

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR OCCIDENTE  
INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
MAZATENANGO, SUCHITEPÉQUEZ**



**“EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DISEÑADO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA EN MIELES  
UTILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO, COMO  
ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**PRESENTADO POR:**

**EDUARDO TUN VELÁSQUEZ.**

**CARNÉ: 200640879**

**MAZATENANGO, MAYO DE 2014**

## ÍNDICE GENERAL

	Contenido	Pág.
1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	3
3	Justificación.....	5
4	Planteamiento del problema.....	7
5	Hipótesis.....	8
6	Marco teórico.....	9
6.1	Hidratos de carbono y azúcares.....	9
6.2	Monosacáridos.....	10
6.2.1	Reacciones de los monosacáridos.....	11
6.2.1.1	Oxidación a ácidos aldónicos.....	11
6.2.1.2	Reducción de los grupos carbonilo.....	12
6.2.1.3	Pardeamiento no enzimático.....	13
6.3	Oligosacáridos.....	13
6.3.1	Propiedades y reacciones.....	14
6.4	Azúcares reductores.....	14
6.5	Sacarosa.....	15
6.5.1	Estructura y función.....	16
6.5.2	Características del enlace.....	16
6.5.3	La sacarosa como nutriente.....	17
6.6	Glucosa.....	17
6.7	Fructosa.....	19
6.8	Melaza.....	20
6.8.1	Clasificación.....	21
6.8.2	Composición.....	22
6.8.2.1	Azúcares.....	22
6.8.2.2	No azúcares.....	23
6.8.2.3	Cenizas.....	23
6.8.2.4	Compuestos nitrogenados.....	23
6.8.2.5	Ácidos.....	24
6.8.2.6	Vitaminas.....	24
6.8.2.7	Fenoles y compuestos volátiles.....	24
6.9	Fermentación alcohólica.....	24
6.10	Espectrofotometría.....	27
6.10.1	Naturaleza de la radiación electromagnética.....	28
6.10.2	Fenómenos de interacción entre luz y materia.....	29
6.10.3	Leyes de absorción.....	29
6.10.3.1	Ley de Beer.....	30
6.10.4	Influencia del disolvente.....	31
6.10.5	Influencia de la temperatura.....	32

6.10.6	Presencia de impurezas en los reactivos.....	32
6.10.7	Interacciones de especies abosorbentes.....	32
6.10.8	Interacción de soluto-radiación electromagnética.....	32
6.10.9	Errores personales.....	33
6.11	Instrumentación en la espectrofotometría.....	33
6.11.1	Fotómetro.....	34
6.11.2	Espectrofotómetro.....	34
6.11.3	Colorímetro.....	34
6.11.4	Espectroscopio.....	34
6.11.5	Espectrógrafo.....	34
6.12	Espectrofotómetro.....	35
6.12.1	Fuentes de radiación.....	35
6.12.2	Filtros y monocromadores.....	37
6.12.3	Recipientes para las muestras.....	38
6.12.4	Detectores.....	39
6.12.5	Células fotovoltaicas.....	40
6.12.6	Fototubos.....	40
6.12.7	Tubos fotomultiplicadores.....	41
6.13	Aplicaciones.....	42
6.13.1	Análisis cuantitativo.....	42
6.14	Análisis de correlación.....	44
6.14.1	Coeficiente de correlación lineal simple.....	44
7	Objetivos.....	46
7.1	General.....	46
7.2	Específicos.....	46
8	Metodología.....	47
8.1	Recursos.....	47
8.1.1	Humanos.....	47
8.1.2	Institucionales.....	47
8.1.3	Físicos.....	47
8.1.4	Financieros.....	47
8.1.5	Materiales.....	47
8.1.6	Reactivos.....	48
8.1.7	Equipo.....	48
8.2	Procedimiento para la realización de curva patrón de glucosa con glicemia enzimática AA.....	48
8.3	Procedimiento para la realización de curva patrón de fructosa con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA).....	50
8.4	Metodología para determinación de azúcar total en mieles con reactivo de Fehling.....	52

8.5	Análisis estadístico.....	54
8.6	Metodología para establecer costo y tiempo de análisis.....	54
9	Resultados y discusión de resultados.....	55
9.1	Calibración de equipo con estándares de glucosa.....	55
9.1.1	Fórmula de regresión lineal simple.....	55
9.2	Calibración de equipo con estándares de fructosa.....	56
9.2.1	Fórmula de regresión lineal simple.....	56
9.3	Procedimientos experimentales.....	57
9.3.1	Cuantificación de glucosa en mieles.....	57
9.3.1.1	Materiales.....	57
9.3.1.2	Reactivos.....	57
9.3.1.3	Equipo.....	57
9.3.1.4	Procedimiento.....	58
9.3.1.5	Cálculos.....	59
9.3.2	Cuantificación de monosacáridos (fructosa) en mieles.....	59
9.3.2.1	Materiales.....	59
9.3.2.2	Reactivos.....	59
9.3.2.3	Equipo.....	59
9.3.2.4	Procedimiento.....	60
9.3.2.5	Cálculos.....	61
9.3.3	Cuantificación de sacarosa en mieles.....	61
9.3.3.1	Materiales.....	61
9.3.3.2	Reactivos.....	61
9.3.3.3	Equipo.....	61
9.3.3.4	Procedimiento.....	62
9.3.3.5	Cálculos.....	63
9.4	Resultados basados en procedimientos experimentales.....	64
9.5	Análisis estadístico de resultados experimentales.....	65
9.6	Costos de análisis.....	71
9.7	Tiempo de análisis.....	72
10	Conclusiones.....	73
11	Recomendaciones.....	74
12	Bibliografía.....	75
13	Apéndice.....	77
13.1	Gráfica de curva de calibración de glucosa.....	77
13.2	Gráfica de curva de calibración de fructosa.....	77
13.3	Cálculos.....	78
14	Anéxo.....	79
14.1	Glosario.....	79
14.2	Figuras.....	82
14.3	Reacciones.....	87
14.4	Resultados de referencia.....	88
14.5	Tabla de distribuciones "t de Student".....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Contenido	Pág.
1	Componentes promedio de las melazas.....	21
2	Preparación de concentraciones de glucosa.....	49
3	Preparación de muestras para curva de glucosa.....	49
4	Preparación de concentraciones de fructosa.....	50
5	Preparación de muestras para curva de fructosa.....	51
6	Calibración de glucosa.....	55
7	Calibración de monosacáridos (fructosa).....	56
8	Datos experimentales de una mezcla patrón de azúcares.....	64
9	Datos experimentales de una muestra de miel (melaza).....	64
10	Análisis estadístico de sacarosa en mezcla de azúcares.....	65
11	Análisis estadístico de glucosa en mezcla de azúcares.....	66
12	Análisis estadístico de fructosa en mezcla de azúcares.....	67
13	Análisis estadístico de sacarosa en una muestra de miel.....	68
14	Análisis estadístico de fructosa en una muestra de miel.....	69
15	Análisis estadístico de glucosa en una muestra de miel.....	70
16	Costos de análisis.....	71
17	Tiempo de análisis.....	72

## 1. RESUMEN

La producción de alcohol etílico a partir de mieles obtenidas de la caña de azúcar, es un proceso común en la región sur de Guatemala. Los carbohidratos presentes en estas mieles determinan la calidad del alcohol producido, de forma específica, se habla del disacárido conocido como sacarosa y los monosacáridos denominados azúcares simples, los cuales son: glucosa y fructosa.

La glucosa es el único azúcar que puede ser transformado en alcohol, en un proceso conocido como fermentación, en el cual un microorganismo llamado levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) toma dicho azúcar como alimento y como producto del metabolismo se obtiene el alcohol. Es importante mencionar también que la levadura cuando no dispone de glucosa libre, descompone la sacarosa en los dos azúcares que la constituyen (glucosa y fructosa) en un procesos llamado inversión, por otro lado, también isomeriza la fructosa a glucosa para disponer de alimento.

Por todo lo anterior, es necesario establecer la cantidad de azúcares presentes en las mieles que se utilizarán para la producción de alcohol, éstas son heterogéneas puesto que dependen de la variedad de caña, el tipo de suelo, el tiempo de cultivo, entre otros factores. Para cuantificar los azúcares se han implementado diversos tipos de análisis de laboratorio. El más utilizado es el método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC *High Performance Liquid Chromatography*), método que permite saber con precisión la cantidad presente en las mieles de cada uno de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), las desventajas de este método son que los costos de análisis, materiales de referencia, reactivos y tiempos de trabajo, son elevados. Por otro lado se tiene que la espectrofotometría es un método de análisis utilizado en los laboratorios, por la sencillez y bajo costo de los análisis. Es por ello que Destiladora de Alcoholes y Ronas S.A. (DARSA) consideró importante realizar un estudio para evaluar un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en las mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución.

Para llevar a cabo la presente investigación se procedió a la realización de curvas de calibración de absorbancia contra concentración, de los patrones (glucosa y

fructosa), no se realizó para sacarosa, puesto que ésta se pretendía cuantificar indirectamente a través de la glucosa que se genera de la hidrólisis de dicho disacárido. Posterior a la realización de las curvas, se pudo observar que éstas presentaban un comportamiento lineal, lo cual permitió establecer una ecuación de regresión lineal simple para cada curva, que se utilizó para la obtención de los resultados experimentales.

Para comprobar la eficacia del método, se realizaron pruebas con el método experimental con una muestra de melaza, la cual también fue analizada por un laboratorio de referencia a través de HPLC, con ambos resultados se realizó el respectivo análisis estadístico utilizando la t de student a un nivel de confianza del 95% y 99%, donde quedó evidenciado que no existe diferencia significativa entre los resultados del método experimental y el método de referencia.

Con el análisis estadístico de los resultados se concluyó que el método espectrofotométrico para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles, si puede sustituir a un método por cromatografía líquida de alta resolución y con ello se rechaza la hipótesis planteada.

También con la presente investigación se recomienda que se debe evaluar la posibilidad de adquirir un reactivo específico para la fructosa, con el objetivo de simplificar el procedimiento y evitar interferencias por la presencia de otros monosacáridos diferentes a los estudiados, además de considerar la capacitación adecuada de las personas que realicen los análisis en el espectrofotómetro.

## 2. INTRODUCCIÓN

La agroindustria en Guatemala es una de las principales fuentes de desarrollo económico del país. La industria azucarera brinda diversidad de productos que se comercializan a nivel nacional e internacional. Entre los diversos productos generados por la industria azucarera se tienen las mieles que son producto principal o subproducto del proceso de elaboración de azúcar a partir de la caña de azúcar.

Las mieles que resultan como subproducto del proceso de elaboración de azúcar se conocen como miel final o melaza. Como no es posible cristalizar más azúcar de esta miel, la industria azucarera suele comercializar dicho subproducto para alimento de bovinos. Pero en la actualidad, la mayor demanda de melaza proviene de la industria licorera, que la utiliza como materia prima para la producción de alcohol etílico a través del proceso de fermentación. Junto con la melaza, también se utilizan mieles más puras y ricas en azúcares, tales como la miel virgen, que es un líquido muy denso (pero no tanto como la melaza), al que no se le ha extraído alguna cantidad de azúcar.

Las melazas son de composición heterogénea y pueden variar de forma considerable ya que dependen de la variedad de caña de azúcar utilizada, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Los principales azúcares en la melaza son: la sacarosa, la glucosa y la fructosa; éstas últimas constituyen la mayor porción de un tipo de azúcares conocidos como azúcares reductores.

La melaza es una miel bastante compleja. Para la industria licorera, los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) son los componentes de vital importancia para el proceso de fermentación. Para llevar a cabo la fermentación alcohólica es necesario el uso de levaduras, específicamente el uso de la *Saccharomyces cerevisiae*, dicha levadura invierte la sacarosa y actúa sobre la glucosa y fructosa transformándolas a través de un proceso químico en alcohol etílico como principal producto de la reacción.

*Por ello es de gran importancia conocer las cantidades de azúcares presentes en las mieles puesto que de esto dependerá la eficiencia de la fermentación y la calidad del producto final.*

*Por la complejidad de las mieles tanto en azúcares y otros compuestos, es necesario implementar métodos de análisis de laboratorio muy específicos. Para el reconocimiento de azúcares, de manera especial para los monosacáridos glucosa y fructosa, existen diversidad de métodos, como por ejemplo el ensayo de Fehling, Tollens, Benedict, entre otros, que son fáciles de aplicar, y otra más compleja y avanzada como por ejemplo la cromatografía, y de forma específica la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), este método es utilizado para el reconocimiento de dichos azúcares, debido a su precisión y exactitud.*

Se tiene por aparte también la espectrofotometría, la cual es un método analítico utilizado en laboratorios clínicos y de control de calidad, éste resulta ser un método fácil de aplicar, preciso y exacto. Por ello se evaluó un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en las mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución.

El documento que se presenta a continuación, detalla los procedimientos y marchas analíticas que se emplearon para el diseño y evaluación del método, entre ellos, las respectivas curvas de calibraciones de los azúcares en estudio. Con dichas curvas de calibración se establecieron las ecuaciones de regresión lineal, que permitieron la realización de las pruebas experimentales. Posterior a la obtención de los datos experimentales se procedió con el análisis estadístico de los resultados utilizando la *t* de student a un nivel de confianza del 95% y 99%, con ello se pudo rechazar la hipótesis planteada, puesto que los resultados del método espectrofotométrico comparados con los obtenidos a través de HPLC, no presentan diferencias significativas. Todo ello se realizó en las instalaciones de la Destiladora de Alcoholes y Ronés S.A durante el primer semestre del año 2013.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un método aplicado para la cuantificación de azúcares (reductores y no reductores) no sólo en mieles sino en una gran variedad de muestras. Es un método que se encuentra por delante de otros métodos de laboratorio, es versátil y preciso. Pero ésta versatilidad, precisión y eficacia queda contrastada por la complejidad y costo del equipo y reactivos utilizados.

El cromatógrafo o equipo de HPLC, consta de diferentes piezas complejas (filtros, bombas, válvulas, inyector, columna, detector, etc.) y precios que están por encima de cualquier cristalería encontrada en un laboratorio. Es importante mencionar que para el mantenimiento de este equipo se debe contratar servicios externos de personas competentes, puesto que por lo general, quien opera dicho aparato no cuenta con la habilidad y competencia necesaria. Por otro lado, la fase móvil y agua de lavado de columna, son materiales imprescindibles en la operación del equipo, que poseen un costo considerable.

Los equipos de HPLC necesitan también de un software, que es el encargado de realizar el análisis de datos y obtener un resultado fácil de interpretar. Dicho software necesita mantenimiento, ya que un desperfecto en éste significaría la inutilización del equipo por completo. Para la utilización de este software, se necesita de adiestramiento especial por la complejidad del mismo. Las personas que se inicien en la operación del cromatógrafo necesitan un tiempo considerable para familiarizarse con éste, y por ende, se necesitan gastos económicos durante el aprendizaje.

Es conveniente mencionar que en la calibración del equipo, la adquisición de los materiales estándares posee un costo alto, además se necesita una persona calificada para la realización de dicha calibración, por lo general se concluye en la contratación de servicios externos.

Debido a la complejidad y costo del equipo principalmente, son pocos los laboratorios que cuentan con la facilidad de poseer un equipo de HPLC dentro de sus instalaciones.

La espectrofotometría, es un método de análisis común en los laboratorios, es por lo general aplicada al análisis físico-químico de aguas, también es utilizada en la mayoría de laboratorios clínicos en diversos análisis, como por ejemplo, en el estudio del nivel de glucosa en la sangre.

Comparado con el método por HPLC, la espectrofotometría es un método bastante sencillo y rápido, el equipo es de menor tamaño y menor costo, no requiere de mantenimiento tan minucioso como el de un cromatógrafo (pero en ambas las debe realizar un persona competente), las piezas que componen el equipo poseen un costo semejante a la de cualquier cristalería de laboratorio, la o las personas que utilizan el equipo no necesitan de mucho tiempo de adiestramiento. Aunque la espectrofotometría no es utilizada para la cuantificación de monosacáridos (glucosa y fructosa) y sacarosa en mieles, al menos no como lo es la HPLC, con un método adecuado y estandarizado, la espectrofotometría podría brindar resultados precisos y exactos en el estudio de estos tres azúcares en mención.

Al conocer las ventajas que tiene la espectrofotometría en comparación con la HPLC, la Destiladora de Alcoholes y Rones S.A., consideró importante realizar una evaluación de un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el estudio de la calidad de las mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, sobresale la cuantificación de los azúcares presentes en la misma, de manera específica, el análisis de glucosa, fructosa y sacarosa.

La HPLC es el método utilizado en la actualidad para dicho estudio, es un método versátil que brinda resultados precisos exactos y por ende, confiables. Este método ha sido estandarizado y adoptado por algunas empresas para realizar la cuantificación de los tres azúcares en mención.

El inconveniente que presenta el método, es la complejidad y costo del equipo, además de los costos de los reactivos utilizados, estos factores hacen que sean pocos los laboratorios que cuenten con un método de análisis de azúcares presentes en mieles a través de HPLC.

Por otro lado, la espectrofotometría es utilizada por muchos laboratorios para una diversidad de análisis y en comparación con la cromatografía, es un método fácil, de equipo poco costoso, que puede brindar resultados casi instantáneos. Por ello es que muchos laboratorios cuentan con un espectrofotómetro dentro de sus instalaciones.

La espectrofotometría no es utilizada en la cuantificación de azúcares en mieles, (al menos no como la cromatografía) pero con el método adecuado ésta podría brindar resultados convincentes en el análisis de los azúcares presentes en las mieles, esto presentaría grandes ventajas en comparación con un método por HPLC.

En base a lo expuesto con anterioridad, se planteó la siguiente interrogante:

- ¿Podría un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, sustituir a un método por cromatografía líquida de alta resolución.

## 5. HIPÓTESIS

Un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa fructosa y sacarosa en mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico no puede sustituir a un método por cromatografía líquida de alta resolución, debido a que existe diferencia significativa entre los resultados de ambos métodos.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1. Hidratos de carbono y azúcares

De todas las sustancias orgánicas existentes en la tierra, los hidratos de carbono (o carbohidratos) son, no sólo los más ampliamente distribuidos, sino también los que se presentan en mayor cantidad. Constituyen además el centro del metabolismo de vegetales y animales. Los carbohidratos pertenecen al grupo de los nutrientes básicos, que siempre tendrán una importancia decisiva en el conjunto de la alimentación. Incluso aquellos carbohidratos que no son digeribles se consideran necesarios como fibra alimentaria para una alimentación equilibrada.

Poseen muchas estructuras moleculares diferentes, tamaños y formas, y exhiben una gran variedad de propiedades físicas y químicas. Por otra parte, son susceptibles de modificación química y bioquímica, y ambos tipos de modificaciones se utilizan comercialmente para mejorar sus propiedades y para ampliar su uso. Por último, son inocuos (no tóxicos).

“El almidón, la lactosa y la sacarosa son digeribles por los humanos, y todos ellos, junto con la D-glucosa y la D-fructosa, son fuentes de energía para ellos, proveyendo el 70-80% de las calorías de la dieta como promedio en el mundo.

