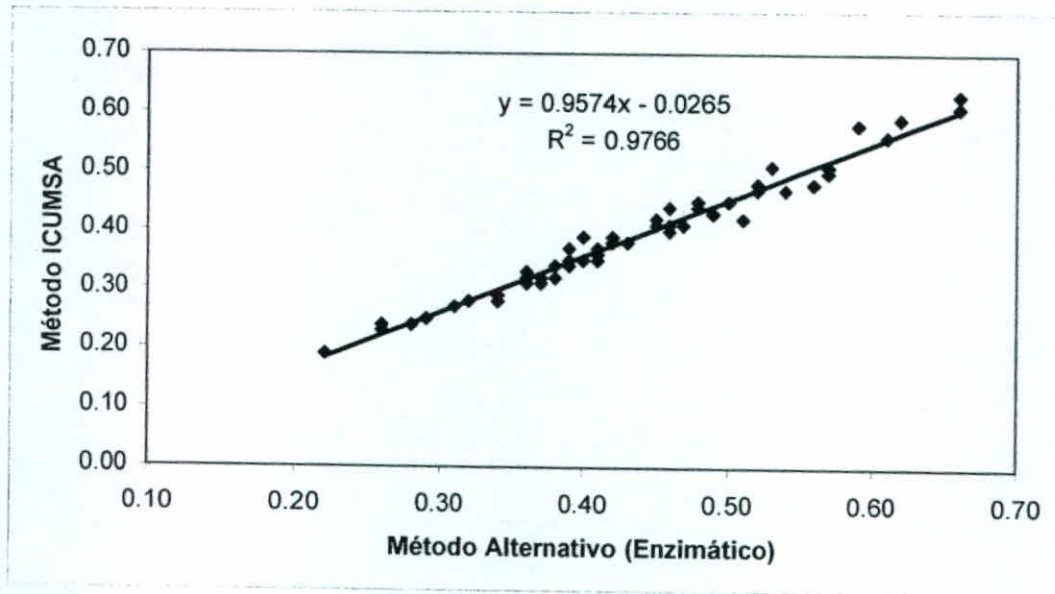
Gráfica 8.1.1
Comparación de Métodos Analíticos



Gráfica 8.1.2
Prueba a dos Colas.



Gráfica 8.1.3
Curva de Comparación en un rango 0.1 % a 0.6 %
de Azúcares Reductores en Jugo de Caña



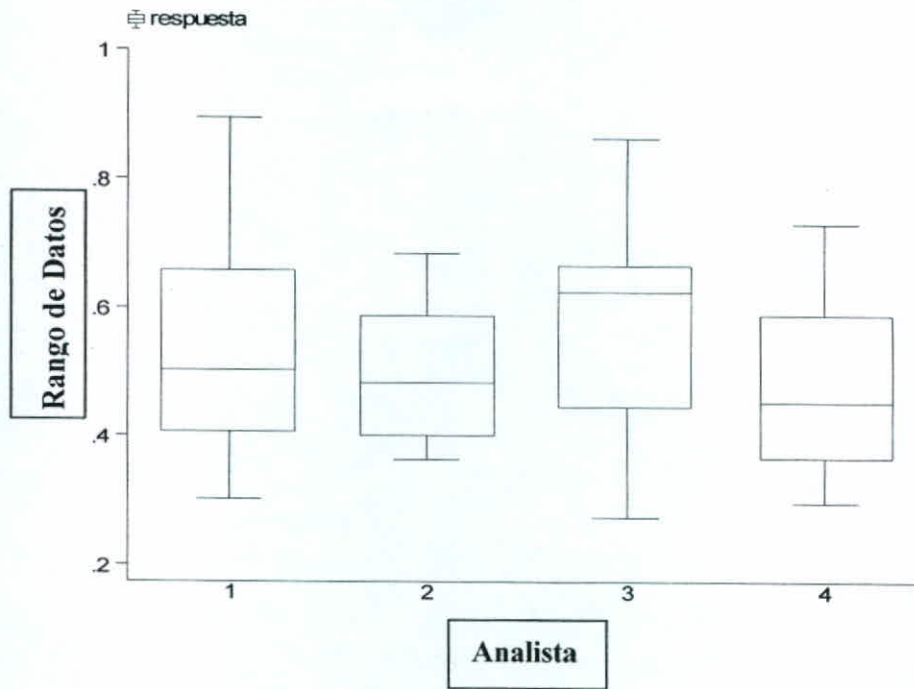
8.2. Análisis de Repetibilidad y Reproducibilidad

Tabla 8.2.1

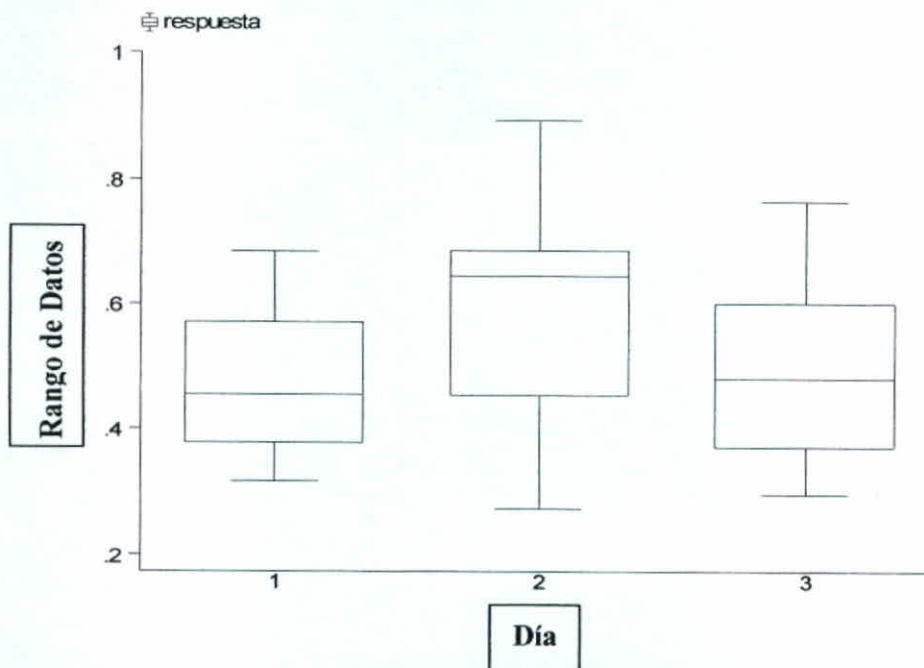
Análisis de Varianza del Método Enzimático
Entre Analistas y Días

Fuente	Sumatoria de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor F	Significancia de F
Modelo	0.16	5	0.032	1.46	0.22
Analista	0.020	3	0.0065	0.30	0.83
Día	0.11	2	0.054	2.46	0.095
Residuo	1.18	54	0.022		
Total	1.34	59	0.023		

Gráfica 8.2.1

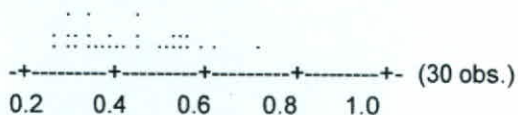


Gráfica 8.2.2

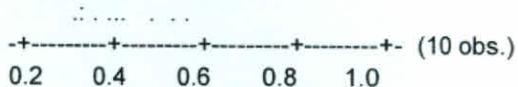


Gráfica 8.2.3 Dispersión de Datos en el Método Enzimático por Analista

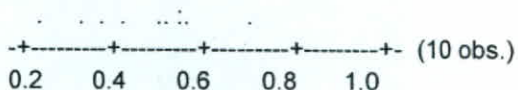
-> analista=1



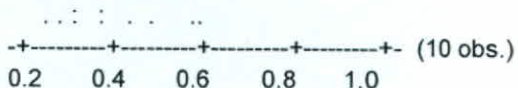
-> analista=2



-> analista=3



-> analista=4



8.3. Análisis de Precisión

Tabla 8.3.1

Resumen de Variables Estadísticas de 4 muestras medidas con el Método Enzimático Aleatorias en el Día.

Muestra	Media	Desv. Estándar	Coficiente de Desviación (CV)	Frecuencia
1	0.47	0.019	4.09	20
2	0.44	0.016	3.67	20
3	0.88	0.047	5.29	20
4	0.27	0.022	8.09	20
Total	0.52	0.23	44.18	80

Tabla 8.3.2.

Análisis de Varianza para 4 Grupos de
Muestras Medidas con el Método Enzimático

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Medias Cuadráticas	Razón F	Significancia de F.
Entre Grupos	4.03	3	1.34	1640.57	0.0000
IntraGrupos	0.062	76	0.00082		
Total	4.10	79	0.052		

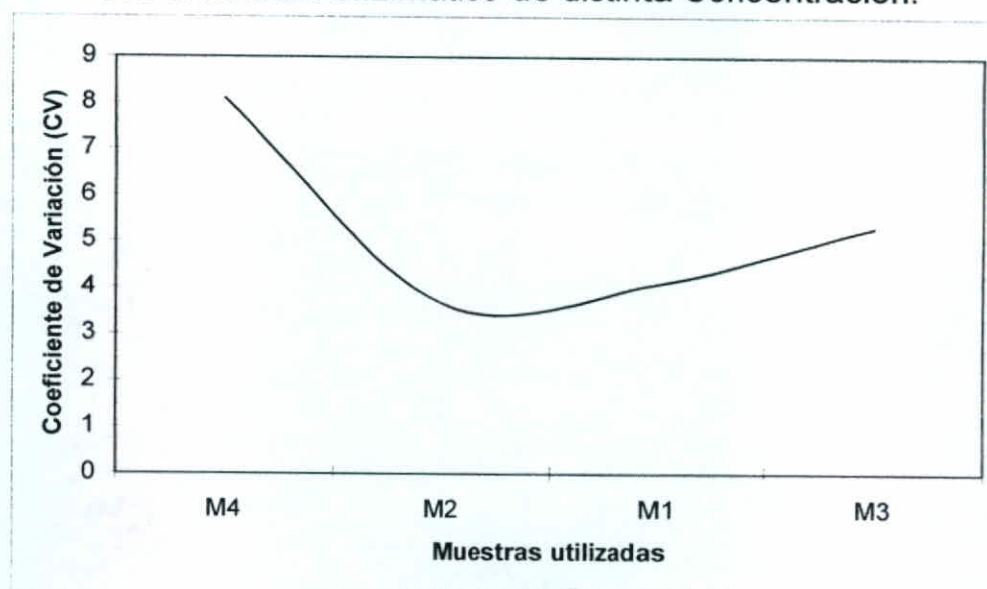
Gráfica 8.3.1

Comparación de Respuesta por Muestra
(Bonferroni)

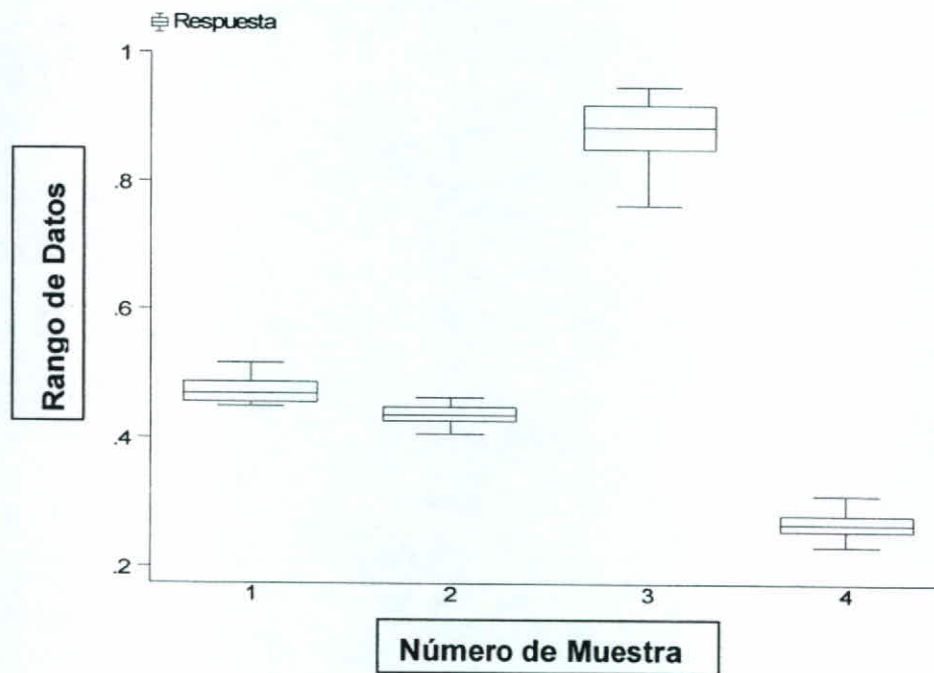
Fila Media- Columna Media	1	2	3
2	-0.035376 0.001		
3	.40718 0.000	.442556 0.000	
4	-.204168 0.000	-.168792 0.000	-.611348 0.000

Gráfica 8.3.2

Coefficiente de Variación de 4 muestras medidas
con el método enzimático de distinta Concentración.



Gráfica 8.3.
Caja Turkey para Muestras en ensayo de Precisión



8.4. Linealidad:

Tabla 8.4.1.
Concentración de Glucosa medida con el
Método Enzimático contra Absorbancia

Concentración de Glucosa (mM / milimoles/ Litro)	Concentración de Glucosa (mg/dL)	Absorbancia
0	0	0
2	36	0.157
4	72	0.298
5	90	0.375
8	144	0.548
12	216	0.756