El término carbohidrato sugiere una composición elemental genérica, concretamente  $C_x(H_2O)_y$  que coincide con moléculas que contienen átomos de carbono con otros de hidrógeno y oxígeno en la misma proporción que el agua. Sin embargo, la gran mayoría de los carbohidratos naturales producidos por los organismos vivos no poseen esta simple fórmula empírica. De hecho, la mayoría de los carbohidratos naturales se encuentran en forma de oligómeros (oligosacáridos) o polímeros (polisacáridos) de azúcares sencillos o modificados. Los carbohidratos de peso molecular más bajo se obtienen con frecuencia por despolimerización de los polímeros naturales.”<sup>1</sup>

---

1. Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza España. Edit. Acribia S.A.

Las plantas y las bacterias fotosintetizadoras producen los carbohidratos durante un proceso conocido como fotosíntesis, en el cual absorben el dióxido de carbono del aire y, por acción de la energía solar, producen glucosa y otros compuestos químicos necesarios para que los organismos sobrevivan y crezcan.

Los carbohidratos se dividen de la siguiente manera: *Los monosacáridos*, los cuales son las más simples y el más importante es la glucosa, aunque también lo son la fructosa y galactosa; *Los disacáridos*, los cuales surgen de la unión de dos monosacáridos, cuyos ejemplos más importantes son la sacarosa, la lactosa y la maltosa; *Los oligosacáridos y polisacáridos*, son enormes moléculas formadas más de dos tipos de unidades de monosacáridos.

“En los organismos vivos los hidratos de carbono tienen funciones estructurales y de almacenamiento de energía. En la función estructural se tiene como ejemplo: la *celulosa* que es el principal hidrato de carbono estructural en las plantas, hasta un 40% en las paredes celulares. Entre los hidratos de carbono de almacenamiento de energía las plantas usan al almidón y los animales al glucógeno; (cuando se necesita la energía, las enzimas los descomponen en glucosa)”.<sup>2</sup>

## **6.2. Monosacáridos**

Los monosacáridos los cuales deben llamarse como polihidroxialdehidos (aldosas) y como polihidroxicetonas (cetosas). Según el número total de átomos de carbono, los compuestos resultantes se designan, en la serie de aldosas y a partir de la triosa gliceraldehído, como tetrasas, pentosas, hexosas, etc., o en la serie de las cetosas y a partir de la triulosa dihidroxiacetona, como tetrulosas, pentulosas, hexulosas, etc.

La D-glucosa, el carbohidrato más abundante, pertenece a la clase de los monosacáridos. Los monosacáridos son moléculas de carbohidratos que no pueden ser degradadas a moléculas de carbohidratos más simples por hidrólisis, por lo que son conocidos como azúcares simples. Éstos pueden unirse para formar estructuras mayores, oligosacáridos y polisacáridos.

---

2. Azúcares o Glúcidos. (En línea). Consultado el 08-07-2012. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>

La D-glucosa es al mismo tiempo un polialcohol y un aldehído. Es clasificada como una aldosa, como se menciono con anterioridad, es el término con el que se designa a los azúcares que contienen un grupo aldehído. La terminación osa significa que es un azúcar; el prefijo ald- significa que posee un grupo aldehído.

En el otro tipo de monosacáridos (las cetosas), la función carbonílica es un grupo cetona. El sufijo que designa una cetosa en la nomenclatura sistemática de los carbohidratos es -ulosa. La D-fructosa es el ejemplo más característico de este grupo de azúcares. Es una de las dos unidades que constituyen a la sacarosa (un disacárido).

“La D-fructosa llega a constituir hasta el 55% de los jarabes de maíz ricos en fructosa y hasta el 40% de la miel. La D-fructosa es la cetosa principal desde el punto de vista comercial y la única que se encuentra en forma libre en los alimentos, pero, al igual que la D-glucosa, sólo en pequeñas cantidades”.<sup>1</sup>

La D- fructosa es utilizada en el mercado como edulcorante aunque las de mayor importancia son la sacarosa, los jarabes de almidón (mezcla de glucosa, maltosa y maltooligosacáridos) y la glucosa, junto con ellos Además de ellos se presentan también el azúcar invertido, la lactosa y los alcoholes sorbitol, manitol y xilitol.

### **6.2.1. Reacciones de los monosacáridos**

Todas las moléculas de carbohidratos poseen algún hidroxilo susceptible de reaccionar. Los monosacáridos simples y la mayoría de los otros carbohidratos de bajo peso molecular poseen además grupos carbonílicos susceptibles también de reaccionar, algunas de las reacciones principales son:

#### **6.2.1.1. Oxidación a ácidos aldónicos y aldonolactonas**

Las aldosas son fáciles de oxidarse a ácidos aldónicos. La reacción es utilizada con frecuencia para la determinación cuantitativa de azúcares. Uno de los métodos más antiguos basado en esta reacción hace uso del reactivo de Fehling.

---

1. Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza España. Edit. Acribia S.A.

El reactivo de Fehling es una solución alcalina de cobre (II), que oxida una aldosa a un aldonato, y en el proceso es reducido el cobre, el cual precipita como  $\text{Cu}_2\text{O}$ , de color rojo ladrillo.

Existen además algunas variantes de este método, que usan los reactivos de Nelson-Somogyi y Benedict, se utilizan todavía para determinar azúcares reductores en alimentos u otros materiales biológicos.

“En el proceso de oxidación del grupo aldehído de una aldosa a la sal del grupo ácido carboxílico, el agente oxidante es a su vez reducido, por lo que a las aldosas se les conoce también como azúcares reductores. Las cetosas también son azúcares reductores, puesto que son isomerizadas a sus correspondientes aldosas bajo las condiciones alcalinas de la reacción de Fehling. El reactivo de Benedict que no es alcalino, reacciona sólo con las aldosas y no con las cetosas. Un método sencillo y específico para la oxidación cuantitativa de la D-glucosa a ácido D-glucónico hace uso de la enzima glucosa oxidasa, que da lugar a la formación intermedia de la lactona-1,5 del ácido. La reacción es utilizada comúnmente para medir la concentración de glucosa en alimentos y otros materiales biológicos, incluida la sangre”.<sup>1</sup>

#### **6.2.1.2. Reducción de los grupos carbonilo por hidrogenación**

La hidrogenación consiste en la adición de un hidrógeno a un doble enlace. Cuando ésta se aplica a los carbohidratos, en la mayor parte de los casos el hidrógeno se adiciona al doble enlace entre el átomo de oxígeno y el de carbono del grupo carbonilo de la aldosa o la cetosa.

“La hidrogenación de la D-glucosa se lleva a cabo fácilmente con hidrógeno en forma de gas bajo presión y en presencia del reactivo de níquel de Raney. El producto de la reacción es el D-glucitol, conocido vulgarmente como sorbitol, en el que el sufijo –itol denota un polialcohol. Los alditoles son también conocidos como polihidroxi-alcoholes y polioles. Puesto que es derivado de una hexosa, el D-glucitol.

La reacción de los grupos hidroxilo con un anhídrido o cloruro de un ácido carboxílico (un cloruro de acilo) en presencia de una base adecuada produce un éster”.<sup>1</sup>

---

1. Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza España. Edit. Acribia S.A.

### 6.2.1.3. Pardeamiento no enzimático

En algunas condiciones, los monosacáridos y de manera especial los azúcares reductores producen colores pardos que poseen un gran interés y son deseables en algunos alimentos y en otros no.

Los colores pardos se forman por el calentamiento o por el almacenamiento de alimentos que contienen azúcares, durante largos periodos.

El pardeamiento que se produce es debido a una reacción química entre azúcares reductores, principalmente D-glucosa, y un aminoácido libre o un aminoácido que forma parte de una cadena proteica.

Dicha reacción es conocida como reacción de Maillard. También se le conoce como pardeamiento no enzimático.

“Cuando las aldosas o las cetosas se calientan en solución con aminas, se produce una variedad de reacciones, que dan lugar a la formación de numerosos compuestos, algunos de los cuales poseen aroma y sabor o son polímeros de color oscuro, mientras que ambos reactantes desaparecen lentamente. El azúcar reductor reacciona irreversiblemente con la amina para producir una glicosilamina. Esta sufre una reacción denominada transposición de Amadori, que resulta en la formación, en el caso de la D-glucosa, de un derivado de la 1-amino-1-desoxi-D-fructosa. La reacción continúa, de manera especial a pH 5 o inferior para dar un producto intermediario que sufre una deshidratación”.<sup>1</sup>

### 6.3. Oligosacáridos

Un oligosacárido contiene de dos a veinte unidades de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos. Cuando una molécula tiene más de veinte unidades se considera ya un polisacárido. Un compuesto que contiene dos monosacáridos es un disacárido, tres unidades es un trisacárido, cuatro unidades, tetra y así sucesivamente. Sólo existen unos pocos oligosacáridos en la naturaleza. La mayoría se producen por hidrólisis de polisacáridos a unidades más pequeñas.

---

1. Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza España. Edit. Acribia S.A.

### 6.3.1. Propiedades y reacciones

“Por tratarse de glicósidos, los oligosacáridos son fácilmente hidrolizables por acción de ácidos, mientras que se mantienen relativamente estables frente a las bases. La hidrólisis de sacarosa se conoce también como inversión y la mezcla equimolar de glucosa y fructosa resultante como azúcar invertido, puesto que el poder de rotación específico del azúcar es positivo y el de hidrolizado es negativo, debido a que la fructosa (levulosa) tiene un mayor poder negativo de rotación que la glucosa (dextrosa) positivo”.<sup>1</sup>

### 6.4. Azúcares reductores

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras moléculas.

Los azúcares reductores provocan la alteración de las proteínas mediante la reacción de glicación ó glucosilación no enzimática también denominada reacción de Maillard tal como se mencionó con anterioridad.

“La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Su concentración en la sangre está sometida a un cuidadoso mecanismo de regulación en individuos sanos y, en personas que padecen diabetes, aumenta sustancialmente.

Esto lleva a que éste sea el azúcar reductor generalmente considerado en las reacciones de glucosilación no enzimática de interés biológico. Sin embargo, cualquier azúcar que posea un grupo carbonilo libre puede reaccionar con los grupos amino primarios de las proteínas para formar bases de Schiff.

La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad del grupo carbonilo. Se sabe que la forma abierta o extendida de los azúcares no es muy estable, a tal punto que, por ejemplo, en la glucosa representa sólo el 0,002 %. Las moléculas de azúcar consiguen estabilizarse a través de un equilibrio entre dicha forma abierta y por lo menos dos formas cerradas (anómeros cíclicos) en las que el grupo carbonilo ha desaparecido.

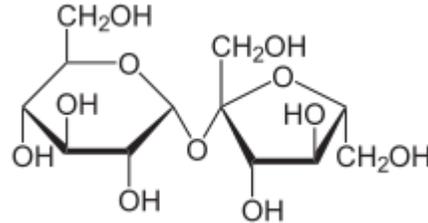
---

<sup>1</sup> Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza España. Edit. Acribia S.A.

De hecho, los azúcares fosfato, que son azúcares reductores de gran importancia en el interior celular, poseen mayor capacidad glucosilante que la glucosa dada su mayor proporción de forma carbonílica (abierto). La sacarosa es un disacárido que

no posee carbonos anoméricos libres por lo que carece de poder reductor y la reacción con el licor de Fehling es negativa.”<sup>3</sup>

### 6.5. Sacarosa



“La sacarosa o [azúcar](#) común es un [disacárido](#) formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa.

Su nombre químico es:

beta-D-fructofuranosil-(2->1)-alfa-D-glucopiranosido.

Su [fórmula química](#) es: (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)

Existen dos fuentes principales de sacarosa comercial: la de caña de azúcar y la de remolacha azucarera. En el extracto de la remolacha azucarera también se encuentran un trisacárido, la rafinosa, que consiste en una unidad D-galactopiranosilo unida a sacarosa y un tetrasacárido, la estaquiosa, que contiene otra unidad de D-galactopiranosilo. Estos oligosacáridos también se encuentran en legumbres, no son digestibles, y constituyen la causa de la flatulencia derivada del consumo de legumbres. La sacarosa no tiene poder [reductor](#) sobre el reactivo de [Fehling](#) y el reactivo de Tollens”.<sup>2</sup>

<sup>2</sup>. Azúcares o Glúcidos. (En línea). Consultado el 08-07-2012. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>.

<sup>3</sup>. Iniciación a la bromatología práctica). Protocolos de análisis. Azúcares reductores. (En línea). Consultado el 06-07-2012. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/57234457/Azucar-reductor>.

La sacarosa es el [edulcorante](#) más utilizado para endulzar los [alimentos](#). En la naturaleza se encuentra en un 20% del peso en la [caña de azúcar](#) y en un 15% del peso de la [remolacha azucarera](#), de la que se obtiene el azúcar de mesa. La [miel](#) también es un fluido que contiene gran cantidad de sacarosa hidrolizada de forma parcial.

### 6.5.1. Estructura y función

La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores.

No contiene ningún átomo de carbono anomérico libre, puesto que los carbonos anoméricos de sus dos monosacáridos que la constituyen se hallan unidos entre sí, de manera covalente mediante un enlace O-glucosídico. Por esta razón, la sacarosa no es un azúcar reductor y tampoco posee un extremo reductor. La sacarosa es un producto intermedio principal de la fotosíntesis, en muchas plantas constituye la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta. En las semillas germinadas de plantas, las grasas y proteínas almacenadas se convierten en sacarosa para su transporte a partir de la planta en desarrollo.

### 6.5.2. Características del enlace

“En la sacarosa, el enlace que une los dos monosacáridos es de tipo O-glucosídico. Además, dicho enlace es dicarbonílico ya que son los dos carbonos reductores de ambos monosacáridos los que forman el enlace alfa(1-2) de alfa-D-glucosa y beta-D-fructosa

La enzima encargada de hidrolizar este enlace es la [sacarasa](#), también conocida como invertasa, ya que la sacarosa hidrolizada es llamada también *azúcar invertido*. También se puede invertir la sacarosa al agregarle ácido y someterla a calentamiento.

La sacarosa tiene como función principal en el organismo humano ayudar en la generación de energía que el cuerpo humano necesita para que funcionen los diferentes órganos”.<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup> Meislich, H. 1977. *Química orgánica*. 2 ed. Colombia. Edit. Mc Graww-Hill latinoamericana S.A.

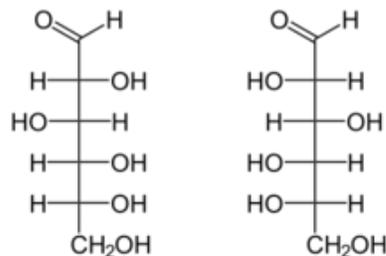
### 6.5.3. La sacarosa como nutriente

La sacarosa se usa en los alimentos por su poder endulzante. Al llegar al estómago sufre una hidrólisis ácida y una parte se desdobra en sus componentes [glucosa](#) y [fructosa](#). El resto de sacarosa pasa al [intestino delgado](#), donde la ya mencionada enzima sacarasa la convierte en glucosa y fructosa. Existen muchas controversias sobre el daño que ocasiona el consumo de sacarosa. Ésta se relaciona con caries, diabetes, obesidad, aterosclerosis, etc. En realidad la sacarosa es uno de los

mejores nutrientes disponibles para el organismo humano. Tiene gran facilidad para su digestión, no genera productos tóxicos durante su metabolismo y además tiene bastante bajo su [índice glicémico](#), lo que significa que al consumir la sacarosa, el nivel de glucosa en la sangre sube de manera poco considerable.

El consumo exagerado de la sacarosa se debe a su sabor agradable. Debido a ello, la sacarosa es limitada en la dieta por razones de salud, ya que a pesar de su índice glicémico bajo, un consumo descontrolado alto produce una [carga glicémica](#) elevada.

## 6.6. Glucosa



Moléculas de D- glucosa y L-glucosa

La glucosa es un [monosacárido](#) con [fórmula molecular](#)  $C_6H_{12}O_6$ , la misma que la [fructosa](#) pero con diferente posición relativa de los grupos  $-OH$  y  $O=$ . Es una [hexosa](#), es decir, que contiene seis átomos de carbono, y es una [aldosa](#), esto es, el grupo [carbonilo](#) está en el extremo de la molécula.

“Es una forma de [azúcar](#) que se encuentra libre en las [frutas](#) y en la [miel](#). Su rendimiento energético es de 3,75 kilocalorías por cada gramo en condiciones estándar. En terminología de la [industria alimentaria](#) suele denominarse dextrosa (término procedente de «glucosa dextrorrotatoria») a este compuesto. También se le puede encontrar en semillas (contando los cereales) y tubérculos”.<sup>2</sup>

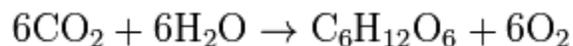
Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de glucosa (a menudo con [fructosa](#)), que puede ser extraída y concentrada para hacer un azúcar alternativo. Pero a nivel industrial, tanto la glucosa líquida (jarabe de glucosa) como la dextrosa (glucosa en polvo) se obtienen a partir de la [hidrólisis enzimática](#) de [almidón](#) de [cereales](#) (generalmente [trigo](#) o [maíz](#)).

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante sus oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno.

“En su forma D-Glucosa, sufre una ciclación hacia su forma hemiacetálica para dar sus formas furano y pirano (D-glucofuranosa y D-glucopiranos) que a su vez presentan anómeros alfa y beta. Estos anómeros no presentan diferencias de composición estructural, pero si diferentes características físicas y químicas”.<sup>2</sup>

La D-glucosa, que es la forma más abundante de forma natural, es uno de los compuestos más importantes para los seres vivos, incluyendo a los seres humanos.

Las plantas sintetizan la glucosa en la fotosíntesis a partir de compuestos como agua y dióxido de carbono, según la siguiente reacción:

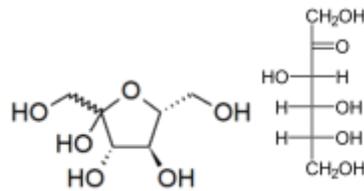


Los animales, son incapaces de realizar este proceso y toman la glucosa de otros seres vivos o la sintetizan a partir de otros compuestos orgánicos. La glucosa puede sintetizarse a partir de otros azúcares, como fructosa o galactosa. En el metabolismo de los animales (incluyendo al ser humano), la glucosa se puede sintetizar a partir de moléculas no glucídicas, proceso conocido como gluconeogénesis.

---

2. Azúcares o Glúcidos. (En línea). Consultado el 08-07-2012. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>.

## 6.7. Fructosa



La fructosa es un endulzante natural que se obtiene en su mayoría de la frutas, razón por la que se le conoce como “azúcar de la fruta”. También se le puede encontrar en algunas verduras, en la miel y en otras plantas como el azúcar de caña y la remolacha, de donde se extrae para elaborar un azúcar alternativo. La fructosa, o levulosa, es una forma de azúcar encontrada en las frutas y en la miel. Es un monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura.