Con estos datos se obtuvo una curva de calibración. Está se hizo día con día de análisis, dando resultados similares. La curva es:

$$Y = 285.08X - 8.3944$$

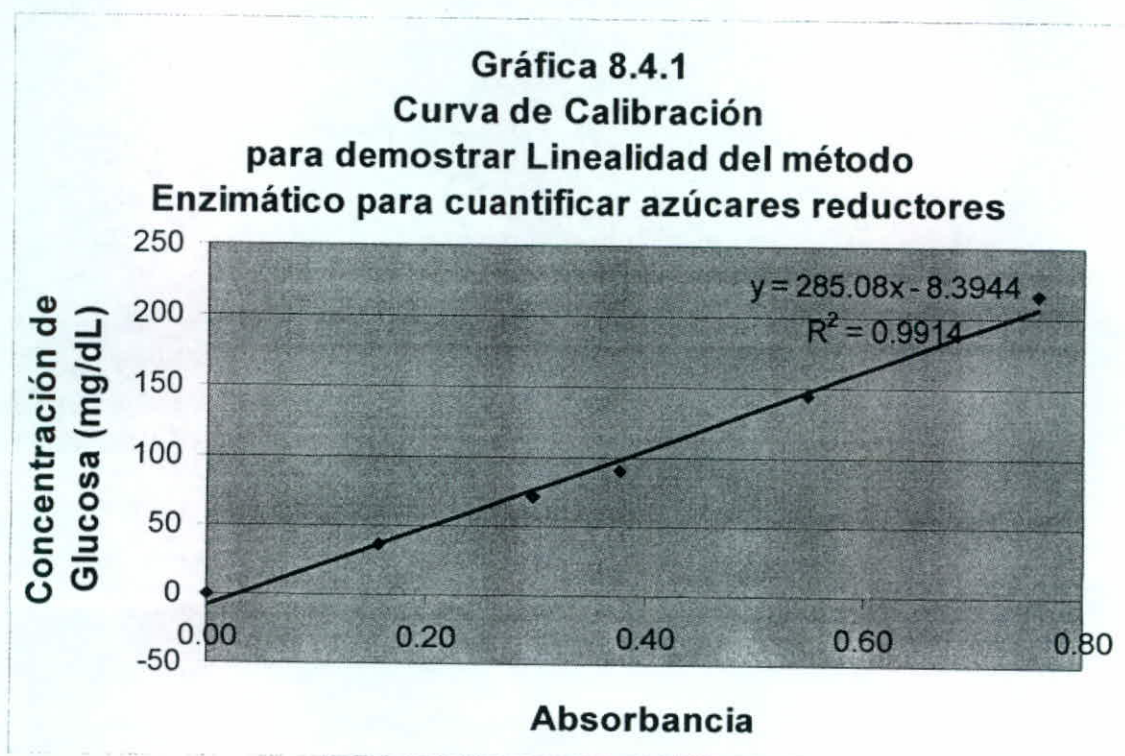
$$r^2 = 0.9914$$

Donde:

Y = Concentración de Azúcares Reductores en mg/dL.

X = Absorbancia dada por el espectrofotómetro utilizado.

r^2 = Coeficiente de Regresión Lineal.



IX. Discusión de Resultados

Toda hipótesis que merezca ser adoptada es compatible con la ciencia contemporánea y, por lo tanto, debe sostenerse o caer con ella.

Charles Peirce.

En la Validación de Métodos Analíticos, se utiliza diferentes criterios para aceptar un método como alternativo, y para el presente estudio se comparó un método enzimático con Glucosa Oxidasa, con el método oficial ICUMSA, el cual rige los sistemas de aseguramiento de la Calidad en la industria azucarera internacional. Estos parámetros medidos fueron:

9.1. Linealidad

Existen dos parámetros que indican una respuesta lineal del método enzimático, la primera, la curva de regresión lineal, con r^2 de: 0.991 comparando la respuesta de absorbancia dada por el espectrofotómetro y la concentración de Glucosa de soluciones Estándar, y la respuesta entre las muestras medidas con el método oficial ICUMSA (Eynon-Lane) con el método alternativo a validar (Enzimático Glucosa Oxidasa), con un Coeficiente de regresión lineal de: 0.992. (Tabla 8.1.1) El cual presenta una alta linealidad, Por lo que el método es confiable en un rango de 0.10 % (peso/peso) a 1.00 % (peso/peso) de Azúcares reductores por Jugo de Caña.

Por los resultados ya expuesto, no se hace notar interferentes que alteren la linealidad del método, ya que siempre existe correlación entre la respuesta del aparato y la concentración del analito (Glucosa), como la relación entre la concentración de Azúcares reductores medidos por ambos métodos. La relación muestra que no interfieren otros compuestos orgánicos presentes en el jugo de caña a la linealidad del método.

Las gráficas 8.3.1 y 8.3.2 representan correlaciones muy fuertes, con tendencias ascendentes, pero una mayor dispersión a medida que la concentración de Azúcares reductores crece, esto es algo típico acerca de la selectividad de métodos enzimáticos (26, 24, 9), y más cuando se utilizan dos enzimas, como se utilizaron en este estudio (Glucosa Oxidasa y Peroxidasa del Rábano). Por lo que el método pierde linealidad a medida que la concentración de azúcares reductores aumenta.

9.2. Exactitud:

Las muestras analizadas con el método oficial (ICUMSA) a su vez se analizaron con el método alternativo (Enzimático), se parearon estas muestras, para conocer la exactitud del método alternativo (Enzimático), tomando como variable independiente la concentración de Azúcares Reductores medida por el método oficial. Con esto en la Tabla 8.1.1 y 8.1.2 se indica una buena concordancia, el método enzimático es 93% similar al método ICUMSA, en cuanto a concordancia se refiere.

Además en estas tablas, 8.1.1 y 8.1.2 se hace notar la prueba de t de student y la varianza, las cuales son pruebas útiles a todos niveles al comparar dos grupos en estudio, (concentración de Azúcares reductores determinado con el método oficial y la concentración de Azúcares reductores determinado con el método alterno) con las consideraciones ya expuestas con anterioridad, el valor de t de Student tanto a una cola como a dos colas son superiores a su valor crítico.

Otros resultados que afirman lo anteriormente expuesto, se encuentran en la tabla 8.1.3 donde ya se mostró la relación lineal que se guarda, esto al hablar en términos de exactitud, indica que existe una correlación lineal significativa entre los dos métodos con un r^2 de 0.992.

Por otro lado, las gráficas 8.1.1 y 8.1.2 indican que el método pierde exactitud a medida que la concentración de Azúcares reductores se incrementa, esto es un fenómeno, no solo estipulado en la ley de Beer-Lambert (24) acerca de métodos espectrofotométricos, sino además es una falla en la selectividad de métodos enzimáticos, en especial los que utilizan más de dos Enzimas para la determinación de un analito (26), para este estudio en específico la Glucosa relacionada a Azúcares reductores.

El punto anterior tiene fundamento, al realizar el Análisis de Varianza (ANOVA, cuando se requiere de un paquete estadístico para computadora) el cual se encuentra en la tabla 8.1.4, donde se muestra que la suma de cuadrados de la varianza es baja, lo cual nos indica que hay poca variabilidad, sin embargo el coeficiente b posee un valor de 0.89, estando desviado, ya que un coeficiente aceptable es de 1.00.

Sin embargo, el coeficiente a , es bastante cercano a 0, lo que indica que la recta de comparación parte de 0, por lo que los dos métodos en una regresión múltiple tienen el mismo intercepto, no así la misma pendiente; el método alternativo genera datos siempre menores (ver anexos), a los que se cuantifican con el método oficial.

Al utilizar una variable dependiente, esta se mide sin lugar a duda de acuerdo al intervalo en el cual se realiza el muestreo (23 y 24), por lo que al realizar la medición en un intervalo de 0.10 % a 0.70 %, se denota que la pendiente se acerca significativamente a 1 y llega a un valor de (0.96) (tabla 8.1.6) por lo que la variable de investigación para exactitud es aceptada, si y solo si, se encuentra en este intervalo.

Por otro lado, existen algunos interferentes que dependen exclusivamente del método, hay que decir que el método por lo ya mencionado con anterioridad, es poco selectivo a altas concentraciones de azúcares reductores, sin embargo en cuanto a exactitud se refiere, posee la limitación de que no se conoce con

exactitud la relación de Glucosa y Fructosa, para el estudio; por facilidad se tomó una relación de 1:1, esto puede variar, depende de otros efectos, principalmente el pH. (9) Esto según Hortwitz (3) lo hace que pierda exactitud, quizá no significativa, pero explica y nos da la razón del error del método.

9.3. Precisión

Una de las características más importantes de la Validación del método alternativo es la precisión. Esta característica fue evaluada y se muestran los resultados en la tabla 8.3.1, la cual muestra un resumen de la estadística descriptiva que se le aplicó a 4 muestras distintas una seria repetida de ensayos analíticos del método enzimático, y se aprecia que en todos los casos el coeficiente de variación es menor a 10 %, que según Hortwitz, es el aceptable cuando se tiene analitos que van del orden de 0.10 - 1.00% (ver tabla de Anexos).

Los datos se encuentran poco dispersos, esto se hace notar en la desviación estándar de la muestra, la cuál es un parámetro descriptivo, pero evalúa una incertidumbre para el método, la cual no es grande; por lo que se aprecia la más grande se dio en la muestra 3, con una desviación estándar de ± 0.047 , la cual presenta mayor concentración de Azúcares reductores que las demás.

El Análisis de Varianza en la tabla 8.3.2 muestra un análisis por paquete de computadora, el cual nos da la razón F y la significancia de F, la cual resulta ser significativa, lo que nos indica que hay diferencia entre grupos, algo que se sabe *a priori*, ya que los grupos no vienen de la misma muestra sino de muestras diferentes, y lo más importante a resaltar en el análisis de varianza es que no hay diferencia dentro de los grupos de estudios, lo cual indica que el método es exacto, por lo que se acepta la hipótesis de investigación, al no existir diferencia significativa entre las repeticiones de una misma muestra homogénea.

Por otro lado los resultados ya presentados, muestran que no existen interferentes en la precisión del método, al visualizar la gráfica 8.3.1 se denota una curva muy normal para métodos analíticos, a bajas y altas concentraciones el coeficiente de variación se incrementa (3), por lo que este fenómeno es normal para un método analítico.

La gráfica 8.3.3. muestra una gráfica de Caja de Tukey que compara la dispersión de los datos, en ella se visualiza que el mayor rango de datos, se encuentra en la muestra 3, la cual posee la concentración mayor de azúcares reductores. Esto muestra que el método pierde alguna precisión, no significativamente, a altas concentraciones. Esto se debe a dos factores, el primero: la selectividad de métodos enzimáticos que utilizan dos enzimas y las desviaciones "naturales" a la ley de Beer Lambert.

9.4. Reproducibilidad y Repetibilidad.

La Reproducibilidad y Repetibilidad son medidas de la precisión del método, solamente que depende de factores externos, analistas que realizaron el ensayo o días en que se realiza el ensayo. Este aspecto es necesario para validar el método alternativo, pues el método debe ser robusto a factores externos.

En la tabla 8.2.1, se tiene un análisis de Varianza, en ella se muestra que la razón F y la significancia de F, muestra que, entre Analistas y Días, no hay diferencia significativa entre días ni entre analistas, por lo que el método es Reproducible y no depende de factores externos.

Sin embargo, el análisis de varianza de la tabla 8.2.1, da evidencia contundente que las muestras son diferentes, esto es algo que falló en el

momento de proponer el diseño de la investigación, pues con una misma muestra el argumento del párrafo anterior tendría una contundencia mayor.

Además el hecho de que no existe diferencia significativa entre analista, muestra que el método no posee error sistemático, ya que al utilizar de buena forma equipo calibrado el analista no tiene problema al utilizarlo, en otras palabras, el personal técnico de un laboratorio en la industria azucarera puede aprender a utilizar el método y cuantificar azúcares reductores. Por lo que la robustez del método queda demostrada, y este hecho hace que el método pueda ser implementado en un laboratorio de Caña o de Control de la calidad en producción.

Qué el método no dependa del día en que se hace el análisis, solo reafirma lo anteriormente expuesto, el método enzimático puede utilizarse como técnica confiable, no sujeta a errores sistemáticos significativos.

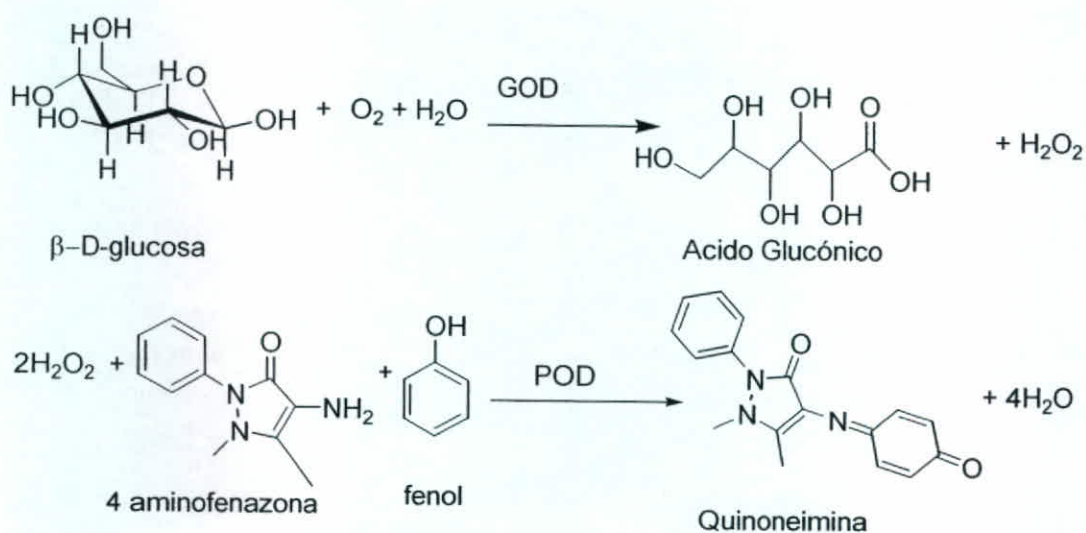
Por otro lado, en la gráfica 8.2.1; gráfica 8.2.2; gráfica 8.2.3, se denota una dispersión significativa de los datos, esto como ya se expuso, es debido a que las muestras son de diferente concentración de azúcares reductores, y de diferente muestreo, por lo que es de esperarse que la dispersión sea significativa.

9.5. Argumentos a cerca de la Reacción Química:

Según la literatura (9, 26, 15) el pH puede desnaturalizar la enzima y afecta directamente a la medición, es por está razón que el reactivo a utilizar (comercialmente fabricado por DiaSys, con el nombre Glucosa GOD FS y número de catálogo N. 1 2500 99 10 026) posee una solución Tampón para eliminar este efecto, el cual no interfiere en la cuantificación de azúcares reductores, hay que añadir que el jugo de Caña posee variable pH,

dependiendo del proceso, y va desde 4.5 hasta 8.0 en la escala de pH, esta variación es neutralizada por el tampón del reactivo.

Los resultados e inferencias planteadas indican razón que el método es selectivo y cuantitativo para azúcares reductores. Esto se debe a la reacción que procede de una forma selectiva, donde se sabe que el primer paso es la oxidación de la glucosa del jugo de caña por medio de la enzima glucosa oxidasa y la reducción del agua que forma peróxido que es proporcional a la formación de un compuesto indámico, con ayuda de una segunda enzima, que es la peroxidasa del rábano, esto se muestra en la siguiente reacción.