“Es una hexosa (6 átomos de carbono). Es levógira y tiene 3 carbonos asimétricos por lo tanto ella es uno de los componentes de los cuatro pares de enantiómeros. Es una ceto-hexosa y pertenece a la serie D.

Su poder energético es de 4 kilocalorías por cada gramo. Su fórmula química es  $C_6H_{12}O_6$ .

La fructosa se usa desde los 70's en Estados Unidos y en la Unión Europea para endulzar refrescos. Actualmente está presente en diferentes cantidades en una amplia variedad de alimentos, y se ha convertido en uno de los endulzantes más utilizados por la industria alimentaria. Se le puede encontrar en productos de repostería, alimentos procesados, frutas y bebidas refrescantes azucaradas, azúcar común, entre otros”.<sup>2</sup>

La fructosa constituye una importante fuente de energía para el cuerpo. De forma tradicional, la fructosa se ha utilizado como edulcorante para los diabéticos, aunque hoy día existen dos posturas divididas respecto a su uso en estos pacientes.

La primera afirma que debido a que la fructosa no aumenta la glucosa de la sangre y no requiere insulina, las personas diabéticas pueden tolerarla mejor que otros azúcares. Mientras tanto, otro grupo señala que la fructosa acaba transformándose en glucosa produciendo una elevación glucémica en la sangre, por lo que ya no se considera un edulcorante recomendable para diabéticos.

## 6.8. Melaza

Las melazas ó mieles finales, suelen der definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos.

“La norma del Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC 587 de 1994, define como miel final o melaza al jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales”.<sup>6</sup>

La denominación melaza se aplica al líquido viscoso final obtenido en la fabricación del azúcar mediante una cristalización repetida. La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles que están presentes en el jugo de caña, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables.

“Los compuestos no fermentables reductores del cobre que se encuentran en la melaza son, caramelos libres de nitrógeno producidos por el calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y aminocompuestos”.<sup>6</sup>

---

<sup>2</sup>. Azúcares o Glúcidos. (En línea). Consultado el 08-07-2012. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>.

<sup>6</sup>. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. (En línea). Consultado el 10-09-2012. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias/26.pdf>.

Componentes	constituyentes	contenido % (p/p)
-------------	----------------	----------------------

componentes mayores	materia seca	78
	proteínas	3
	sacarosa	60
	azúcares reductores	5
	sustancias disueltas (diferentes azúcares)	6
	agua	16
	grasa	0.4
	cenizas	9
contenido de minerales	calcio	0.74
	magnesio	0.35
	fosforo	0.08
	potasio	3.67
contenido de aminoácidos	glicina	0.1
	leucina	0.01
	lisina	0.01
	treonina	0.06
	valina	0.02
contenido de vitaminas	colina	600 ppm
	niacina	48.86 ppm
	acido pantoténico	42.90 ppm
	piridoxina	44 ppm
	riboflavina	4.40 ppm
	tiamina	0.88 ppm

**Tabla No. 1. Componentes promedio de las melazas.**

*Fuente: Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae. (En línea). Consultado el 10-09-2012. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias/26.pdf>.*

### 6.8.1. Clasificación

“La Asociación Americana de Control Oficial de Alimentos (AAFCO), recomienda diferentes clasificaciones para las melazas, según el azúcar total y el contenido de humedad, así:

- Melaza superior blackstrap: melaza de caña que contiene 23.4% de agua o menos, y 53.5% o más de azúcares totales.
- Melaza blackstrap: melaza compuesta por 23.5% o 26.4% de agua y 48.5% a 53.5% de azúcares totales.

Otra clasificación de las melazas, se da por el porcentaje de materia sólida en peso, o grados brix, de la siguiente manera:

- Melaza blackstrap: es el subproducto de la elaboración del azúcar, cuyo porcentaje de materia sólida en peso (grados brix), diluido con igual peso de agua es de 42.5 grados brix.
- Melaza de caña alimenticia: es la melaza blackstrap diluida con agua, hasta una concentración en grados brix, no menor de 39.75; a este producto no se le ha especificado un valor de concentración de azúcares.
- Melaza High Test o jarabe invertido: es el producto obtenido por la concentración del jugo clarificado, hasta un porcentaje de materia sólida en peso de 85% e invertido con ácido o con invertasa”.<sup>6</sup>

### **6.8.2. Composición**

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar de forma considerable ya que ésta depende de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Es decir, son muchos factores los que determinan la composición. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados brix ó sólidos disueltos de 75-85% y un pH de cinco a seis.

#### **6.8.2.1. Azúcares**

Los principales azúcares en la melaza son la sacarosa, la glucosa o dextrosa y la fructosa o levulosa. Estas últimas constituyen la mayor porción de los azúcares reductores encontrados en dicha miel. La fructosa puede sufrir transformaciones al igual que la glucosa, debido a reacciones dependientes de la temperatura. El contenido de glucosa y fructosa en las melazas puede variar a causa de la hidrólisis de la sacarosa, que depende de valores de pH ácidos y temperaturas altas.

---

<sup>6</sup> *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae. (En línea). Consultado el 10-09-2012. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias/26.pdf>.*

### **6.8.2.2. No azúcares**

“Los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas (Fe, K, Na, Ca, Mg, Zn, As, Cd, Hg, Pb, y Cl, NO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>) y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos).

### **6.8.2.3. Cenizas**

En general la composición de las cenizas de las melazas, es cualitativamente similar a la del jugo, del cual se obtiene éstas. Casi todos los análisis publicados, muestran que el contenido de potasa varía alrededor de 40% del peso del carbono total de la ceniza; el contenido de cal es de 10% al 20%, el de sulfatos varía entre el 10% y el 20%, y las sales de magnesio, sodio, aluminio, la sílice, los cloruros, fosfatos y los óxidos de hierro, completan el resto del contenido de cenizas.

### **6.8.2.4. Compuestos nitrogenados**

Están constituidos por aminoácidos mono y dibásicos, amidas ácidas, betaínas y pequeñas cantidades de peptonas y nitratos. Cuando los azúcares reductores (glucosa y fructosa) son sometidos a los procesos de clarificación, en el tratamiento subsiguiente, se producen varias reacciones, siendo la más importante la de los aminoácidos con estos azúcares, en la cual se forman productos coloreados como las melanoidinas y los residuos fermentables a los cuales se les ha encontrado un contenido aproximado de 68% de nitrógeno combinado, en melazas.

El nitrógeno total de las melazas, varía entre 0.4 y 1.5% del peso total de la melaza. La proteína cruda frecuentemente se determina como porcentaje en peso del contenido de nitrógeno”.<sup>6</sup>

---

<sup>6</sup> *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae. (En línea). Consultado el 10-09-2012. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias/26.pdf>.*

### **6.8.2.5. Ácidos**

El ácido aconítico, es el más abundante de los ácidos orgánicos presentes en la caña que se acumula en las melazas, que representa cerca del 6% del peso de sólidos en la melaza. Los ácidos málico y cítrico están presentes como productos de descomposición, la mayoría de estos ácidos son metabolizados por diversos microorganismos presentes en la caña.

### **6.8.2.6. Vitaminas**

Aquellas vitaminas resistentes a la acción del calor y de los álcalis, son las que aparecen en las melazas. La niacina, ácido pantoténico y riboflavina, importantes para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas.

### **6.8.2.7. Fenoles y compuestos volátiles**

“Los fenoles presentes en las mieles finales, provienen de la parte fibrosa de la caña, éstos se derivan de los ácidos hidroxicinámico y parahidroxibenzóico. Es necesario tener en cuenta, que desde el punto de vista de la fermentación, algunos fenoles son indeseables, por presentar actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos, a concentraciones de 0.5 g/l. Los ácidos fenólicos que mayor actividad bacteriostática han demostrado son el cloragénico, el p-cumárico y el telúrico; estos dos últimos son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de algunas bacterias”.<sup>6</sup>

## **6.9. Fermentación alcohólica**

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias, las cuales se encargan de procesar ciertos carbohidratos, de manera específica los azúcares, como la glucosa, la fructosa, etc., dando como resultado etanol (un alcohol), dióxido de carbono (gas) y ATP (adenosín trifosfato).

---

<sup>6</sup> *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae. (En línea). Consultado el 10-09-2012. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias/26.pdf>.*

La fermentación alcohólica, comienza después de que la glucosa se degrada en un ácido pirúvico, este ácido pirúvico se convierte luego en CO<sub>2</sub> y etanol

Los seres humanos han aprovechado este proceso para hacer pan, cerveza, y vino. En estos tres productos se emplea el mismo microorganismo que es: la levadura común cuyo nombre científico es *Saccharomyces cerevisiae*.

La reacción general de la fermentación es la siguiente:



Glucosa  $\longrightarrow$  2 Etanol + 2 Dióxido de carbono (ver anexo. Fig No. 1.)

La fermentación alcohólica, al igual que otro tipo de fermentaciones, como es el caso de la fermentación láctica, es de gran utilidad para el hombre, pues por ejemplo, la fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras, sirve para la fabricación de **bebidas alcohólicas** (como el vino o la cerveza), y el CO<sub>2</sub> procedente de la fermentación, es utilizado para hacer crecer el pan y otros alimentos.

La fermentación alcohólica tiene dos finalidades, una es la producción de energía de tipo **anaeróbica** (en ausencia de oxígeno) para microorganismos como las levaduras, en el caso de ver el proceso desde la perspectiva microbiana. La otra finalidad proviene desde la perspectiva comercial, el proceso es de tipo bioquímico, con la finalidad de producir etanol que podrá comercializarse.

La principal característica de los microorganismos que realizan este tipo de fermentación es el lugar donde viven, que suelen ser ambientes libres de oxígeno, sobretodo mientras se realiza la reacción química, por lo cual se dice que la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico.

“La fermentación alcohólica es utilizada desde la antigüedad para realizar productos como la cerveza o el vino. Sin duda, dicho proceso fue esencial para el desarrollo de la alquimia en la Edad Media. Los descubrimientos químicos posteriores llevaron al investigador, Gay-Lussac, a describir la reacción de fermentación que tenía lugar partiendo de la glucosa, con obtención de etanol, a pesar de que, por aquel entonces, aún no se conocía la fermentación alcohólica y sus fundamentos. Fueron muchos científicos los que intentaron dar explicación al proceso que hoy se conoce como fermentación, pero hasta 1818 no se descubre que las causantes del proceso eran las levaduras. Pocos años después, se descubre la enzima responsable del proceso, la zimasa, otorgándose el Premio Nobel de Química en 1897, por dicho descubrimiento esencial, a Eduard Buchner. En los años posteriores, se siguió trabajando en el tema,

hasta que en 1929, se descubre el cofactor NADH, esencial en el proceso de fermentación, pues su principal función es el intercambio de electrones".<sup>7</sup>

Se puede además que la fermentación alcohólica, no solo es un proceso anaeróbico, es también un **proceso exotérmico**, es decir, libera energía. De una molécula de glucosa procesada se liberan dos de ATP

Existen diferentes tipos de fermentaciones alcohólicas, las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos; la fermentación industrial, y la fermentación natural. Además se puede hablar de fermentaciones específicas, las cuales son manipuladas para conseguir ciertas cantidades de etanol con la finalidad de realizar algunas bebidas. Dentro de este grupo se destacan la fermentación del vino, de la cerveza, del arroz, de la leche, entre otras.

Además de la producción de bebidas alcohólicas, u otros alimentos, la fermentación alcohólica hoy en día tiene usos diversos en la industria, donde forma parte de la producción de cosméticos, productos de limpieza, biocombustibles, pesticidas biológicos, etc.

Las cepas de levadura más empleadas en la fabricación del vino, cerveza y pan, son las correspondientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura sigue un metabolismo fermentativo cuando está en condiciones anaerobias, pero cuando hay oxígeno hace una respiración aerobia y no produce alcohol, ya que aprovecha gran parte del azúcar para su propia división celular.

Este fenómeno se conoce como efecto Pasteur, y es determinante en la industria de bebidas alcohólicas, pues para que la producción de etanol sea correcta, las levaduras deben desarrollarse en ausencia de oxígeno.

---

<sup>7</sup> *.Biotecnología y economía, general, productos biotecnológicos. La fermentación alcohólica. Cómo se produce y aplicaciones. (En línea). Consultado el 12-09-2012. Disponible en: <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/>.*

“Existen otras cepas de levadura, como pueden ser: *Kloeckera apiculata* (levadura de bajo poder fermentativo, presente en las vinificaciones) y *Saccharomyces bayanus* (de alto poder fermentativo, presente también en las vinificaciones). Otra utilidad interesante de la fermentación alcohólica es la producción a gran escala de bioetanol a partir de biomasa. Éste supone una alternativa competitiva y más limpia al uso de combustibles fósiles como el petróleo. El inconveniente de este proceso, es la gran generación de CO<sub>2</sub>, la cual provoca un impacto sobre el medio ambiente que contribuye al cambio climático, y por esa razón debe de ser controlado”.<sup>7</sup>

En definitiva, se puede concluir que la fermentación alcohólica es un proceso biológico muy utilizado en la industria, ya que se ve implicada en la elaboración de productos alimenticios y otros productos que van desde cosméticos hasta el desarrollo de biocombustibles.

#### 6.10. Espectrofotometría

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas. Es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas. Se caracteriza por su precisión, sensibilidad y su gran campo de aplicabilidad. Los fundamentos físico-químicos de la espectrofotometría son muy sencillos. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna.

“La Mecánica Cuántica dice que la luz está compuesta de fotones cada uno de los cuáles tiene una energía:

$$E_{\text{fotón}} = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

Donde  $c$  es la velocidad de la luz,  $\nu$  es su frecuencia,  $\lambda$  su longitud de onda y  $h = 6.6 \cdot 10^{-34}$  J·s es la constante de Planck. Cuando se dice que una sustancia química absorbe luz de longitud de onda  $\lambda$ , esto significa que las moléculas de esa sustancia absorben *fotones* de esa longitud de onda.”<sup>8</sup>

---

<sup>7</sup> [Biotecnología y economía, general, productos biotecnológicos. La fermentación alcohólica. Cómo se produce y aplicaciones. \(En línea\). Consultado el 12-09-2012. Disponible en: http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/.](http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/)

<sup>8</sup> [Conocimiento de técnicas analíticas parte I: fundamentos de espectrofotometría. \(En línea\). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm.](http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm)

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser transparente, absorbe longitud de ondas que pertenecen al espectro visible; el agua absorbe la luz en la región del infrarrojo. La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida y otra atraviesa las moléculas sin dificultad alguna. El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que inciden sobre ellas y solo dejan pasar hacia los ojos aquellas longitudes de onda que no son absorbidas.

### **6.10.1. Naturaleza de la radiación electromagnética**

La radiación electromagnética es una forma de energía radiante que se propaga en forma de ondas. En este fenómeno ondulatorio se define:

**6.10.1.1. “Longitud de onda ( $\lambda$ ):** Es la distancia entre dos máximos de un ciclo completo del movimiento ondulatorio. Se expresa, según el S.I. (Sistema Internacional) en nanómetros (nm) y sus equivalencias son:  $1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$ .

**6.10.1.2. Frecuencia ( $\nu$ ):** Es el número de ciclos por segundo. Es inversa a la longitud de onda. Su fórmula es:  $\nu = c/\lambda$ , y se mide en ciclos por segundo o hertzios.

**6.10.1.3. Espectro electromagnético:** Cubre un amplio intervalo de fotones radiante, desde los rayos de longitud de onda corta hasta las ondas de radio, de longitud de onda larga. Se divide en varias regiones, las más interesantes son:

Región Ultravioleta:  $\lambda = 10\text{-}380\text{ nm}$ .

Región Visible:  $\lambda = 380\text{-}780\text{ nm}$ .

Región Infrarroja:  $\lambda = 780\text{-}30000\text{ nm}$ .

En la región visible, la luz se descompone en colores. La luz blanca contiene todo el espectro de longitudes de onda. Si interacciona con una molécula puede ser dispersada o absorbida”.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup>. *Conocimiento de técnicas analíticas parte I: fundamentos de espectrofotometría. (En línea). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>.*

**6.10.1.4. Espectro de Absorción:** Cada especie absorbente, que recibe el nombre de cromógeno, tiene un determinado espectro de absorción. El espectro de absorción es un gráfico donde se representa en ordenadas la absorbancia y en abscisas la longitud de onda. La medida de la cantidad de luz absorbida por una solución es el fundamento de la espectrofotometría de absorción.

Por eso es importante trabajar a la longitud de onda a la que la sustancia estudiada absorbe la mayor cantidad de luz (a mayor cantidad de luz, mayor cantidad de sustancia).

## **6.10.2. Fenómenos de interacción entre luz y materia**

**6.10.2.1. Fenómeno de absorción:** Cuando una partícula que se encuentra en estado de reposo o estado fundamental interacciona con un haz de luz, absorbe energía ( $E$ ) y se transforma en una partícula en estado excitado. “La molécula absorbe la  $E$  de la onda y aumenta su energía, y ese aumento de energía es igual a la  $E$  de la radiación electromagnética absorbida ( $E = h \cdot \nu$ ). La partícula en estado excitado tiende a volver de forma espontánea a su estado de reposo desprendiendo la  $E$  absorbida en forma de calor.”<sup>8</sup>

**6.10.2.2. Fenómeno de emisión:** Algunos compuestos, tras ser excitados por la luz, vuelven al estado fundamental produciendo la emisión de energía radiante. En este caso, lo que se mide es la energía emitida y en este fenómeno se basa la fotometría de llama o la fluorescencia.

## **6.10.3. Leyes de absorción**

Cuando un haz de luz pasa a través de un medio, se registra una cierta pérdida de intensidad, debido a la absorción por parte de la sustancia.

---

<sup>8</sup> *Conocimiento de técnicas analíticas parte I: fundamentos de espectrofotometría. (En línea). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>.*

Se llama *transmitancia* (T) a la relación entre la luz incidente y la luz transmitida:

$$T = I_s / I_0$$

$$\%T = (I_s / I_0) \times 100.$$

Se puede perder intensidad por la interacción con la cubeta o el solvente. Para evitar este error se hace una primera medida con una solución de referencia o *blanco*, que contiene todos los posibles compuestos que intervienen en la lectura excepto el que se desea medir. Todas las medidas que se hagan con posterioridad serán referidas a esta medida inicial y se harán en la misma cubeta que se utilizó en la medida del blanco.

La transmitancia es de uso poco convencional, se emplea más la absorbancia (A) porque la relación entre A y la concentración de una solución es directamente proporcional y la de la T es inversamente proporcional.

La relación entre la absorbancia y la transmitancia es la siguiente:

$$\text{Si el } \%T = 100 \text{ entonces } A = 2 - (\log T) = 2 - (\log 100) = 0$$

$$\text{Si el } \%T = 0 \text{ entonces } A = 2 - (\log 0) = \infty$$

#### 6.10.3.1. Ley de Beer

La ley de Beer establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración y a la longitud del paso de la luz.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Siendo:

**A:** absorbancia. No tiene unidades.

**$\epsilon$ :** el coeficiente de absorción. Es constante para un compuesto dado siempre que se fijen condiciones de longitud de onda, de pH, de temperatura, de solventes, etc. Sus unidades son  $1/(\text{mol}/\text{cm}^2)$ .

**b:** es la longitud de paso de la luz, en cm.

**c:** es la concentración del absorbente. Se mide en mol/ml.

La aplicación práctica de la Ley de Beer es, que conociendo la absorbancia de una sustancia se puede determinar su concentración y esto se hace a través de una curva de calibración, la cual no es más que la representación gráfica en un eje de coordenadas la absorbancia (eje de ordenadas), frente a la concentración (eje de abscisas).

La aplicación de una curva de calibración es muy práctica, se ensayan varias soluciones de concentración conocida y se determinan sus absorbancias, construyéndose la curva

de calibrado, que es una recta. Cuando se ensayan las soluciones problema, sus concentraciones se determinan por interpolación de las absorbancias de las soluciones problema frente a la curva de calibración.

Hay que tener en cuenta la *linealidad* que es el intervalo de concentraciones entre las cuales existe una relación lineal entre absorbancia y concentración.

“Cuando la concentración del cromógeno sobrepasa los límites de linealidad se deja de cumplir la Ley de Beer, convirtiéndose la recta en una curva. La lectura de la absorbancia fuera de los límites de linealidad se traduce en una concentración falsamente baja de cromógeno. En esta situación, hay que diluir la muestra para que su concentración entre en los límites de la linealidad”.<sup>8</sup>

#### **6.10.4. Influencia del disolvente**

Como consecuencia de las interacciones soluto–disolvente se originan con frecuencia desplazamientos espectrales, ensanchamientos de bandas y otros fenómenos que pueden provocar desviaciones en la ley de Beer.

“Los desplazamientos espectrales son los siguientes: desplazamiento batocrómico o desplazamiento hacia el rojo, consiste en un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores (este efecto suele producirse en disolventes de alta constante dieléctrica). Desplazamiento hipsocrómico o desplazamiento hacia el azul, es el desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas”.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup>. *Conocimiento de técnicas analíticas parte I: fundamentos de espectrofotometría. (En línea). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>.*

### **6.10.5. Influencia de la temperatura**

La temperatura puede influir y modificar el equilibrio químico de algunos sistemas, así como, en ocasiones, dar lugar a desplazamientos batocrómicos. De todas formas, la temperatura no suele ser un factor a considerar en la mayor parte de los sistemas absorbentes sencillos.

### **6.10.6. Presencia de impurezas en los reactivos**

Muchos métodos espectrofotométricos son muy sensibles como para detectar cantidades a nivel de trazas, por lo que la presencia de impurezas absorbentes en los mismos reactivos puede originar errores considerables. Debido a ello, en la práctica analítica ordinaria, las medidas espectrofotométricas se llevan a cabo frente a un blanco constituido por la propia celda, el disolvente y los reactivos.

En este caso interesa que la absorbancia del blanco sea pequeña, pues si es grande, un pequeño error en su medida puede implicar un gran error relativo en el resultado final.

### **6.10.7. Interacciones entre especies absorbentes**

Cuando en una disolución existen varias especies absorbentes, la ley de Beer se cumple para cada una de ellas, si todas actúan de forma independiente. “La interacción entre las diferentes especies absorbentes puede producir alteraciones en la distribución de cargas, como consecuencia de lo cual puede modificarse la energía requerida para la absorción y, en consecuencia, variaciones en la posición, forma y altura de las bandas de absorción. Por otra parte, estas alteraciones en la distribución de cargas también pueden ser originadas por la presencia de sales inertes, con el consiguiente aumento de la fuerza iónica de la disolución”.<sup>8</sup>

### **6.10.8. Interacciones soluto–radiación electromagnética**

Aunque en sentido estricto no son factores de tipo químico, también deben considerarse este tipo de interacciones. Así, la posible emisión de resonancia y la presencia de fenómenos fluorescentes y fosforescentes pueden originar desviaciones aparentes en la ley de Beer.

---

<sup>8</sup> *Conocimiento de técnicas analíticas parte I: fundamentos de espectrofotometría. (En línea). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>.*

### 6.10.9. Errores personales

Aquí, los mayores errores suelen cometerse por el uso inadecuado de las cubetas de absorción, y los otros materiales, de manera especial también el uso inadecuado de la cristalería. Para lo cual resulta de utilidad mencionar las siguientes recomendaciones:

- Es necesario asegurarse de que las cubetas están perfectamente limpias, no rayadas y exentas de huellas o adherencias en las paredes por las que ha de pasar la radiación.
- Las cubetas de vidrio y cuarzo pueden limpiarse con ácido nítrico o con agua regia en frío, pero no con mezcla crómica.
- Una vez limpias, las cubetas deben enjuagarse con agua destilada y con varias porciones de la disolución a medir.
- No deben secarse interiormente, mientras que el exterior debe secarse con papel suave, comprobando, además, que, una vez llena con la disolución problema, no contiene burbujas de aire.
- Aunque se debe trabajar con cubetas idénticas para la muestra y la referencia (blanco), es buena práctica utilizar siempre la misma disolución en cada una de ellas.
- Cuando se miden los reactivos, utilizar los instrumentos y cristalería adecuada y de alta precisión.
- Realizar los análisis en el tiempo recomendado ya que la interacción entre reactivos y solutos puede incrementar, originando esto un aumento de la absorción.

### 6.11. Instrumentación en la espectrofotometría

El instrumento que se utiliza con mucha frecuencia para medir la transmitancia o la absorbancia de una muestra en función de la longitud de onda, es el **espectrofotómetro**. Antes de pasar a describir sus componentes básicos, es conveniente indicar algunos términos relacionados con los métodos ópticos de análisis. Las definiciones que se darán a conocer, no pueden considerarse universales, pero sí están muy bien aceptadas en los campos o áreas dedicadas al tema.

### **6.11.1. Fotómetro**

“Se denomina así a cualquier dispositivo utilizado para medir la intensidad de radiación. Por lo general se utiliza para este término para designar a un instrumento sencillo provisto de filtros para seleccionar una banda de longitudes de onda, de una fotocélula o un fototubo para medir la intensidad de radiación.

### **6.11.2. Espectrofotómetro**

Instrumento más sofisticado que posee un monocromador en lugar de filtros. Además, el sistema de detección, por lo general es un fotomultiplicador, más sensible que una fotocélula. Este equipo se detallará más adelante.

### **6.11.3. Colorímetro**

Instrumento muy simple que utiliza el ojo humano como detector, aquí se compara el color de la sustancia problema con el de una disolución patrón. (El nombre de colorímetro suele aplicarse en la práctica a cualquier instrumento apropiado para medir en la región visible, y, en realidad, así se conocen muchos fotómetros de filtro comerciales).

### **6.11.4. Espectroscopio**

Aparato diseñado para detectar líneas espectrales a simple vista. Su aplicación está restringida al análisis cualitativo y para elementos con líneas de emisión en la zona visible del espectro.

### **6.11.5. Espectrógrafo**

Instrumento que registra líneas espectrales sobre una placa fotográfica”<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup> *Conocimiento de técnicas analíticas parte I: fundamentos de espectrofotometría. (En línea). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>.*

## 6.12. Espectrofotómetro

Denominación general que se aplica a instrumentos que poseen sistemas de detección eléctricos. También es muy común que a los espectrofotómetros se les llamen espectrómetros, ya que miden fotones. Su utilización suele limitarse, en la práctica, a la región ultravioleta, visible e infrarroja.

Los componentes básicos de un espectrofotómetro son: una fuente de radiación, un monocromador, que seleccione una banda estrecha de longitudes de onda, una cubeta o recipiente que contenga la muestra, un detector de radiación y un sistema de lectura de la señal detectada. (Ver anexo, figura 3)

### 6.12.1. Fuentes de radiación

Las fuentes de radiación utilizadas en espectrofotometría ultravioleta y visible deben ser continuas en una amplia zona del espectro, de intensidad elevada y ser esencialmente constante con la longitud de onda.

“En la zona ultravioleta y visible, las fuentes más utilizadas son de dos tipos: fuentes térmicas, basadas en la emisión de radiación por efecto de la temperatura, y fuentes cuya radiación se debe a descargas eléctricas producidas en el seno de gases. Entre las primeras, la más común es la lámpara de filamento de wolframio. En condiciones ordinarias de operación, esta lámpara resulta útil entre unos 350 nm y unos 3000 nm”.<sup>9</sup> Con las lámparas de wolframio, la mayor parte de la energía emitida corresponde a la zona infrarroja.

“La distribución de la energía depende de la temperatura del filamento, la cual depende, a su vez, del voltaje; un incremento en la temperatura de operación aumenta la energía total emitida y desplaza el máximo de intensidad hacia longitudes de onda más cortas. Sin embargo, en la práctica, esto no se utiliza para obtener mayor cantidad de radiación ultravioleta, ya que se acorta considerablemente el tiempo de vida de la lámpara”.<sup>9</sup>

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

Debido a que la radiación emitida depende de forma muy específica del voltaje suministrado, éste tiene que ser muy estable, por lo cual los instrumentos llevan incorporado un sistema para la estabilización de la corriente. Por otra parte, el calor producido por la lámpara puede constituir un problema, por lo que, con frecuencia, en el lugar donde se coloca la lámpara se instala un ventilador con objeto de evitar el calentamiento de la muestra y de los demás componentes del instrumento.

“Por debajo de 350 nm, la potencia de una lámpara de wolframio es inadecuada, debiéndose emplear una fuente diferente. La más común es una lámpara de descarga de hidrógeno, o de deuterio. Cuando se produce una descarga eléctrica entre dos electrodos en el seno de un gas, como hidrógeno, las colisiones entre los electrones de la descarga y las moléculas gaseosas provocan la excitación electrónica, vibracional y rotacional de dichas moléculas, con lo que se obtiene un espectro de líneas que es característico del gas, siempre que la presión sea baja. Al aumentar la presión, las líneas se ensanchan, llegando a superponerse, hasta que, a presiones relativamente altas (0.2–5 mm) se produce un espectro continuo.

Tanto la lámpara de hidrógeno como la de deuterio tienen un intervalo de utilización comprendido entre 175 y 350 nm (ver anexo, figura 4). También se utilizan con la misma finalidad la lámpara de descarga de xenon y la de vapor de mercurio.”<sup>9</sup>

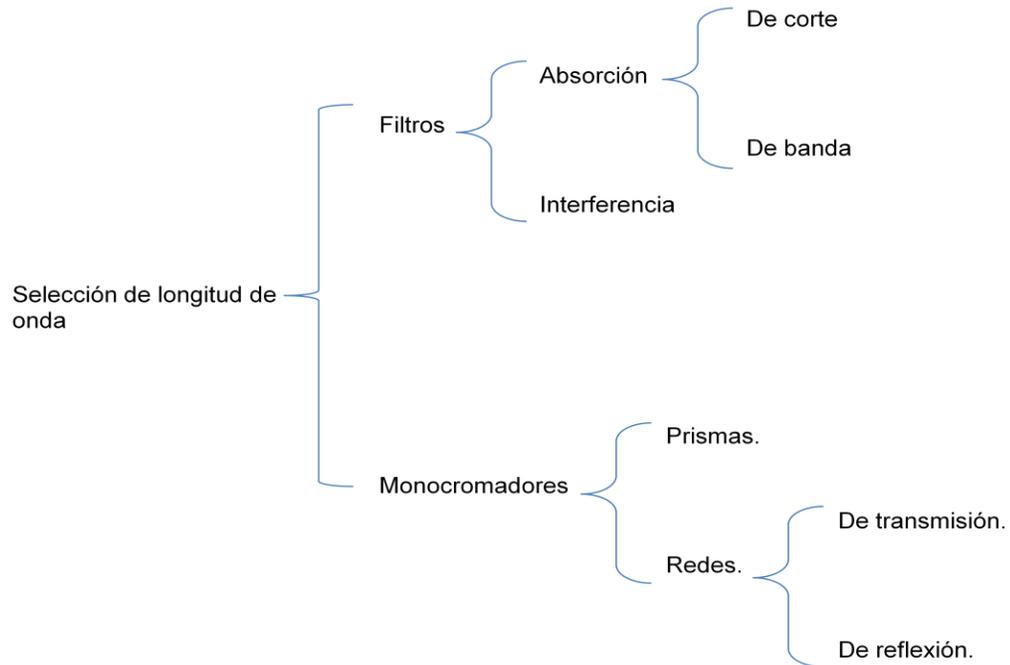
Es importante mencionar que, puesto que el vidrio absorbe fuertemente a longitudes de onda inferiores a unos 350 nm, con las lámparas de ultravioleta deben utilizar cubetas de cuarzo.

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

### 6.12.2. Filtros y monocromadores

La finalidad de los filtros y de los monocromadores es seleccionar un haz de radiación monocromática. Con este fin se utilizan los dispositivos mostrados en el siguiente esquema:



“Los filtros de absorción se utilizan en la región visible y se basan en la absorción selectiva de ciertas longitudes de onda. Normalmente consisten en un vidrio coloreado o una suspensión de un colorante en gelatina que se coloca entre dos placas de vidrio. Los filtros de banda (ver anexo, figura 5. A) se caracterizan por su anchura de banda (anchura a la mitad de la altura) que puede oscilar entre 30 y 250 nm.

Los filtros de corte tienen transmitancia de casi el 100 % en una zona del espectro visible, pero luego disminuye rápidamente hasta un valor de transmitancia cero (ver anexo, figura 5.B). Por combinación de diferentes filtros pueden seleccionarse bandas espectrales relativamente estrechas.”<sup>9</sup>

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

“Un monocromador se caracteriza por producir un haz de radiación de gran pureza espectral y permitir variar, de forma continua y en un amplio intervalo, la longitud de onda de la radiación. Los componentes básicos de un monocromador son una rendija de entrada, que selecciona un haz de radiación policromática entrante, un elemento dispersante, prisma o red, que dispersa la radiación en sus longitudes de onda individuales, y una rendija de salida, que aísla la banda espectral deseada”.<sup>9</sup> (Ver anexo, figura 6.)

“La dispersión de radiación por un prisma se basa en el fenómeno de la refracción; esto es, el cambio de dirección que experimenta un haz de radiación al pasar de un medio a otro con distinto índice de refracción. El grado de desviación depende de la longitud de onda; así, los azules se desvían más que los rojos”.<sup>9</sup>

El material de que está construido el prisma va a depender del tipo de radiación a dispersar, en la región visible se usan prismas de vidrio, mientras que en el ultravioleta es necesario usarlos de cuarzo.

Los prismas presentan las ventajas de su gran pureza espectral, pero por otro lado presenta un principal inconveniente, el cual reside en que la dispersión no es lineal, esto es, las longitudes de onda no se dispersan de manera uniforme, es mayor para las longitudes de onda más cortas.

### **6.12.3. Recipientes para las muestras**

“En espectrofotometría analítica, casi siempre se trabaja con soluciones, por lo cual la mayoría de los recipientes para las muestras son celdas o cubetas para colocar los líquidos en el haz del espectrómetro. Estos recipientes deben estar fabricados con un material que permita el paso de radiación de la región espectral de interés, con la menor dificultad posible. Así, el vidrio puede emplearse entre 350 y 2000 nm, mientras que en la región ultravioleta se necesita cuarzo o sílice fundida (ambas sustancias también son transparentes en la región visible).

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

En algunos instrumentos sencillos se utilizan a veces tubos de ensayo como recipientes para las muestras. Es importante que estos tubos siempre se coloquen igual, para lo que se marcan en un lado, y la marca siempre se coloca en la misma dirección cuando se coloca el tubo en el compartimento de cubetas del instrumento.”<sup>9</sup>

Las cubetas se deben llenar de tal forma que el haz de radiación pase a través de la solución, con el menisco por encima del haz. Las celdas típicas para las regiones ultravioleta y visible tienen 1 cm de paso óptico, si bien existe una gran variedad en cuanto a tamaño, forma y otras peculiaridades (ver anexo, figura 7).

#### **6.12.4. Detectores**

Los detectores usados en espectrofotometría ultravioleta y visible son transductores que convierten la energía radiante en una señal eléctrica. Un detector ideal deberá presentar las características siguientes:

- \* Sensibilidad elevada en la región espectral de interés.
- \* Respuesta lineal para la energía radiante.
- \* Tiempo de respuesta pequeño.
- \* Utilizable en un amplio intervalo de longitudes de onda.
- \* Elevada relación señal/ruido.
- \* Mínima señal de salida en ausencia de radiación.
- \* Buena disponibilidad para la amplificación.

Sin embargo, no existe el detector ideal, por lo que en la práctica, se evalúan todos los factores anteriores y se selecciona algún detector que resulte adecuado al caso. Los más utilizados son: células fotovoltaicas, fototubos y tubos fotomultiplicadores.

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

### 6.12.5. Células fotovoltaicas

“Consisten en una placa de hierro, que actúa de electrodo positivo, sobre la que se deposita una fina capa de un material semiconductor, como selenio, y éste se recubre de una capa muy fina de oro o plata, que actúa como segundo electrodo o electrodo colector. (Ver anexo, figura 8.)

Cuando la radiación electromagnética incide sobre el selenio, se promocionan electrones a las bandas de conducción, haciendo que pasen electrones desde la superficie del selenio hasta el electrodo colector de plata, produciéndose un aumento de la conductividad proporcional al número de fotones que inciden sobre la superficie del semiconductor”.<sup>9</sup>

Las células fotovoltaicas presentan las siguientes características: son sencillas de construir, son baratas y no requieren una fuente de energía externa, por lo que pueden conectarse de forma directa a un amperímetro.

En cuanto a los inconvenientes se tiene lo siguiente: el uso es limitado a la región visible (su máxima sensibilidad se presenta cerca de los 550 nm, mientras que la respuesta a 350 y a 750 nm disminuye hasta un diez por ciento de su capacidad).

### 6.12.6. Fototubos

Consisten en un cátodo semicilíndrico recubierto en el interior de un material fotosensible, y un ánodo, en el interior de un recipiente en el que se ha hecho el vacío (ver anexo, figura 9).

Cuando la radiación incide sobre el cátodo, se produce una emisión de fotoelectrones que se dirigen al ánodo, originándose una corriente que de manera posterior se amplifica. La emisión de electrones depende de la naturaleza de la superficie del cátodo y de la frecuencia de la radiación. En el comercio existen fototubos que difieren en el material con el que está construida la superficie del cátodo, siendo, por tanto, diferente su respuesta a la radiación de diversas frecuencias.

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

Muchos espectrofotómetros están provistos de detectores intercambiables que permiten mantener una buena respuesta en un amplio margen de longitudes de onda. En general, puede concluirse que los fototubos son más sensibles que las células fotovoltaicas, por la posibilidad de poder amplificar la corriente generada.

#### **6.12.7. Tubos fotomultiplicadores**

“El tubo fotomultiplicador es una versión sofisticada de un fototubo, pero mucho más sensible. Además del cátodo fotoemisor, el tubo contiene una serie de electrodos recubiertos llamados dínodos cada uno sometido a un potencial (50-100 volts) más positivo que el precedente. El cátodo está recubierto con una superficie fotoemisora como la utilizada en los fototubos.