Este compuesto indámico (Quinoneimina) se encuentra reportado en la literatura (15) que absorbe a una longitud de Onda de 505 nm, por lo que esta fue la longitud de onda utilizada para todos los ensayos del presente estudio de validación.

La temperatura afecta la cinética de la reacción (9), de esta forma el ensayo analítico se realizó siempre bajo las condiciones de temperatura de laboratorio

(30 ± 5 °C) con ello el método para ser válido no debe someterse a cambios bruscos de temperatura.

El oxalato de potasio, juega un papel importante en el método, sin este, la glucosa no se encuentra disponible en el jugo de caña, sino asociada a otros compuestos orgánicos (6) el oxalato de potasio logra que la glucosa se encuentre disponible, haciéndola cuantificable.

Por último, cabe advertir que las enzimas no tienen un tiempo de vida grande, por lo que es importante trabajar con reactivos recientes y no caducos, sin esto el método puede no ser válido y dar resultados poco confiables.

X CONCLUSIONES

Los filósofos no han hecho más que interpretar el mundo, ahora de lo que se trata es de transformarlo

Theses on Feuerbach

- 10.1. El método enzimático planteado en la presente investigación es válido en un intervalo de 0.10 % a 0.60 % (p/p) de azúcares reductores en el Jugo de Caña, presentes a lo largo de la producción de azúcar. Por lo que la hipótesis de la investigación es aceptada.
- 10.2. El método enzimático puede ser utilizado como sustituto del método oficial, al ser 93 % similar al método oficial ICUMSA.
- 10.3. El método enzimático planteado en la investigación posee buena exactitud al contar con un coeficiente de concordancia de 0.93 con el método ICUMSA, además de poseer una relación lineal con este al presentar un r^2 de 0.992.
- 10.4. El método enzimático planteado en la presente investigación es preciso ya que posee un coeficiente de desviación menor al 10% y reproducible al no presentar diferencia significativa en análisis de varianza, por lo que es tolerante a factores externo y no se ve afectado por errores sistemáticos.
- 10.5. El método enzimático que se plantea en esta investigación es poco sensible a altas concentraciones (arriba de 0.70% p/p de azúcares reductores), perdiendo linealidad, exactitud y precisión.
- 10.6. El método enzimático que se sugiere en el presente trabajo de investigación, puede ser implementado como metodología analítica en la industria azucarera guatemalteca de acuerdo al plan de aseguramiento de la calidad que tenga cada ingenio en específico.

XI. RECOMENDACIONES

*En el momento en el que encuentre
La verdad que me cabe,
Dejaré de preguntar.*

Onésimo Almeida.

- 11.1. Por la poca sensibilidad del método a altas concentraciones es recomendable utilizar menos jugo de caña en esas muestras, para preparar una solución más diluida.
- 11.2. Validar el método enzimático para mieles y jarabes, ya que es selectivo para glucosa.
- 11.3. Utilizar únicamente pipeta automática para medición de volúmenes menores a 5mL.
- 11.4. Evaluar costos en ambos métodos para considerar, una situación de costo contra tiempo, y realizar análisis más rápidos pero con un menor costo económico.
- 11.5. Se sugiere seguir promoviendo validación de métodos en la industria azucarera y tener una diversidad mayor de analitos a evaluar como indicadores de la calidad.
- 11.6. Actualmente ICUMSA, posee métodos enzimáticos para analitos secundarios, como lo es el sulfito, y se encuentra en un estatus de tentativo, por lo que se recomienda proponer métodos que utilicen enzimas por su alta especificidad.
- 11.7. Colocar un detector de oxígeno (O₂), para controlar condiciones en el laboratorio.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CALPENA AC, et al. Validación de los Métodos Analíticos. *Farm Clin (EEUU)* 1991; 7(9) : 749-58.
2. COMELLAS L. Desarrollo de Métodos en HPLC. (España – Barcelona): edita Instituto Químico de Sarria, 1994:68.
3. HORTWITZ W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem. (EEUU)* 1982; 54 (1):67A.
4. BALERDI, J.J. Pérdidas en la Fábrica de Azúcar, Causas y Controles. *Boletín ATAGUA (Guatemala)* 1983. 15: 19-29.
5. FERNÁNDEZ, J et. Al. Effects of Polares on Growth and Juice Quality of Sugar Cane. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Durban Sudáfrica 1978: 761-768.
6. GEPLACEA Manual de Técnicas Analíticas de Azúcares y Mieles para América Latina y El Caribe. México, Geplacea 1984.: 10-47.
7. GOODING J. et Al. Bionalytical Experiments for Undergraduate Laboratory: Monitoring Glucose in Sports Drinks. *Journal of Chemical Education (EEUU)* 2001. 78 (6): 788, 789 y 790.
8. HUGOT, E. Manual de Ingenieros Azucareros. México, Editorial Continental. 1963. i: 803-826.
9. JOHNSON K. et Al. Factors Affecting Reaction Kinetics of Glucosa Oxidase. *Journal of Chemical Education (E.E.U.U.)* 2002. 79 (1) 74-76.
10. JULIÁN M.H.R. The Effects of Time of Harvest on the Partitioning of Dry Matter in Three Sugarcane Varieties Grow in Contrasting Environments. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Sao Paulo. 1978. 16: 1755-1770.

11. LOPEZ F.A. Manual Práctico de Fabricación de Azúcar de Caña y Mieles y Siropes Invertidos en su Control Técnico-Químico. Cuba, Editorial Cultural. 1948. ii : 354, 355, 362-370.
12. MADRID E. et Al. Evaluación de la Transmitancia, Conductividad y pH del Jugo Clarificado a través de la Dosificación de Cal, Preparada por Medio de Lechada de Cal. Tesis Ingeniero Industrial, Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala 1980: 67-68.
13. MONZÓN O.B. Cuantificación de los Procedimientos de Sulfitación y Alcalinización en Función de Calidades de Jugo, Consumos de Azufre y Cal y Producción de Azúcar. Congreso de Tecnología Azucarera de Centroamérica y Panama. Guatemala, ATAGUA, ATACA 1985.: 431-449.
14. MUÑIZ H. et. Al. Influencia de la Edad en la Maduración de la Caña. ATAC. 1975. 34 (1): 5-45.
15. TRINDER, P. et. Al. Determination of Glucosa in Blood Using Glucosa Oxidase with an Alternative Oxygen Aceptor, Ann. Clinical Biochemistry (EEUU) 6 (1) 1969.: 24-25.
16. UNITED STATES PHARMACOPEIAL Convention USP XXII. United States Pharmacopeia. EEUU, xxii ed. Easton: Mack Printing 1990. : 1225, 1710.
17. VASILAROU M. et Al. Enzymatic Spectrophotometric Reaction Rate Determination of Glucose in Fruit Drinks and Corbonated Beverages. Journal of Chemical Education (EEUU) 2000. 77 (10) 1327 y 1328.
18. McMURRY J. Química Orgánica. México. Editorial Iberoamericana 1992. iii: 897-921.
19. OGA-GEC-016.. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Editado por OGA. (Guatemala) 2004 i: 21-23.