Los dínodos están recubiertos con compuestos como BeO, CsSb que desprenden varios electrones cuando son bombardeados con electrones de alta energía. Cada dínodo está configurado para enfocar los electrones emitidos hacia el dínodo siguiente.

La radiación que llega al fotocátodo provoca la emisión de electrones primarios que son acelerados hasta el primer dínodo. Al incidir en él, cada fotoelectrón origina la emisión de varios electrones adicionales; éstos a su vez son acelerados hasta el dínodo siguiente y así de forma sucesiva, hasta que al final, la corriente producida se recoge en el ánodo, se amplifica de forma electrónica y se mide”.<sup>9</sup>

Los tubos fotomultiplicadores contienen nueve o diez dínodos, los cuales originan hasta cien mil electrones por cada fotoelectrón generado en el cátodo. Esta alta amplificación interna significa que pueden ser detectadas potencias radiantes muy bajas sin necesidad de una amplia amplificación externa.

El sistema se caracteriza por su respuesta rápida y elevada sensibilidad (ve anexo, figura 10).

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

### 6.13. Aplicaciones

En general, cualquier especie química que absorba radiación electromagnética en las regiones ultravioleta o visible puede ser determinada por técnicas espectrofotométricas. El mayor campo de aplicación se encuentra en el análisis cuantitativo, siendo la espectrofotometría una de las herramientas más usadas.

#### 6.13.1. Análisis cuantitativo

Ya se ha comentado que la espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible es una de las técnicas más usadas en análisis cuantitativo. Se ha estimado que solo en el campo biosanitario, un 95 % de las determinaciones cuantitativas se llevan a cabo por espectrofotometría.

En relación con los métodos clásicos de análisis (gravimétricos y volumétricos), los métodos espectrofotométricos son menos exactos, si bien su mayor sensibilidad y rapidez los hace competir de forma ventajosa con aquellos en muchas ocasiones. La precisión puede considerarse aceptable, ya que, por lo general se obtienen incertidumbres relativas entre 1 y 2 %, aunque con determinadas precauciones pueden reducirse de manera considerable.

La base de la aplicación de los métodos espectrofotométricos al análisis cuantitativo es la ley de Beer.

El procedimiento a seguir para llevar a cabo una determinación analítica consta de una serie de etapas encaminadas a establecer las condiciones de trabajo y la preparación de la curva de calibrado.”<sup>9</sup>

La formación de especies absorbentes mediante el uso de reactivos adecuados hace necesario considerar toda una serie de factores, entre los que cabe mencionar los siguientes:

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

**6.13.1.1. pH:** “Esta variable suele jugar un papel muy importante en las reacciones de formación de complejos, complejos que pueden influir en la absorbancia de las moléculas.

**6.13.1.2. Concentración de los reactivos:** De forma previa a cualquier nueva determinación espectrofotométrica es necesario establecer los márgenes de concentraciones adecuados de los reactivos, ya que cantidades demasiado grandes o demasiado pequeñas pueden originar desviaciones de la ley de Beer.

**6.13.1.3. Tiempo adecuado para la medida:** Cuando la especie absorbente es estable y su formación es rápida, no es necesario controlar el tiempo en que se debe realizar las medidas. Pero sin embargo es importante tomar esto en consideración.

**6.13.1.4. Temperatura:** Determinadas reacciones requieren operar a temperatura elevada para aumentar la cinética de formación de un determinado complejo. En estas ocasiones la temperatura de trabajo deberá especificarse en el procedimiento.

**6.13.1.5. Orden de adición de los reactivos:** A veces, es importante añadir los reactivos según una determinada secuencia. Por ejemplo, la determinación de cobalto mediante la formación del complejo entre Co(III) y nitrilotriacetato implica la formación previa de un complejo con Co(II), por lo cual el peróxido de hidrógeno (oxidante) debe añadirse en último lugar.

**6.13.1.6. Eliminación de interferencias:** Existen muy pocas reacciones que sean en su totalidad específicas, por lo que en muchas ocasiones es necesario eliminar las interferencias de determinadas especies, lo cual con frecuencia, se consigue por enmascaramiento.

**6.13.1.7. Extracción con disolventes orgánicos:** La eliminación de sustancias interferentes puede llevarse a cabo en ocasiones mediante la extracción con algún disolvente orgánico inmiscible con el agua, aunque también puede recurrirse a esta técnica cuando la especie absorbente es poco soluble en agua.”<sup>9</sup>

---

<sup>9</sup>. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).*

**6.13.1.8. Concentración de sales:** Altas concentraciones de electrólitos influyen de forma frecuente sobre la absorción de determinados compuestos, debido a la formación de asociaciones iónicas que originan desplazamientos de la absorbancia.”<sup>9</sup> Los efectos de las variables mencionadas con anterioridad deben conocerse y en consecuencia, escogerse un conjunto de condiciones de trabajo de forma que la absorbancia no sea afectada de manera apreciable.

#### **6.14. Análisis de correlación**

El análisis de correlación es un índice estadístico que mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Emplea métodos para medir la significación del grado o intensidad de asociación entre dos o más variables. El coeficiente de correlación debe ser:

- Grande cuando el grado de asociación es alto (cerca de +1 o -1), y pequeño cuando el grado de asociación es bajo (cerca de cero).
- Independiente de las unidades en que se miden las variables.

##### **6.14.1. Coeficiente de correlación lineal simple (r)**

Indica el grado o intensidad de asociación entre las variables X e Y. Su valor varía entre -1 y +1; esto es:  $-1 \leq r \leq 1$ .

Si  $r = -1$ , la asociación es perfecta pero inversa; es decir, a valores altos de una variable le corresponde valores bajos a la otra variable, y viceversa. Si  $r=+1$ , también la asociación es perfecta pero directa. Si  $r=0$ , no existe asociación entre las dos variables. Luego puede verse que a medida que r se aproxime a -1 o +1 la asociación es mayor, y cuando se aproxima a cero la asociación disminuye o desaparece.

“ El coeficiente de correlación está dado por:

---

---

$$\text{Error estándar de } r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

Si el valor del r calculado supera al valor del error estándar multiplicado por la t de Student con n-1 grados de libertad, se dirá que el coeficiente de correlación es significativo.

El nivel de significación viene dado por la decisión que se adopte al buscar el valor en la tabla de la t de Student. Este proceso de razonamiento es válido tanto para muestras pequeñas como para muestras grandes.<sup>10</sup>

---

<sup>10</sup>. *Análisis de regresión y correlación s.f. (En línea). Consultado el 10-07-2012. Disponible en: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/index-filer/academic/metodos1/Regresion.pdf>.*

## 7. OBJETIVOS.

### 7.1. General

- 1 Evaluar un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en las mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución.

### 7.2. Específicos

- a. Diseñar los modelos de marchas analíticas que se utilizarán para el desarrollo del método espectrofotométrico.
- b. Elaborar curvas patrón de concentración y absorbancia de los azúcares en estudio, para establecer una ecuación de regresión que se utilizará en la obtención de resultados experimentales.
- c. Establecer el costo y tiempo de análisis de cada uno de los métodos para demostrar la eficiencia del método espectrofotométrico.
- d. Comparar los resultados del método espectrofotométrico con el cromatográfico mediante la T de student, para establecer si existe diferencia estadística entre éstos.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Recursos

#### 8.1.1. Humanos

- T.U. Eduardo Francisco Tun Velásquez.
- Asesora principal: Inga. Aurora Carolina Estrada.
- Asesor adjunto: Ing. Fernando Ramírez.
- Personal de recepción de mieles.

#### 8.1.2. Institucionales

- Destiladora de Alcoholes y Ronas S.A. (DARSA).
- Centro Universitario del Sur Occidente. (CUNSUROC).

#### 8.1.3. Físicos

- Laboratorio de control de calidad de DARSA.

#### 8.1.4. Financieros

- Todos los gastos serán financiados por DARSA.

#### 8.1.5. Materiales

- 10 Balones aforados de 100 ml.
- 1 Pizeta.
- 1 Cubeta estándar cuadrada de 10 mm.
- 1 Pipeta serológica de 5 ml
- 1 Pipeta de émbolo capilar.
- 10 Viales de vidrio o tubos de ensayo.
- 1 Termómetro de 0-100 °C.
- 1 Beaker de 10 ml
- 1 Balón aforado de 1000 ml.
- 1 Beaker de 250 ml.

### 8.1.6. Reactivos

- Glicemia enzimática AA.
- Glucosa anhidra estándar ( $C_6H_{12}O_6$ ).
- Fructosa anhidra estándar ( $C_6H_{12}O_6$ ).
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ ).
- Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH).
- Tartrato de potasio y sodio tetrahidratado ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ).
- Ácido clorhídrico (HCl) al 15%
- Ácido sulfúrico diluido ( $H_2SO_4$ ) al 0.5%.

### 8.1.7. Equipo

- Espectrofotómetro.
- Baño María.
- Balanza analítica.

## 8.2. Procedimiento para la realización de curva patrón de glucosa con glicemia enzimática AA

1. Se preparó una serie de diluciones con agua desmineralizada a partir de glucosa estándar. Las concentraciones fueron de 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 y 4500 mg/l. Se utilizó balones aforados de 100 ml con tapón, marcados con la concentración correspondiente. La preparación se realizó de la siguiente manera:
2. Para la concentración 0. Sólo se utilizó agua desmineralizada, para todas las demás, se procedió como lo indica la tabla No. 2. Se aforó a 100 ml con agua desmineralizada.

**Tabla No.2. Preparación de concentraciones de glucosa**

Número de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración a preparar	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500
Gramos de glucosa a pesar	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45

Fuente. Elaboración propia.

**Tabla No. 3. Preparación de muestras para curva de glucosa**

Número de la muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución estándar de glucosa (matraz)	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500
Volumen de solución estándar de glucosa ( $\mu$ l)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volumen de reactivo Glicemia enzimática AA (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Fuente. Elaboración propia.

3. Se colocaron en tubos de ensayos las cantidades establecidas en la tabla No. 3.
4. Se incubaron durante cinco minutos en baño de agua a 37 °C.
5. Luego se leyeron en espectrofotómetro a 505 nm con la cubeta de 10 mm.
6. Se graficó la absorbancia contra la concentración. Se utilizó esta curva estándar para determinar la concentración de glucosa en las muestras a estudiar.
7. Con los datos obtenidos se estableció una ecuación de regresión.

### 8.3 Procedimiento para la realización de curva patrón de fructosa con ácido 3,5-dinitrosalicílico

#### 8.3.1. Preparación del reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA)

1. Se disolvió 10 g. de DNSA ( $C_7H_4N_2O_7$ ) en 500 ml de agua desmineralizada.
2. Se agregó 16 g de hidróxido de sodio en lentejas a la dilución del DNSA.
3. Se calentó la solución en baño maría a  $65^\circ C$  y mezcló de manera perfecta hasta que la solución se aclaró.
4. Se agregó 300 g. de tartrato de potasio y sodio tetrahidratado.
5. Se aforó a 1 litro la dilución con agua desmineralizada y se dejó reposar durante 24 horas antes de usar por primera vez.

#### 8.3.2. Procedimiento para la realización de curva patrón

1. Se preparó una serie de diluciones con agua desmineralizada a partir de fructosa estándar. Las concentraciones fueron de 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 y 4500 mg/l. Se utilizó balones aforados con tapón de 100 ml, marcados con la concentración correspondiente. La preparación se realizó de la siguiente manera:
2. Para la concentración 0. Se utilizó sólo agua desmineralizada, para todas las demás, se procedió como lo indica la tabla No. 4. Se aforó a 100 ml con agua desmineralizada.

**Tabla No.4. Preparación de concentraciones de fructosa**

Número de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración a preparar	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500
Gramos de fructosa a pesar	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45

Fuente. Elaboración propia.

**Tabla No. 5. Preparación de muestras para curva de fructosa**

<b>Número de la muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Solución estándar de fructosa (matraz)</b>	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500
<b>Volumen de solución estándar de fructosa (µl)</b>	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>Volumen de reactivo DNSA (ml)</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Fuente. Elaboración propia.

3. Se colocaron en tubos de ensayo las cantidades establecidas en la tabla No. 5 y se rotularon.
4. Se calentaron por 10 minutos en baño maría a 65 °C.
5. Se enfriaron de inmediato con agua fría y leyeron en el espectrofotómetro a 570 nm con la cubeta de 10 mm.
6. Se graficó la absorbancia contra la concentración, y se utilizó esta curva estándar para determinar la concentración de fructosa en las muestras a estudiar.
7. Con los datos obtenidos se determinó una ecuación de regresión.

## **8.4. Metodología para determinación de azúcar total en mieles con reactivo de Fehling. (Metodología base para la fase experimental).**

### **8.4.1. Materiales**

- Balón aforado de 250 ml.
- Pizeta.
- Pipeta volumétrica de 10 ml.
- Termómetro de 0-100°C.
- Beaker de 10 ml.
- Agitador magnético.
- Erlenmeyer de 250 ml.
- Bureta de 50 ml.

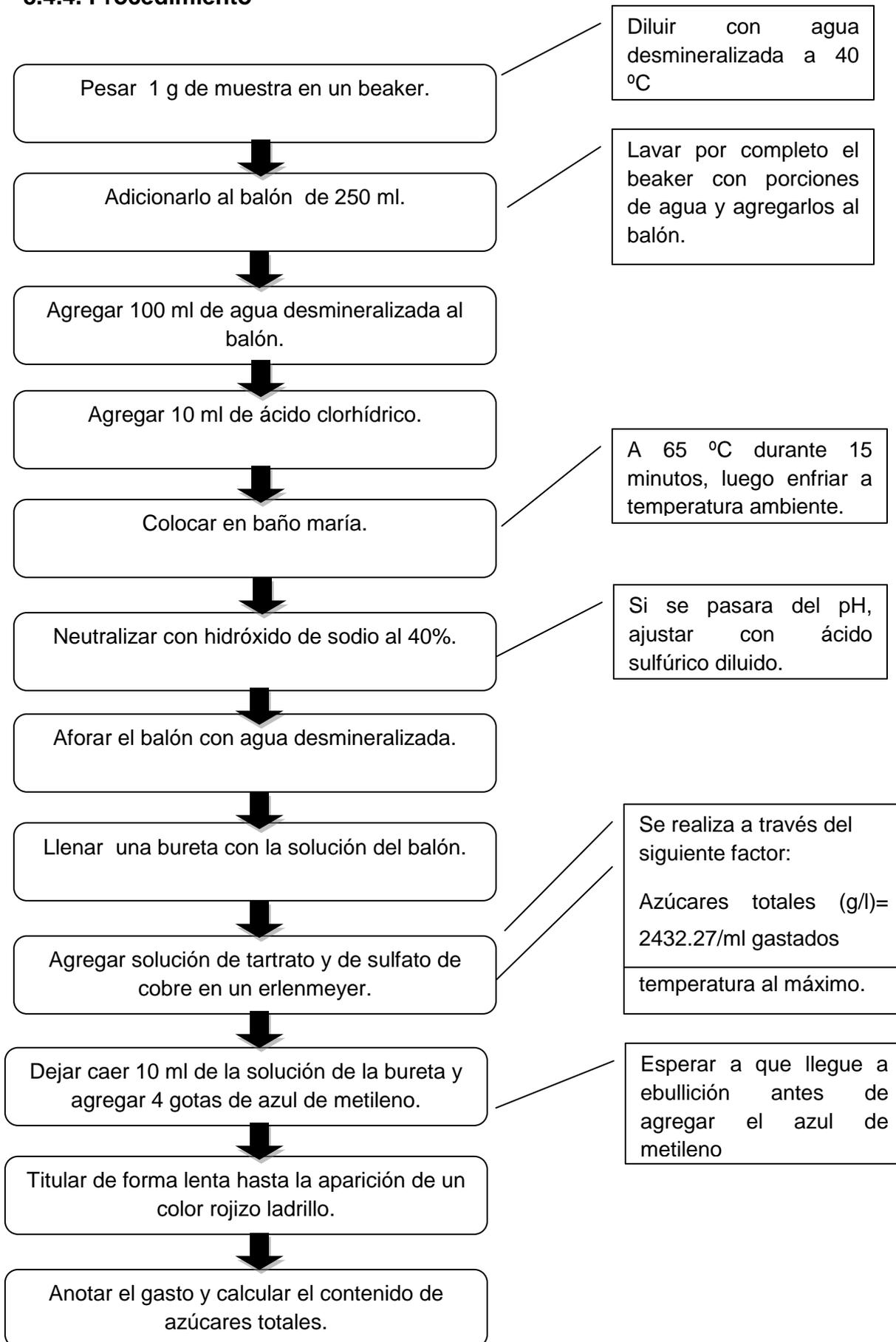
### **8.4.2. Reactivos**

- Hidroxido de sodio (NaOH) al 40%
- Azul de metileno al 1%
- Tartrato de potasio y sodio tetrahidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).
- Sulfato de cobre pentahidratado. ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 0.05%.
- Ácido clorhídrico (HCl) al 16%.

### **8.4.3. Equipo**

- Baño María.
- Balanza analítica.
- Plancha con agitación y calentamiento.

#### 8.4.4. Procedimiento



#### **8.4.5. Cálculos**

Factor: se determina cada vez que se prepara nuevo reactivo de Fehling y se realiza a través de una solución patrón de glucosa al 0.25% p/v.

La metodología anterior es la utilizada por el laboratorio de control de calidad de DARSA para el análisis de las mieles, ésta se utilizó como base para la realización de las marchas analíticas experimentales, luego de haber establecidos las diferentes curvas patrones.

#### **8.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se utilizó para determinar la probabilidad de que los resultados obtenidos en el experimento no se presentaron simplemente por casualidad. Para dicho análisis estadístico se utilizó la distribución de t de Student. Para cada compuesto que se estudió en las mieles (glucosa, fructosa y sacarosa), a un nivel de confianza del 95% y 99 %.

Se realizaron ocho ensayos por separado de una misma muestra problema. Con la tabulación de los datos obtenidos se pudo aplicar la t de Student y verificar si existió diferencia significativa entre los resultados experimentales y el valor real de la muestra (valor estándar), determinado a través de un método estandarizado (método por HPLC).

#### **8.6. Metodología para establecer costo y tiempo de análisis**

##### **8.6.1. Procedimiento para establecer costo**

1. Se anotaron los costos de los insumos (reactivos y materiales) utilizados para cada análisis.
2. Se anotaron los costos de la mano de obra.
3. Se anotaron los costos de electricidad.
4. Se estableció el porcentaje de ganancia del servicio de análisis.
5. Se estableció el costo total del análisis.

##### **8.6.2. Procedimiento para establecer tiempo de análisis**

1. Se cronometró el tiempo desde la preparación de las muestras hasta el momento de la obtención de resultados.
2. Se realizó el procedimiento en cada azúcar por separado.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 9.1. Calibración de equipo con estándares de glucosa

Tabla No. 6. Calibración de glucosa.

No	Concentración (mg/l)	Absorbancia
1	0	0
2	500	0.2290
3	1000	0.4650
4	1500	0.6880
5	2000	0.9220
6	2500	1.1990
7	3000	1.4290
8	3500	1.6640
9	4000	1.8620
10	4500	2.0950

Fuente: Elaboración propia.

#### 9.1.1. Fórmula de regresión lineal simple

El comportamiento de la calibración de glucosa, obedece a una línea recta, de la cual se puede deducir la siguiente ecuación.

$$Y=aX+b$$

**Donde:**

$$a= 2123.8610$$

$$b= 9.6550$$

X= absorbancia

Y= concentración de glucosa (mg/l)

Coefficiente de correlación (r)= 0.9996

## 9.2. Calibración de equipo con estándares de fructosa

**Tabla No. 7. Calibración de monosacáridos (fructosa).**

No	Concentración (mg/l)	Absorbancia
1	0	0
2	500	0.0850
3	1000	0.1930
4	1500	0.3100
5	2000	0.4420
6	2500	0.5830
7	3000	0.6810
8	3500	0.8180
9	4000	0.9610
10	4500	1.1140

Fuente: Elaboración propia.

### 9.2.1. Fórmula de regresión lineal simple

El comportamiento de la calibración de fructosa, obedece a una línea recta, de la cual se puede deducir la siguiente ecuación.

$$Y=aX+b$$

**Donde:**

$$a= 3900.7888$$

$$b= 251.8742$$

X= absorbancia

Y= concentración de glucosa (mg/l)

Coefficiente de correlación (r)=0.9990

Las calibraciones del equipo presentan un comportamiento lineal (ver gráficas 13.2 y 13.3 en apéndices), por lo cual se procedió a la determinación de la fórmula de regresión lineal simple, puesto que solo intervienen dos variables (concentración y absorbancia).

El coeficiente de correlación “r” para glucosa es de 0.9996 y para la fructosa es de 0.9990. Estos resultados de “r” indican que existe una relación fuerte entre las dos

variables estudiadas (concentración y absorbancia). La fórmula de regresión lineal establecida en la calibración de cada uno de los azúcares, es la utilizada en la obtención de los resultados experimentales. El apéndice No.13.1 y No. 13.2. Muestra las gráficas de cada una de las calibraciones.

### **9.3. Procedimientos experimentales**

#### **9.3.1. Cuantificación de glucosa en mieles**

##### **9.3.1.1. Materiales**

- Balón aforado de 250 ml.
- Pizeta.
- Cubetas fotométricas de 10 mm.
- Pipeta volumétrica de 5 ml
- Pipeta de embolo capilar (0-200  $\mu$ l)
- Viales de vidrio.
- Termómetro.
- Beaker de 10 ml.

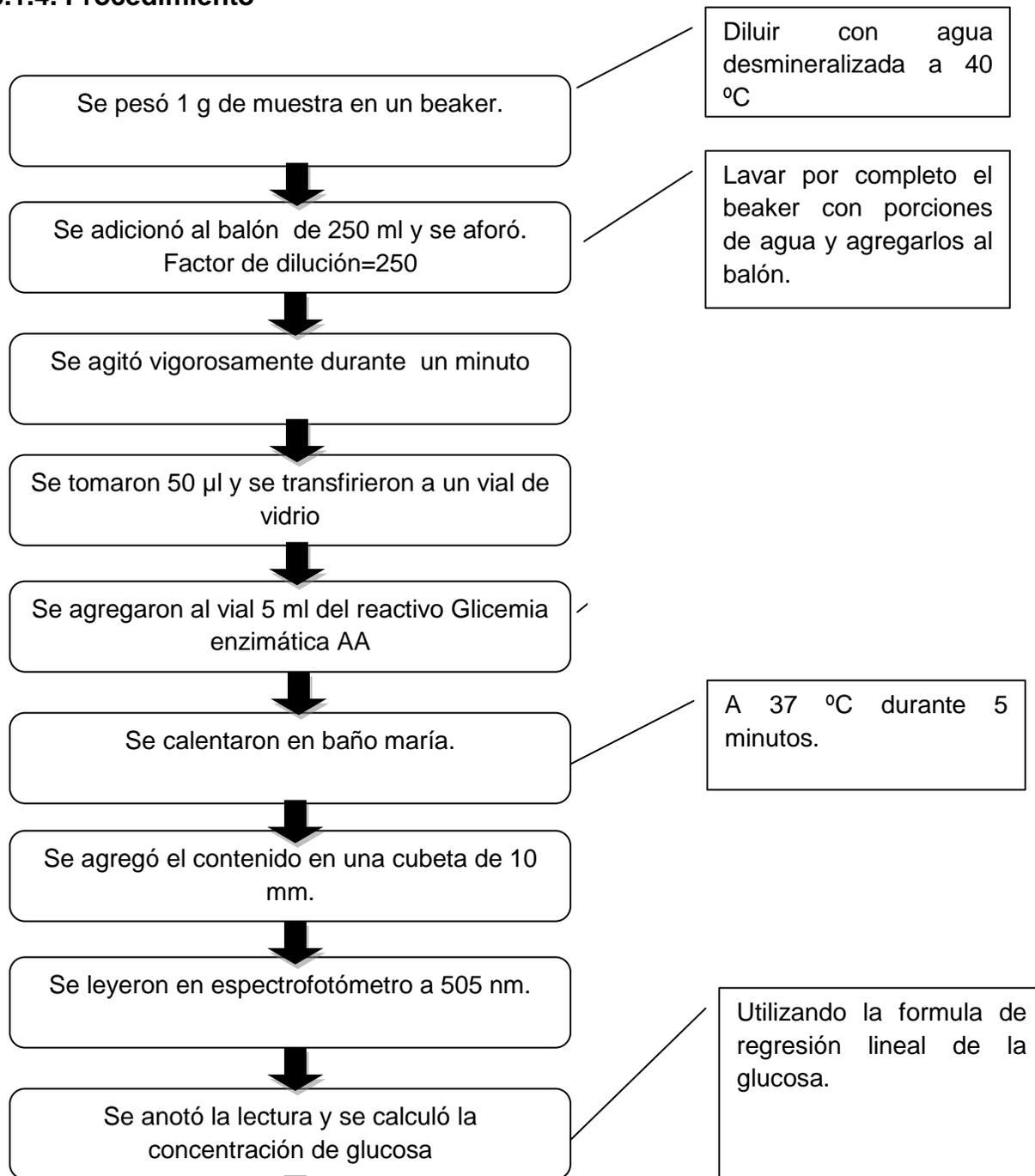
##### **9.3.1.2. Reactivos**

- Reactivo Glicemia enzimática AA.

##### **9.3.1.3. Equipo**

- Espectrofotómetro.
- Baño María.
- Balanza analítica.

### 9.3.1.4. Procedimiento



### 9.3.1.5. Cálculos

Glucosa (mg/l) = Resultado x F.

F= factor de dilución.

#### **Nota:**

El resultado se utilizó para el cálculo de sacarosa y fructosa. Este resultado se anotó como **G1**

### 9.3.2. Cuantificación de monosacáridos (fructosa) en mieles

#### 9.3.2.1. Materiales

- Balón aforado de 250 ml.
- Pizeta.
- Cubetas de 10 mm.
- Pipeta volumétrica de 5 ml
- Pipeta de embolo capilar (0-200 µl)
- Viales de vidrio.
- Termómetro.
- Beaker de 10 ml.

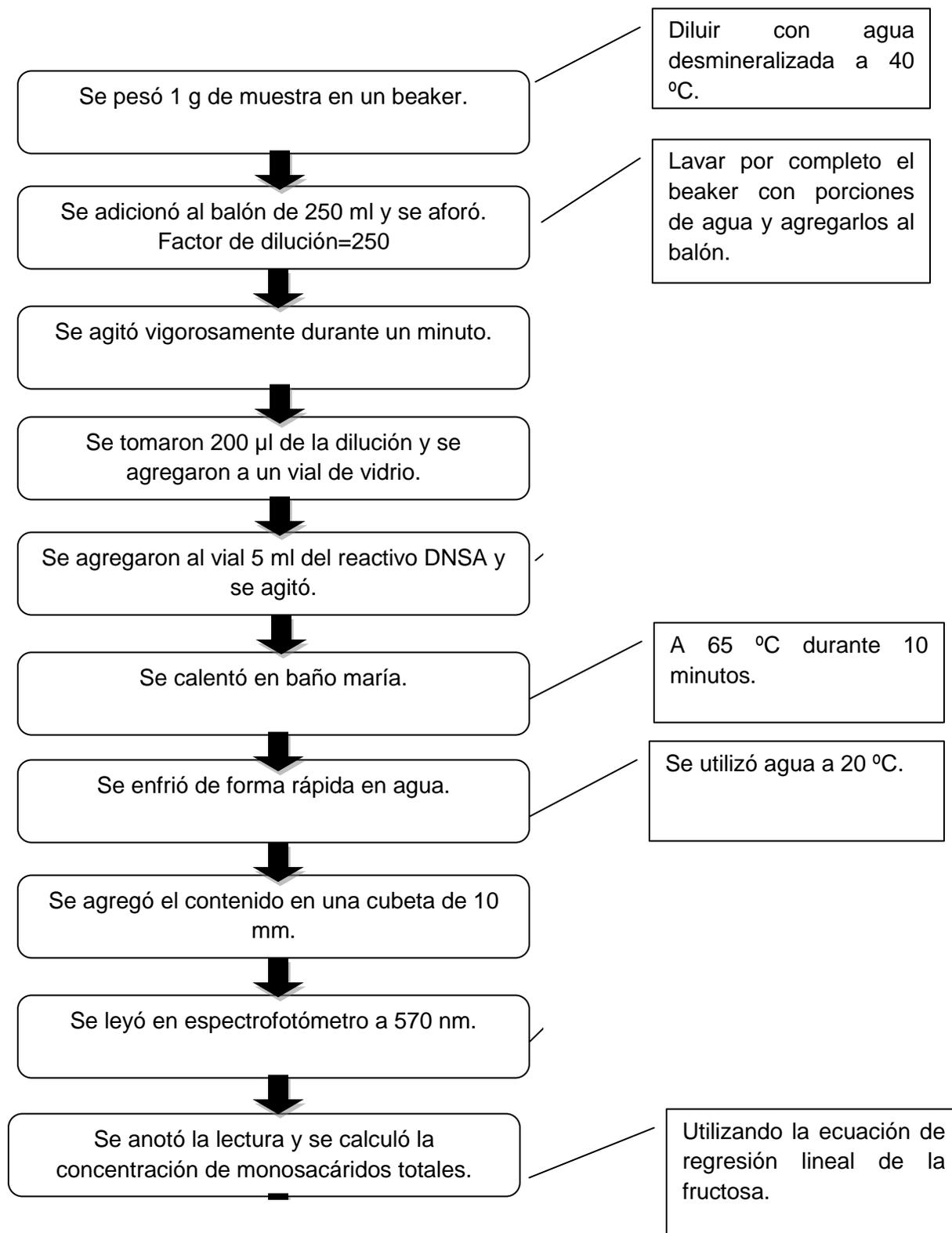
#### 9.3.2.2. Reactivos

- Reactivo de DNSA ( $C_7H_4N_2O_7$ ).

#### 9.3.2.3. Equipo

- Espectrofotómetro.
- Baño María.
- Balanza analítica.

### 9.3.2.4. Procedimiento.



### 9.3.2.5. Cálculos

Utilizando los monosacáridos totales (Amt) se calculó la fructosa.

$$\text{Fructosa (mg/l)} = (\text{Amt} \times F) - G_1$$

F= factor de dilución.

**Nota:** El ácido 3,5- Dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ ) reacciona también con la glucosa presente en la muestra por ser ésta un monosacárido, tanto la fructosa como la glucosa dan la misma coloración al reaccionar con este ácido, por ello es necesario restar la glucosa al resultado obtenido para poder así determinar el contenido real de fructosa presente.

### 9.3.3. Cuantificación de sacarosa en mieles

#### 9.3.3.1. Materiales

- Balón aforado de 250 ml.
- Pizeta.
- Cubetas de 10 mm.
- Pipeta volumétrica de 5 ml
- Pipeta de embolo capilar (0-200 $\mu$ l)
- Viales de vidrio.
- Termómetro.
- Beaker de 10 ml.

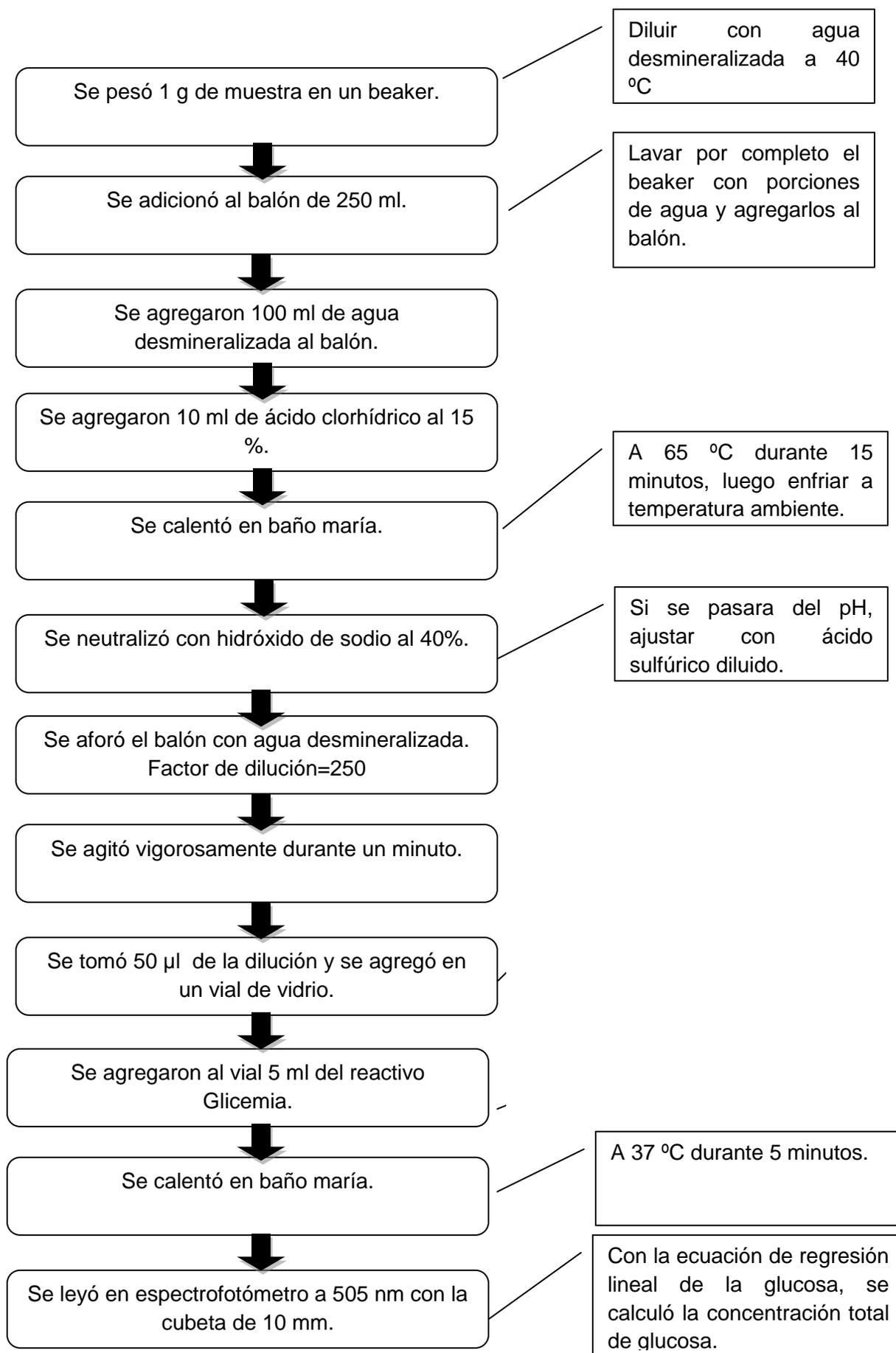
#### 9.3.3.2. Reactivos

- Glicemia enzimática AA
- Ácido Clorhídrico (HCl) al 15%
- Hidróxido de sodio (NaOH)al 40%
- Ácido sulfúrico diluido ( $H_2SO_4$ ) al 0.5%.

#### 9.3.3.3. Equipo

- Espectrofotómetro.
- Baño María.
- Balanza analítica.

### 9.3.3.4. Procedimiento



### 9.3.3.5. Cálculos

Se determinó la cantidad de glucosa total en la muestra y se denominó G2. Con ello se calculó la glucosa de hidrólisis.

Glucosa de hidrólisis (**G3**) = G2-G1

Sacarosa (mg/l )= G3 x 1.9 x F.

F= factor de dilución.

**Nota:** En este procedimiento se calculó la sacarosa a través de la relación estequiométrica que existe entre la glucosa y el disacárido.

Los procedimientos experimentales propuestos en los apartados 9.3.1; 9.3.2 y 9.3.3. Son los que mejor se adaptaron a la investigación y los que ofrecieron resultados estadísticos aceptables, los resultados experimentales obtenidos con estos procedimientos se presentan en el siguiente apartado.

#### 9.4. Resultados basados en procedimientos experimentales

**Tabla No. 8. Datos experimentales de una mezcla patrón de azúcares**

<b>Azúcares</b>	<b>Resultado experimental</b>	<b>Resultado de Referencia</b>
Fructosa (mg/l)	2001.5750	2000.0000
Glucosa (mg/l)	3003.20000	3000.0000
Sacarosa (mg/l)	4003.5588	4000.0000

Fuente. Elaboración propia.

**Tabla No. 9. Datos experimentales de una muestra de miel (melaza)**

<b>Azúcar</b>	<b>Resultado experimental</b>	<b>Resultado de Referencia *</b>
Glucosa (% m/m)	3.2484	3.2796
Fructosa (%m/m)	7.0519	7.0439
Sacarosa (%m/m)	37.5756	37.5215

Fuente. Elaboración propia.

*\* El resultado de referencia se obtuvo a través de un análisis por HPLC realizado por el Laboratorio Nacional de Salud, de Guatemala, C.A. (Ver anexo14.4).*

Los resultados de referencia presentados en la tabla No. 8. Se obtuvieron pesando 2000 mg de fructosa, 3000 mg de glucosa y 4000 mg de sacarosa y diluyéndolos en un volumen de 1 litro. Para luego realizar los respectivos análisis con los procedimientos experimentales.

Por otro lado, los resultados de la tabla No. 9. Se obtuvieron del análisis de una muestra común de melaza utilizada en el proceso de producción de alcohol etílico, mientras que los de referencia se obtuvieron del análisis de la misma melaza a través de HPLC, realizado por el Laboratorio Nacional de Salud.

Es importante mencionar que los resultados de referencia ofrecidos se encuentran expresados en % m/m, mientras que los experimentales son obtenidos en mg/l, para hacer uniforme los resultados de ambos métodos y así evaluarlos de forma estadística, se procedió con la conversión respectiva de los resultados experimentales a través de la densidad de la solución estudiada.