20. VACCARI G. 2003. Evolution of Analytical Methods within ICUMSA during the last 20 years. Avh Association : 10th Symposium: 13.
21. NACIONES UNIDAS.. Istmo Centromerico: Fomento y Modernización del Sector Agroexportador. Comisión Económica para América Central y el Caribe CEPAL. 2000 : 1-45.
22. KAZMIER L. Estadística Aplicada a la Administración y a la Economía. México. Editorial McGraw-Hill. 1993 ii: 254-303.
23. HERNANDEZ SAMPIERI R. et al. Metodología de la Investigación. México. Editorial McGraw-Hill. 1998. ii: 474 pp.
24. LYKOS P. The Beer-Lambert Law Revisited. Journal of Chemical Education (EEUU) 1992 69 (9) 730-738.
25. GARCÍA CHÁVEZ, M. Seguridad alimentaria en Relación al azúcar en américa latina y el caribe. FAO. 2001 Disponible en web: www.fao.org.
26. HARDEE J. et al. Chemistry and Flatulence: An Introductory Enzyme Experiment. Journal of Chemical Education. (EEUU) 2000 77 (4) 498-500.
27. MORRISON R & BOYD R. Química Orgánica. México. Editorial Addison Wesley Longman. 1998. v: 1301-1312.

XIII ANEXOS

13.1. Tabla Coeficiente de Variación	60
13.2. Reacción de Trinder.....	61
13.3. Muestreador de Caña de Cosecha.....	62
13.4. Factor Fehling.....	63
13.5. Esquema de la Producción de Azucar.....	64
13.6. Serie de Datos recolectados.....	65

13.1. ANEXO 1

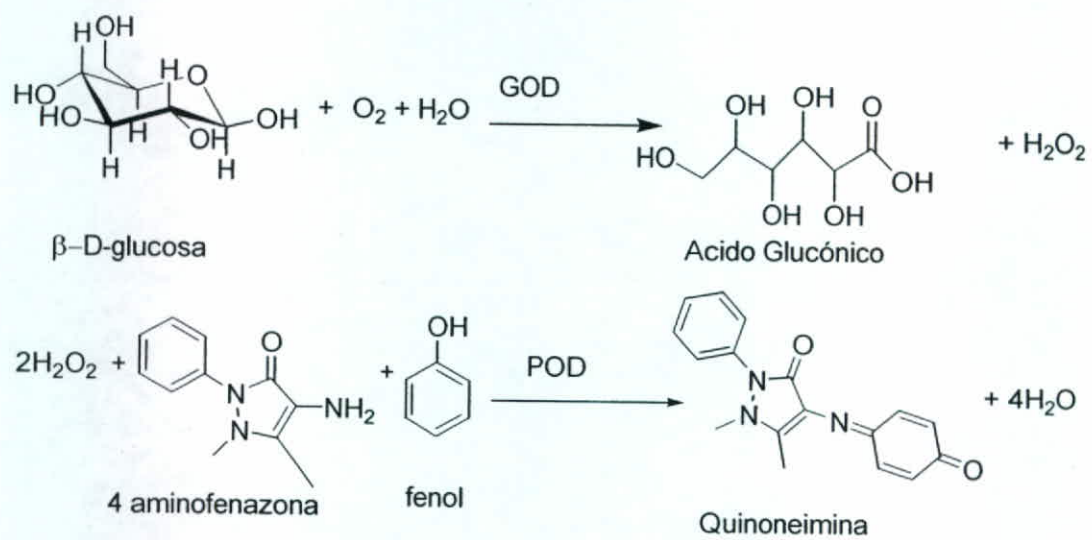
TABLA 1

Coefficientes de variación máximos ($CV_{\text{máx}}$) de aceptación en dependencia del Por ciento del analito en la muestra (% A), según las teoría Hortwitz (3)

% A	$CV_{\text{máx}}$ (I), %	$CV_{\text{máx}}$ (II), %
100	0,1-0,3	2
50	0,3	2,2
10	1	2,8
1	2-5	4
0,1	5-10	5,7
0,01-0,001	10	8-11,3
0,0001	-	16

13.2. ANEXO 2

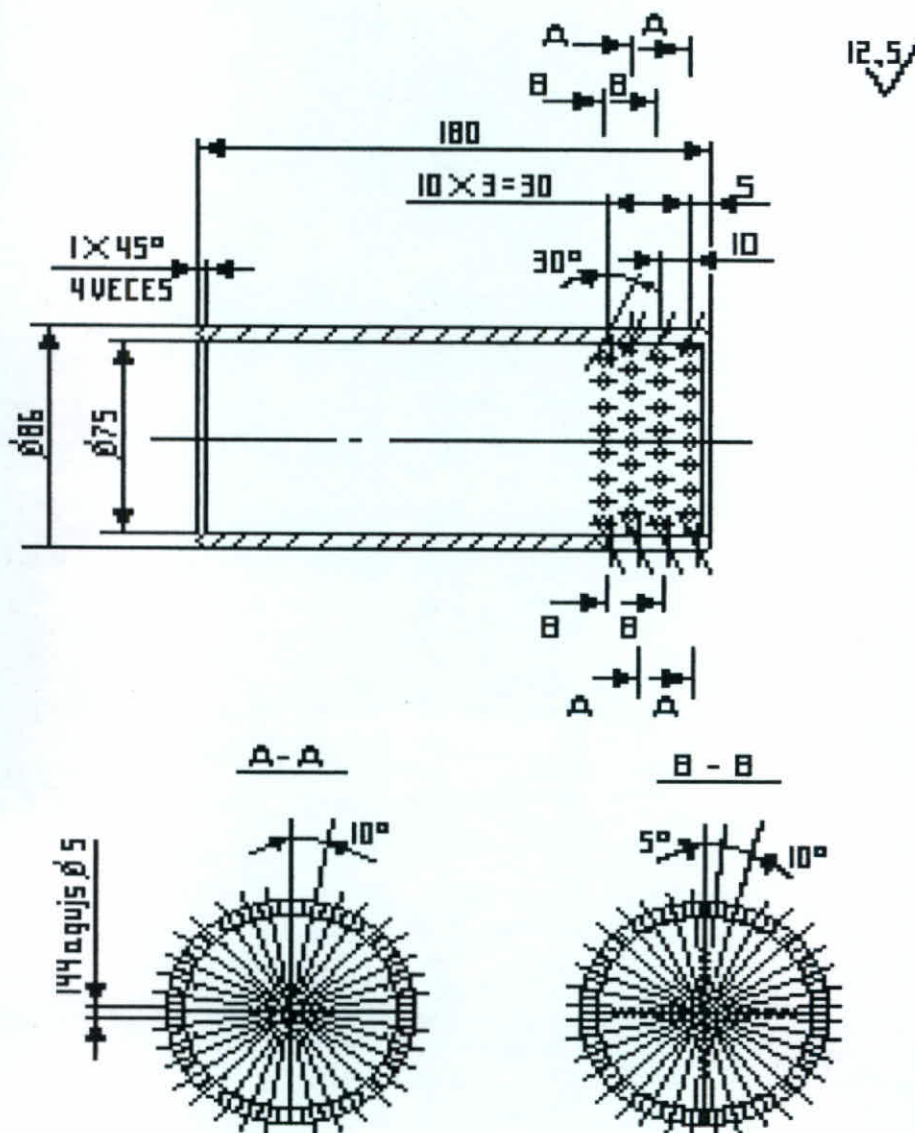
Esquema y Estequiometría de la Reacción de Trinder



Fuente: (14)

13.3. ANEXO 3

Esquema de Cilindro para recolectar muestra de Cosecha.



13.4. ANEXO 4

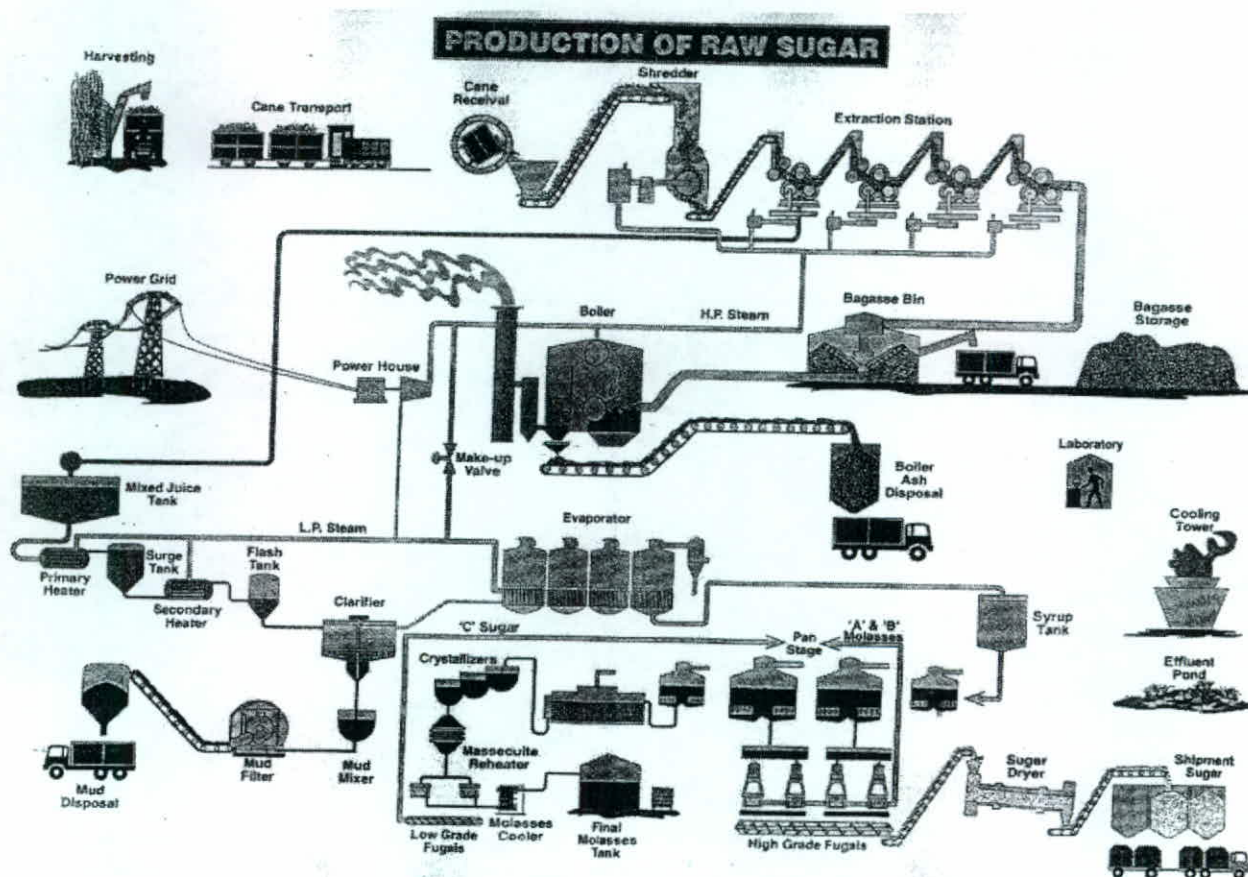
TABLA 2

Relación entre la masa de sacarosa en el erlenmeyer (m_s) y el factor (F), acorde con el método de Eynon y Lane a volumen constante

m_s (g)	F (mg azúcar invertido)
0.0	52.5
0.25	51.0
0.5	50.4
1.0	49.3
2.0	47.8
4.0	45.5
6.0	43.7
8.0	42.2
10.0	40.8
12.0	39.5
14.0	38.3
16.0	37.2
18.0	36.2
20.0	35.2
25.0	32.8

13.5. ANEXO 5

Esquema de Producción de Azúcar de Caña.



13.6. ANEXO 6.

Datos Obtenidos en el Estudio

Tabla 1
Comparación de los dos Métodos Analíticos

Muestra	Fecha	%AR/Eynon L	%AR/enzimatico	dif
MA1	06-Dic-04	0.46	0.44	0.02
MB1	06-Dic-04	0.32	0.28	0.04
C1	06-Dic-04	0.79	0.69	0.10
MB2	06-Dic-04	0.95	0.82	0.13
MA2	06-Dic-04	0.38	0.34	0.04
C2	06-Dic-04	0.39	0.37	0.02
C1	07-Dic-04	0.68	0.59	0.09
MA1	07-Dic-04	0.54	0.47	0.07
Cla1	07-Dic-04	0.37	0.32	0.05
A1	07-Dic-04	0.43	0.38	0.05
S1	07-Dic-04	0.45	0.42	0.03
MB1	07-Dic-04	0.73	0.69	0.04
C1	08-Dic-04	0.54	0.47	0.07
C2	08-Dic-04	0.37	0.32	0.05
C3	08-Dic-04	0.54	0.47	0.07
MA1	08-Dic-04	0.48	0.44	0.04
S1	08-Dic-04	0.46	0.40	0.06
MB1	08-Dic-04	0.34	0.29	0.05
S1	09-Dic-04	0.52	0.48	0.04
MA1	09-Dic-04	0.61	0.56	0.05
MB1	09-Dic-04	0.49	0.43	0.06
Cla1	09-Dic-04	0.26	0.23	0.03
C1	13-Dic-04	0.57	0.50	0.07
S1	13-Dic-04	0.39	0.35	0.04
MA1	13-Dic-04	0.41	0.36	0.05
MB1	13-Dic-04	0.22	0.19	0.03
S2	13-Dic-04	0.62	0.59	0.03
MA2	13-Dic-04	0.66	0.63	0.03
MB2	13-Dic-04	0.36	0.32	0.04
S1	14-Dic-04	0.61	0.56	0.05
MA1	14-Dic-04	0.39	0.37	0.02