### 9.5. Análisis estadístico de resultados experimentales

Para el análisis estadístico se plantearon las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula ( $H_0$ ). Si  $t_{calc}$  “es menor o igual” que  $t_{crit}$  entonces, no existe diferencia significativa, por lo cual el resultado se acepta.
- Hipótesis alterna ( $H_a$ ). Si  $t_{calc}$  “es mayor” que  $t_{crit}$  entonces, existe diferencia significativa, por lo cual el resultado se rechaza.

**Tabla No. 10. Análisis estadístico de sacarosa en mezcla de azúcares.**

No. de prueba	Resultado experimental (mg/l)	Resultado de referencia ( mg/l)
1	4010.4800	
2	4004.5600	
3	3997.8600	
4	4002.5500	
5	4003.7900	
6	3998.6700	
7	4001.8000	
8	4008.7600	
$\Sigma$	32028.4700	
$\bar{X}$	4003.5588	4000.0000
<b>S</b>	4.4159	
<b>CV</b>	0.1103	
$t_{calc}$	2.2794	
$t_{crit}$ (95%)	2.3646	se acepta
$t_{crit}$ (99%)	3.4995	se acepta

Fuente. Elaboración propia.

**Donde:**

$\Sigma$ = sumatoria de datos.

$\bar{X}$ = media aritmética.

**S** = Desviación estándar.

**CV**= Coeficiente de variación.

$t_{calc}$ = t de student calculada. (Ver fórmula en anexo 14.4)

$t_{crit}$  (%)= t de student crítica o t de tabla, a un porcentaje de confianza. (Ver anexo 14.5)

La tabla No. 10 muestra que la cuantificación de sacarosa en la mezcla de azúcares a través del método experimental, no muestra diferencia significativa con respecto al resultado de referencia, puesto que  $t_{calc}$  es menor que  $t_{crit}(95\%)$  y  $t_{crit}(99\%)$ . El resultado se acepta ( $H_0$ .)

**Tabla No. 11. Análisis estadístico de glucosa en mezcla de azúcares**

<b>No. de prueba</b>	<b>Resultado experimental (mg/l)</b>	<b>Resultado de referencia ( mg/l)</b>
1	3002.1000	
2	3008.2500	
3	3001.9000	
4	3010.5500	
5	2998.4500	
6	3000.8000	
7	3004.4000	
8	2999.1500	
<b><math>\Sigma</math></b>	24025.6000	
<b><math>\bar{X}</math></b>	3003.2000	3000.0000
<b>S</b>	4.2860	
<b>CV</b>	0.1427	
<b><math>t_{calc}</math></b>	2.1117	
<b><math>t_{crit}</math> (95%)</b>	2.3646	se acepta
<b><math>t_{crit}</math> (99%)</b>	3.4995	se acepta

Fuente. Elaboración propia.

La tabla No. 11 muestra que la cuantificación de glucosa en la mezcla de azúcares a través del método experimental, no muestra diferencia significativa con respecto al resultado de referencia, puesto que  $t_{calc}$  es menor que  $t_{crit}(95\%)$  y  $t_{crit}(99\%)$ . El resultado se acepta ( $H_0$ .)

**Tabla No. 12. Análisis estadístico de fructosa en mezcla de azúcares**

No. de prueba	Resultado experimental (mg/l)	Resultado de referencia ( mg/l)
1	1994.8000	
2	2001.2000	
3	1998.4000	
4	2004.1500	
5	2002.3000	
6	2005.0000	
7	2001.9000	
8	2004.8500	
<b>Σ</b>	16012.6000	
<b><math>\bar{X}</math></b>	2001.5750	2000.0000
<b>S</b>	3.5018	
<b>CV</b>	0.1750	
<b>t<sub>calc</sub></b>	1.2721	
<b>t<sub>crit</sub> (95%)</b>	2.3646	se acepta
<b>t<sub>crit</sub> (99%)</b>	3.4995	se acepta

Fuente. Elaboración propia.

La tabla No. 12 muestra que la cuantificación de fructosa en la mezcla de azúcares a través del método experimental, no muestra diferencia significativa con respecto al resultado de referencia, puesto que  $t_{calc}$  es menor que  $t_{crit}(95\%)$  y  $t_{crit}(99\%)$ . El resultado se acepta ( $H_0$ .)

**Tabla No. 13. Análisis estadístico de sacarosa en una muestra de miel (melaza)**  
**Densidad de solución problema: 0.9996 g/ml a 20 °C**

<b>No. de prueba</b>	<b>Resultado experimental (%m/m).</b>	<b>Resultado de referencia (% m/m) *</b>
1	37.6151	
2	37.6761	
3	37.4625	
4	37.6142	
5	37.6337	
6	37.5214	
7	37.6035	
8	37.4784	
<b>Σ</b>	300.6049	
<b>X̄</b>	37.5756	37.5215
<b>S</b>	0.0779	
<b>CV</b>	0.2074	
<b>t<sub>calc</sub></b>	1.9642	
<b>t<sub>crit</sub> (95%)</b>	2.3646	Se acepta
<b>t<sub>crit</sub> (99%)</b>	3.4995	Se acepta

Fuente: Elaboración propia.

\* Resultado obtenido a través del Laboratorio Nacional de Salud. De Guatemala, C.A.

La tabla No. 13 muestra que la cuantificación de sacarosa en la melaza a través del método experimental, no muestra diferencia significativa con respecto al resultado de referencia, puesto que  $t_{calc}$  es menor que  $t_{crit}(95\%)$  y  $t_{crit}(99\%)$ . El resultado se acepta (Ho.)

**Tabla No. 14. Análisis estadístico de fructosa en una muestra de miel (melaza).  
Densidad de la solución problema: 0.9996 g/ml a 20 °C**

No. de prueba	Resultado experimental (% m/m)	Resultado de referencia (% m/m) *
1	6.9365	
2	7.1674	
3	7.1117	
4	6.9913	
5	7.0669	
6	7.0068	
7	7.0859	
8	7.0486	
<b>Σ</b>	56.4151	
<b>X̄</b>	7.0519	7.0439
<b>S</b>	0.0730	
<b>CV</b>	1.0355	
<b>t<sub>calc</sub></b>	0.3092	
<b>t<sub>crit</sub> (95%)</b>	2.3646	Se acepta
<b>t<sub>crit</sub> (99%)</b>	3.4995	Se acepta

Fuente: Elaboración propia.

\* Resultado obtenido a través del Laboratorio Nacional de Salud. De Guatemala, C.A.

La tabla No. 14 muestra que la cuantificación de fructosa en la melaza a través del método experimental, no muestra diferencia significativa con respecto al resultado de referencia, puesto que  $t_{\text{calc}}$  es menor que  $t_{\text{crit}}(95\%)$  y  $t_{\text{crit}}(99\%)$ . El resultado se acepta ( $H_0$ .)

**Tabla No. 15. Análisis estadístico de glucosa en una muestra de miel (melaza)**  
**Densidad de la solución problema: 0.9996 g/ml a 20 °C**

No. de prueba	Resultado experimental (% m/m)	Resultado de referencia (%m/m) *
1	3.3054	
2	3.2121	
3	3.3011	
4	3.3017	
5	3.1668	
6	3.2598	
7	3.2379	
8	3.2027	
<b><math>\Sigma</math></b>	25.9874	
<b><math>\bar{X}</math></b>	3.2484	3.2796
<b>S</b>	0.0523	
<b>CV</b>	1.6110	
<b>t<sub>calc</sub></b>	-1.6849	
<b>t<sub>crit</sub> (95%)</b>	2.3646	Se acepta
<b>t<sub>crit</sub> (99%)</b>	3.4995	Se acepta

Fuente: Elaboración propia.

\* Resultado obtenido a través del Laboratorio Nacional de Salud. De Guatemala, C.A.

La tabla No. 15 muestra que la cuantificación de glucosa en la melaza a través del método experimental, no muestra diferencia significativa con respecto al resultado de referencia, puesto que  $t_{calc}$  es menor que  $t_{crit}(95\%)$  y  $t_{crit}(99\%)$ . El resultado se acepta (Ho.)

## 9.6. Costos de análisis

Tabla No. 16. Costos de análisis.

Analito	Descripción	Unidad de medida	Cantidad utilizada	Costo en quetzales/Unidad	Costo total	Costo total por duplicado
Fructosa	Reactivo (DNSA)	ml	5.00	2.00	10.00	<b>20.00</b>
	Agua desmineralizada	ml	250.00	0.001	0.25	<b>0.50</b>
	Mano de obra		1.00	20.00	20.00	<b>40.00</b>
	Electricidad	KWH (kilowatts hora)	0.35	2.28	0.80	<b>1.59</b>
Glucosa	Reactivo (Glicemia)	ml	5.00	1.50	7.50	<b>15.00</b>
	Agua desmineralizada	ml	250.00	0.001	0.25	<b>0.50</b>
	Mano de obra		1.00	20.00	20.00	<b>40.00</b>
	Electricidad	KWH (kilowatts hora)	0.20	2.28	0.46	<b>0.91</b>
Sacarosa	Reactivo(Glicemia)	ml	5.00	1.50	7.50	<b>15.00</b>
	Reactivo (NaOH)	ml	8.00	0.50	4.00	<b>8.00</b>
	Reactivo (HCl)	ml	10.00	0.10	1.00	<b>2.00</b>
	Agua desmineralizada	ml	250.00	0.001	0.25	<b>0.50</b>
	Mano de obra		1.00	20.00	20.00	<b>40.00</b>
	Electricidad	KWH (kilowatts hora)	0.45	2.28	1.03	<b>2.05</b>
Costo total de análisis						<b>186.06</b>
* Costo de análisis más 30% de ganancia						<b>241.88</b>
** Costo de análisis en HPLC (análisis por duplicado)						<b>800</b>

Fuente. Elaboración propia.

\* Se establece un 30 % de ganancia, asumiendo que el laboratorio de DARSA prestará los servicios a entidades externas.

\*\* Costo establecido por el Laboratorio Nacional de Salud. De Guatemala, C.A.

## 9.7. Tiempo de análisis

**Tabla No. 17. Tiempos de análisis.**

<b>Azúcar</b>	<b>Tiempo con método experimental (horas)</b>	<b>Tiempo con método experimental (minutos)</b>	<b>Tiempo con HPLC (horas)</b>	<b>Tiempo con HPLC (minutos)</b>
Glucosa	0.5	30	4	240
Fructosa	0.5	30		
Sacarosa	0.5	30		
<b>Tiempo total</b>	<b>1.5</b>	<b>90</b>	<b>4</b>	<b>240</b>

Fuente. Elaboración propia.

Se puede observar en la tabla No. 16, el costo del análisis con el método experimental es menor que el costo a través de HPLC, por realizarse el análisis de referencia en un laboratorio externo, no se pudo desglosar los costos individuales del análisis a través de HPLC, tal como se realizó con el método experimental.

La tabla No 17 muestra que el tiempo de análisis con el método experimental es menor que el tiempo a través de HPLC. Con ello se puede observar que la espectrofotometría presenta ventajas considerables con respecto a la cromatografía líquida, en cuanto a análisis de azúcares se refiere.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1.** Se rechaza la hipótesis planteada ya que a través de la  $t$  de student se demuestra que el método espectrofotométrico para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles, si puede sustituir a un método por cromatografía líquida de alta resolución, debido a que no existe diferencia significativa entre los resultados de ambos métodos.
- 10.2.** Las curvas patrones de calibración de glucosa y fructosa, obedecen a una línea recta, por lo cual se desarrolla una ecuación de regresión lineal simple del modelo  $Y=aX+b$ , que es utilizada en la obtención de resultados al momento de analizar mieles.
- 10.3.** El costo y tiempo total de análisis de azúcares a través de espectrofotometría, son menores que los obtenidos a través del método por HPLC, esto se demuestra en las tablas No. 16 y No. 17 de los resultados, representado esto una gran ventaja para el método experimental.
- 10.4.** Todos los resultados experimentales son aceptados de forma estadística, puesto que los valores de  $t_{calc}$  no superan los valores de  $t_{crit}$  tanto para un nivel de confianza del 95% como para uno del 99%.
- 10.5.** La metodología propuesta es válida solo para análisis de mieles obtenidas a partir de la caña de azúcar, puesto que si se analiza otro tipo de miel, existe la posibilidad de obtener resultados erróneos.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.5.** Evaluar la posibilidad de adquirir un reactivo específico para la fructosa, con el objetivo de simplificar el procedimiento de análisis y evitar interferencias por la presencia de otros monosacáridos diferentes a los estudiados.
- 11.2.** Considerar la variación de los precios de los reactivos y materiales, para actualizar periódicamente el costo de cada análisis realizado con el método propuesto.
- 11.3.** El análisis de azúcares en mieles a través de espectrofotometría, las debe realizar una persona capacitada para que los resultados sean confiables.
- 11.4.** Considerar la calibración y mantenimiento de los equipos de medición utilizados para el análisis de azúcares en mieles, no sólo para la confiabilidad de los resultados, sino que también para mantener la rapidez en la obtención de resultados.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

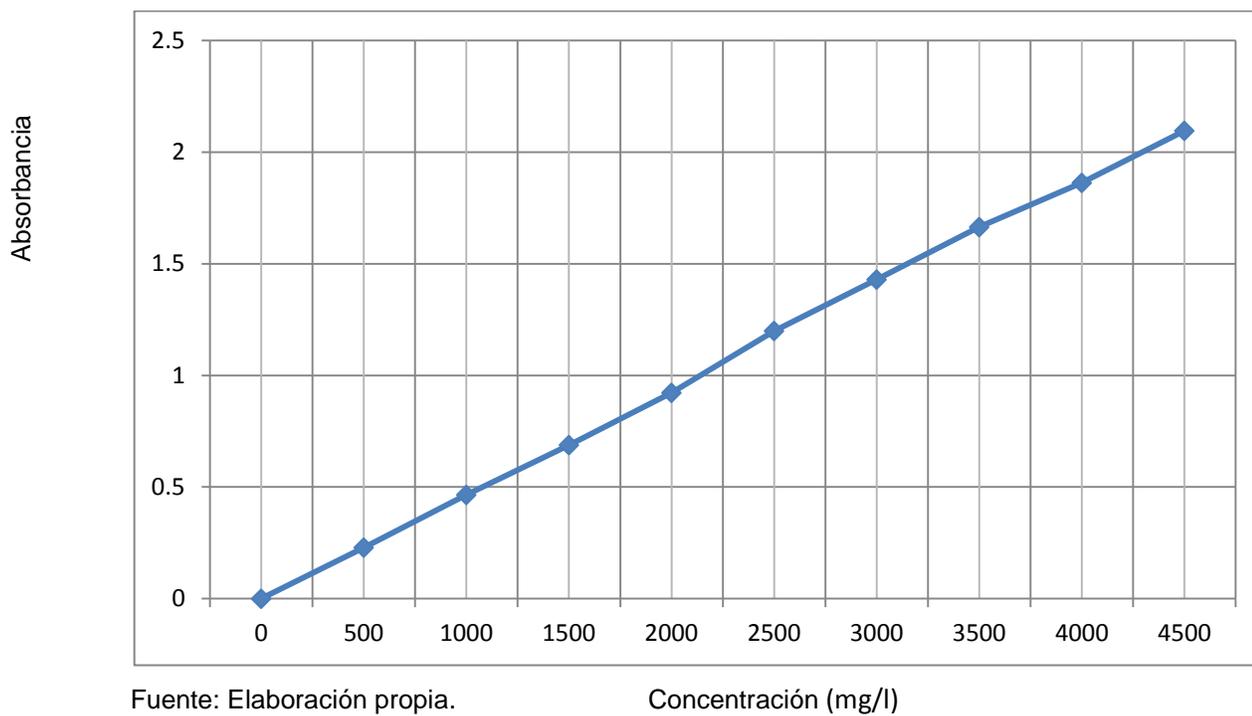
- 12.1** Análisis de regresión y correlación s.f. (En línea). Consultado el 10-08-2012. Disponible en: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/index-filer/academic/metodos1/Regresion.pdf>.
- 12.2** Azúcares o Glúcidos. (En línea). Consultado el 08-07-2012. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>.
- 12.3** Biotecnología y economía general, productos biotecnológicos. La fermentación alcohólica. Cómo se produce y aplicaciones. (En línea). Consultado el 12-09-2012. Disponible en: <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/>.
- 12.4** Conocimiento de técnicas analíticas parte I. Fundamentos de espectrofotometría. (En línea). Consultado el 02-08-2012. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>.
- 12.5** Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible 2. (En línea). Consultado el 07-09-2012. Disponible en: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).
- 12.6** Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. (En línea). Consultado el 10-09-2012. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias/26.pdf>.
- 12.7** Fennema, O.R. 2000. Química de los alimentos. 2 ed. Zaragoza España. Edit. Acribia S.A. 189-221 p.

- 12.8** Iniciación a la bromatología práctica. Protocolos de análisis. Azúcares reductores. (En línea). Consultado el 06-07-2012. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/57234457/Azucar-reductor>.
- 12.9** Meislich, H. 1977. Química orgánica. 2 ed. Colombia. Edit. Mc Graww-Hill latinoamericana S.A. 144-172 p.
- 12.10** Merck chemicals/cotizaciones. (En línea). Consultado el 10-05-13. Disponible en: <http://www.merckmillipore.com>.
- 12.11** Metodología de la investigación. Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. T de Student. (En línea). Consultado el 20-08-2012. Disponible en: [http://www.fisterra.com/mbe/investiga/t\\_student/t\\_student.asp](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/t_student/t_student.asp).