MB1	14-Dic-04	0.78	0.74	0.04
A1	14-Dic-04	0.36	0.31	0.05
Cla1	14-Dic-04	0.28	0.24	0.04
C1	14-Dic-04	0.40	0.35	0.05
C1	15-Dic-04	0.26	0.24	0.02
MA1	15-Dic-04	0.37	0.32	0.05
MB1	15-Dic-04	0.67	0.59	0.08
S1	15-Dic-04	0.45	0.41	0.04
A1	15-Dic-04	0.46	0.41	0.05
Cla1	15-Dic-04	0.31	0.27	0.04
MA1	16-Dic-04	0.39	0.35	0.04
MB1	16-Dic-04	0.85	0.74	0.11
S1	16-Dic-04	0.57	0.50	0.07
C1	20-Dic-04	0.96	0.82	0.14
MA1	20-Dic-04	0.71	0.63	0.08
MB1	20-Dic-04	0.29	0.25	0.04
S1	20-Dic-04	0.36	0.31	0.05
A1	20-Dic-04	0.47	0.41	0.06
Cla1	20-Dic-04	0.59	0.58	0.01
MA1	21-Dic-04	0.41	0.37	0.04
MB1	21-Dic-04	0.34	0.28	0.06
S1	21-Dic-04	0.39	0.35	0.04
A1	21-Dic-04	0.28	0.24	0.04
Cla1	21-Dic-04	0.42	0.39	0.03
C1	22-Dic-04	0.41	0.35	0.06
C2	22-Dic-04	0.36	0.33	0.03
MA1	22-Dic-04	0.40	0.39	0.01
MB1	22-Dic-04	0.26	0.23	0.03
S1	22-Dic-04	0.36	0.32	0.04
A1	22-Dic-04	0.38	0.32	0.06
Cla1	22-Dic-04	0.51	0.42	0.09
S1	23-Dic-04	0.56	0.48	0.08
MA1	23-Dic-04	0.39	0.34	0.05
MB1	23-Dic-04	0.71	0.61	0.10
A1	30-Dic-04	0.46	0.41	0.05
Cla1	30-Dic-04	0.52	0.48	0.04
S1	30-Dic-04	0.42	0.38	0.04
MA1	30-Dic-04	0.37	0.31	0.06
MB1	30-Dic-04	0.50	0.45	0.05
MA2	30-Dic-04	0.66	0.61	0.05
MB2	30-Dic-04	0.48	0.45	0.03
S2	30-Dic-04	0.53	0.51	0.02
C1	03-Ene-05	0.71	0.63	0.08
S1	03-Ene-05	0.52	0.47	0.05
MA1	03-Ene-05	0.57	0.51	0.06
MB1	03-Ene-05	0.39	0.34	0.05

Tabla 2
Distinto Día y Distinto Analista.

A	A	A	B	B	B	dif
0.303	0.316	0.50	0.293	0.292	0.48	-0.02
0.294	0.278	0.47	0.254	0.246	0.41	-0.06
0.233	0.213	0.36	0.192	0.198	0.32	-0.04
0.258	0.271	0.43	0.23	0.23	0.37	-0.06
0.231	0.238	0.38	0.205	0.218	0.34	-0.04
0.256	0.236	0.40	0.221	0.2	0.34	-0.06
0.316	0.299	0.50	0.271	0.274	0.44	-0.06
0.387	0.402	0.64	0.382	0.394	0.63	-0.01
0.423	0.418	0.68	0.407	0.4	0.65	-0.03
0.357	0.365	0.59	0.343	0.338	0.55	-0.04

C	C	C	B	B	B	dif
0.272	0.275	0.44	0.286	0.282	0.46	0.02
0.237	0.234	0.38	0.252	0.247	0.41	0.02
0.169	0.167	0.27	0.183	0.188	0.30	0.03
0.392	0.385	0.63	0.418	0.402	0.66	0.03
0.427	0.429	0.70	0.437	0.422	0.70	0.002
0.377	0.381	0.62	0.399	0.41	0.66	0.04
0.409	0.407	0.66	0.43	0.43	0.70	0.04
0.407	0.411	0.67	0.414	0.416	0.67	0.00
0.526	0.535	0.86	0.552	0.548	0.89	0.03
0.321	0.318	0.52	0.34	0.336	0.54	0.03


D	D	D	B	B	B	dif
0.276	0.271	0.44	0.305	0.309	0.50	0.05
0.228	0.224	0.37	0.265	0.254	0.42	0.05
0.178	0.186	0.30	0.205	0.214	0.34	0.04
0.439	0.431	0.71	0.457	0.442	0.73	0.02
0.325	0.334	0.54	0.337	0.342	0.55	0.02
0.204	0.191	0.32	0.224	0.236	0.37	0.05
0.284	0.281	0.46	0.31	0.312	0.51	0.05
0.441	0.456	0.73	0.468	0.472	0.76	0.03
0.359	0.364	0.59	0.384	0.371	0.61	0.03
0.224	0.225	0.37	0.248	0.256	0.41	0.04

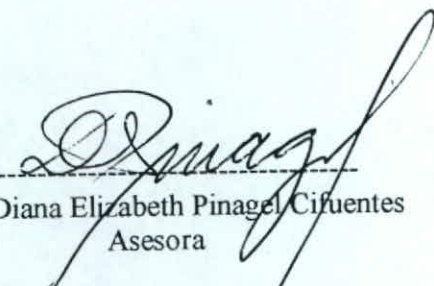
Tabla 3
Precisión con muestras distintas.


	Absorbancia	%AR
R1	0.336	0.49
R2	0.317	0.46
R3	0.311	0.45
R4	0.325	0.47
R5	0.333	0.48
R6	0.337	0.49
R7	0.357	0.52
R8	0.312	0.45
R9	0.316	0.46
R10	0.337	0.49
R11	0.315	0.45
R12	0.348	0.50
R13	0.315	0.45
R14	0.325	0.47
R15	0.345	0.50
R16	0.322	0.46
R17	0.337	0.49
R18	0.315	0.45
R19	0.318	0.46
R20	0.337	0.48
Promedio	0.328	0.47
DesvStd	0.013	0.02
CV	4.09	4.09

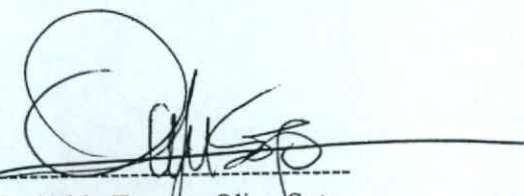
	Absorbancia	Azúcares Reductores
R1	0.299	0.43
R2	0.291	0.42
R3	0.308	0.44
R4	0.296	0.43
R5	0.315	0.45
R6	0.302	0.44
R7	0.310	0.45
R8	0.302	0.44
R9	0.321	0.46
R10	0.308	0.44
R11	0.282	0.41
R12	0.308	0.44
R13	0.297	0.43
R14	0.311	0.45
R15	0.295	0.43
R16	0.302	0.44
R17	0.285	0.41
R18	0.319	0.46
R19	0.321	0.46
R20	0.296	0.43
Promedio	0.303	0.44
DesvStd	0.011	0.02
CV	3.67	3.67


	Absorbancia	%AR
R1	0.643	0.93
R2	0.578	0.83
R3	0.627	0.91
R4	0.589	0.85
R5	0.657	0.95
R6	0.529	0.76
R7	0.645	0.93
R8	0.598	0.86
R9	0.636	0.92
R10	0.612	0.88
R11	0.6	0.87
R12	0.642	0.93
R13	0.616	0.89
R14	0.624	0.90
R15	0.591	0.85
R16	0.638	0.92
R17	0.603	0.87
R18	0.577	0.83
R19	0.629	0.91
R20	0.564	0.81
Promedio	0.610	0.88
DesvStd	0.032	0.05
CV	5.29	5.29

f. 
Mario Manuel Rodas Morán
Autor

f. 
Licda. Diana Elizabeth Pinagel Cifuentes
Asesora

f. 
Lic. Oscar Benedicto Monzón Barrientos
Asesor

f. 
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto
Director de Escuela de Química

f. 
Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Decano