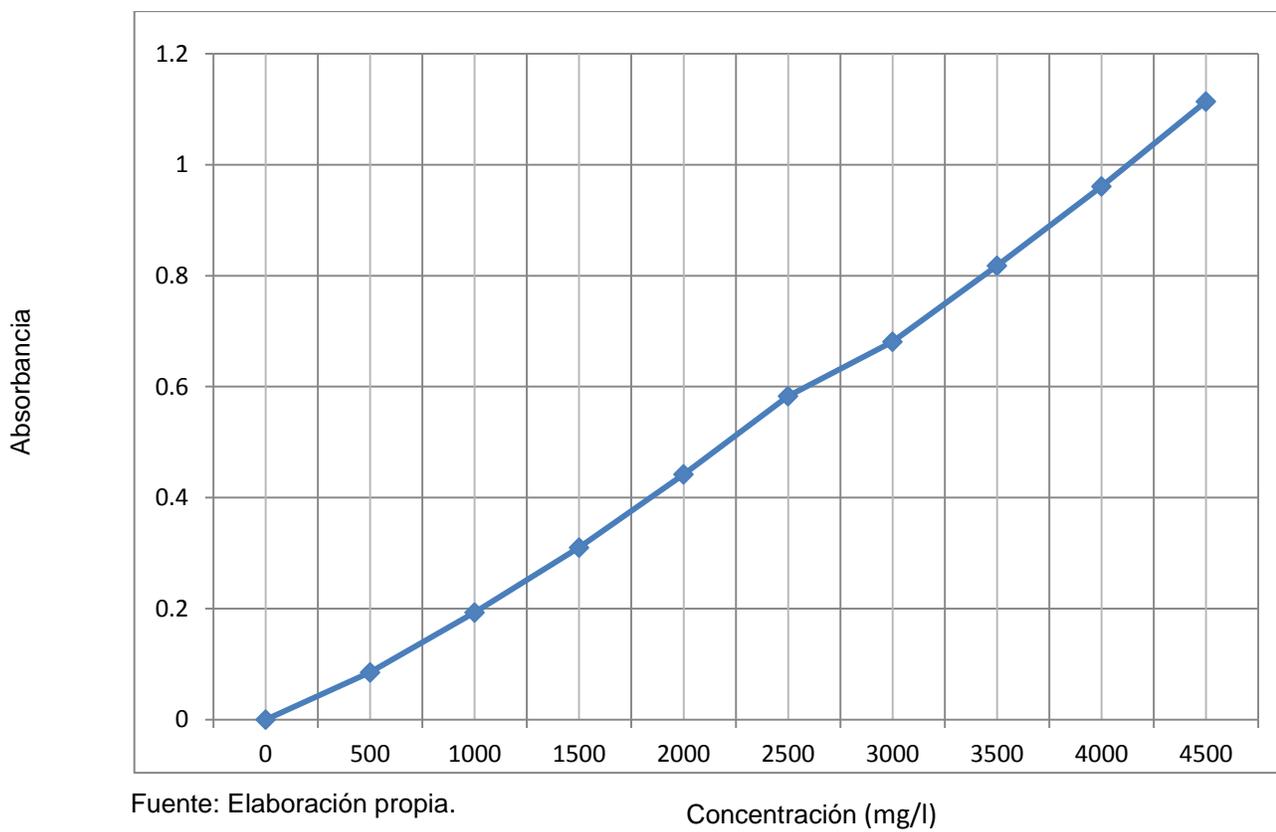
Vo.Bo. Licda. Ana Teresa Cap Yes  
Bibliotecaria CUNSUROC.

## 13. APÉNDICE

### 13.1. Gráfica de curva de calibración de glucosa.



### 13.2. Gráfica de curva de calibración de fructosa.



### 13.3. Cálculos

#### 13.3.1. Relación estequiométrica entre glucosa y sacarosa.

1 mg de

$$\frac{\text{glucosa} \quad \times 1 \text{ mmol glucosa} \quad \times 1 \text{ mmol de sacarosa} \quad \times 342.239 \text{ mg de sacarosa}}{180.12 \text{ mg} \quad 1 \text{ mmol de glucosa} \quad 1 \text{ mmol de glucosa}} = 1.9$$

1 mg de glucosa representan a 1.9 mg de sacarosa en la reacción de hidrólisis.

#### 13.3.2. Determinación de glucosa.

Lectura directa del espectrofotómetro. Ej.

Lectura de espectrofotómetro de muestra de melaza: 32,471.25 mg/l

Resultado:  $(32,471.25 \text{ mg/l.} \cdot 100) / (999.6 \cdot 1000) = 3.2484 \% \text{ m/m.}$

#### 13.3.3. Determinación de Fructosa.

Lectura directa del espectrofotómetro – lectura de glucosa. Ej.

Lectura del espectrofotómetro de muestra de melaza: 102,961.88 mg/l.

Resultado:  $102,961.88 - 32,471.25 = (70,490.63 \text{ mg/l.} \cdot 100) / (999.6 \cdot 1000) = 7.0519 \% \text{ m/m.}$

#### 13.3.4. Determinación de sacarosa.

$(\text{Lectura directa del espectrofotómetro} - \text{lectura de glucosa}) \times 1.9$ . Ej.

Lectura del espectrofotómetro de muestra de melaza: 230,158.45 mg/l

Resultado:  $(230,158.45 - 32,471.25) \times 1.9 = (375,605.68 \text{ mg/l} \cdot 100) / (999.6 \cdot 1000) = 37.5756 \% \text{ m/m.}$

## 14. ANEXO

### 14.1. Glosario

**Ácido:** cualquier compuesto químico que, cuando se disuelve en agua, produce un pH menor que 7. También un ácido es un compuesto que dona un catión hidrógeno ( $H^+$ ) a otro compuesto (denominado base).

**Ácido aconítico:** es un ácido carboxílico cuyo ácido conjugado, el aconitato o cis-aconitato, es un intermediario de isomerización del citrato a isocitrato durante el ciclo del ácido cítrico.

**Ácido pantoténico:** El ácido pantoténico es un nutriente hidrosoluble conocido por lo general como vitamina B5. Es vital para la síntesis y el mantenimiento de la coenzima A (CoA), componente esencial de numerosos procesos enzimáticos. Trabaja en conjunto con la biotina en varios procesos metabólicos del organismo.

**Alcalino:** cualquier compuesto químico que, cuando se disuelve en agua, produce un pH mayor que 7.

**Aminas:** Las aminas son compuestos químicos orgánicos que se consideran como derivados del amoníaco y resultan de la sustitución de los hidrógenos de la molécula por los radicales alquilo. Según se sustituyan uno, dos o tres hidrógenos, las aminas serán primarios, secundarios o terciarios, respectivamente.

**Aterosclerosis:** la aterosclerosis es la acumulación de depósitos adiposos llamados *placa* en el interior de las paredes de las *arterias*. Las arterias son vasos sanguíneos que transportan oxígeno y sangre al corazón, cerebro y otras partes del cuerpo. A medida que se acumula la placa en la arteria, ésta se estrecha gradualmente y después se obstruye. Conforme más y más se estrecha una arteria, menos sangre puede pasar.

**ATP (Adenosín trifosfato):** Es la molécula la que intercambia la energía metabólica en todos los organismos vivos.

**Biocombustible:** un biocarburante o biocombustible es una mezcla de hidrocarburos que se utiliza como combustible en los motores de combustión interna y que deriva de la biomasa, materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

**Carbonilo:** en química orgánica, un grupo carbonilo es un grupo funcional que consiste en un átomo de carbono con un doble enlace a un átomo de oxígeno.

**Cepa:** en microbiología, una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

**Cromógeno:** sustancia que absorbe la luz produciendo color.

**Cuarzo:** es un mineral compuesto de dióxido de silicio y es incoloro en estado puro, de gran dureza, es capaz de rayar el acero.

**Enantiómero:** en química, los enantiómeros, también llamados isómeros ópticos, son una clase de estereoisómeros tales que en la pareja de compuestos uno es imagen especular del otro y no son superponibles, es decir, cada uno es una imagen especular no superponible con la otra, lo mismo que una mano respecto a la otra.

**Enzima:** es una molécula de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles, las *enzimas* son proteínas complejas que producen un cambio químico específico en todas las partes del cuerpo.

**Espectro electromagnético:** se denomina espectro electromagnético a la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas

**Éster:** los ésteres son compuestos orgánicos derivados de ácidos orgánicos o inorgánicos oxigenados en los cuales uno o más protones son sustituidos por grupos orgánicos alquilo (simbolizados por R').

**Fotocélula:** una célula fotoeléctrica o *fotocélula* es un componente eléctrico que genera un haz de luz infrarroja y detecta si este se mantiene o ha sido cortado.

**Furano:** el furano es un compuesto orgánico heterocíclico aromático de cinco miembros con un átomo de oxígeno. Es un líquido claro, incoloro, altamente inflamable y muy volátil, con un punto de ebullición cercano al de la temperatura ambiente.

Genérico: que es común o se refiere a un conjunto de elementos del mismo género.

**Glicación:** la glicación es un término que describe la modificación postraducciona permanente de los grupos amino de las proteínas por la acción de azúcares reductores. También se denomina reacción de Maillard o incorrectamente "glucosilación no enzimática de proteínas".

**Haz:** conjunto de rayos luminosos de un mismo origen.

**Hidrólisis:** es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química. Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente.

**Melanoidina:** la melanoidina o moléculas melanoideas se generan al someter determinados alimentos a altas temperaturas. Esto se produce cuando una molécula de hidrato de carbono y un aminoácido reaccionan.

**Oxidante:** un agente oxidante o comburente es un compuesto químico que oxida a otra sustancia en reacciones electroquímicas o de reducción-oxidación. En estas reacciones, el compuesto oxidante se reduce.

**Pirano:** en química el pirano es un compuesto heterocíclico formado por cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno y que presenta dos dobles enlaces.

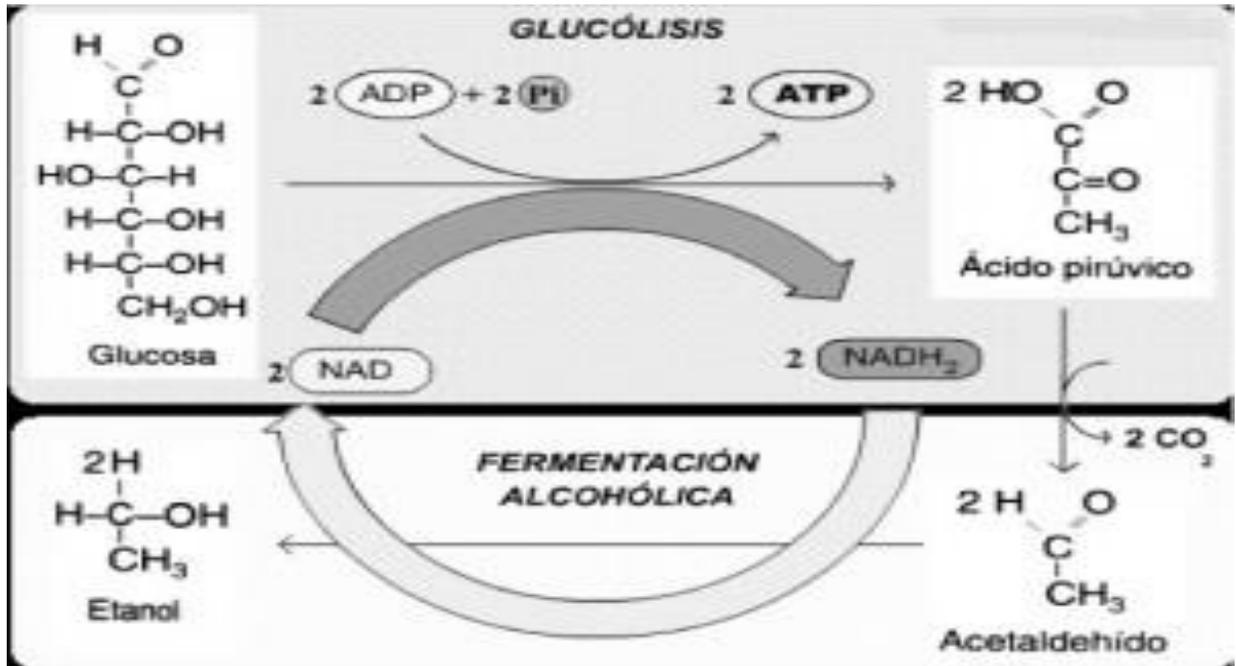
**Polímero:** los polímeros son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros.

**Reductor:** un agente reductor es aquel que cede electrones a un agente oxidante.

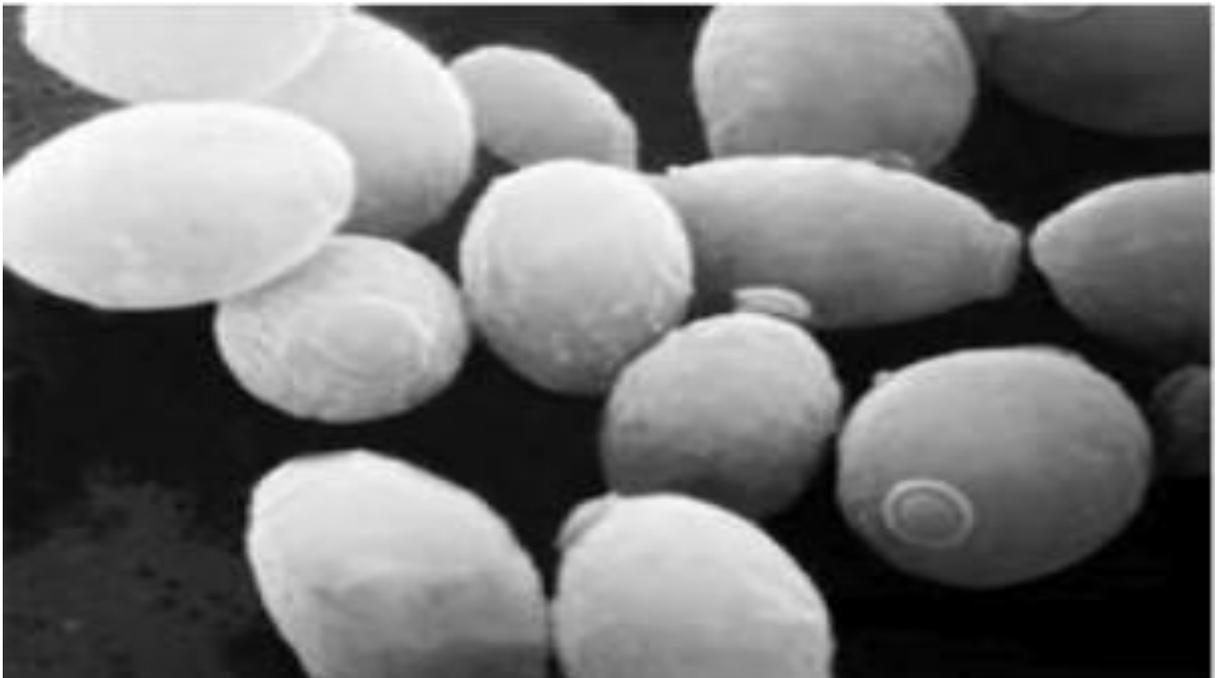
**Traza:** técnica de análisis para determinar la cantidad porcentual (inferior al 0,01 % en peso) de un componente o sustancia de un elemento en una muestra.

## 14.2. Figuras

Fig. No. 1: Fermentación alcohólica.

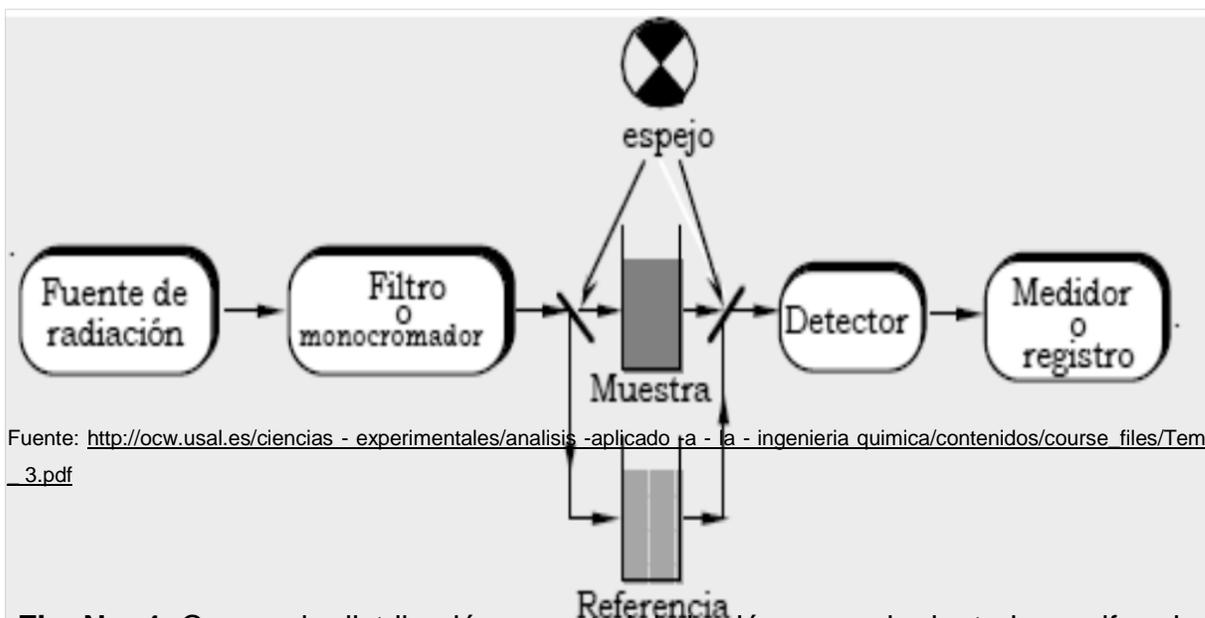


Fuente: <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/>

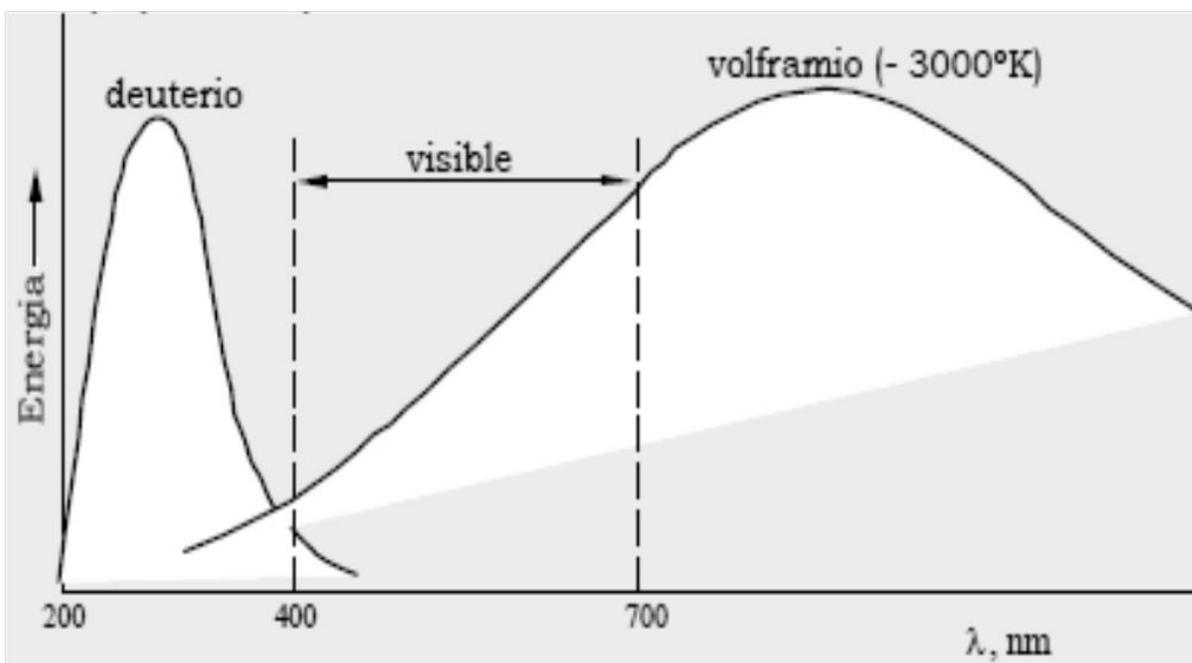
Fig. No. 2: *Saccharomyces cerevisiae*.

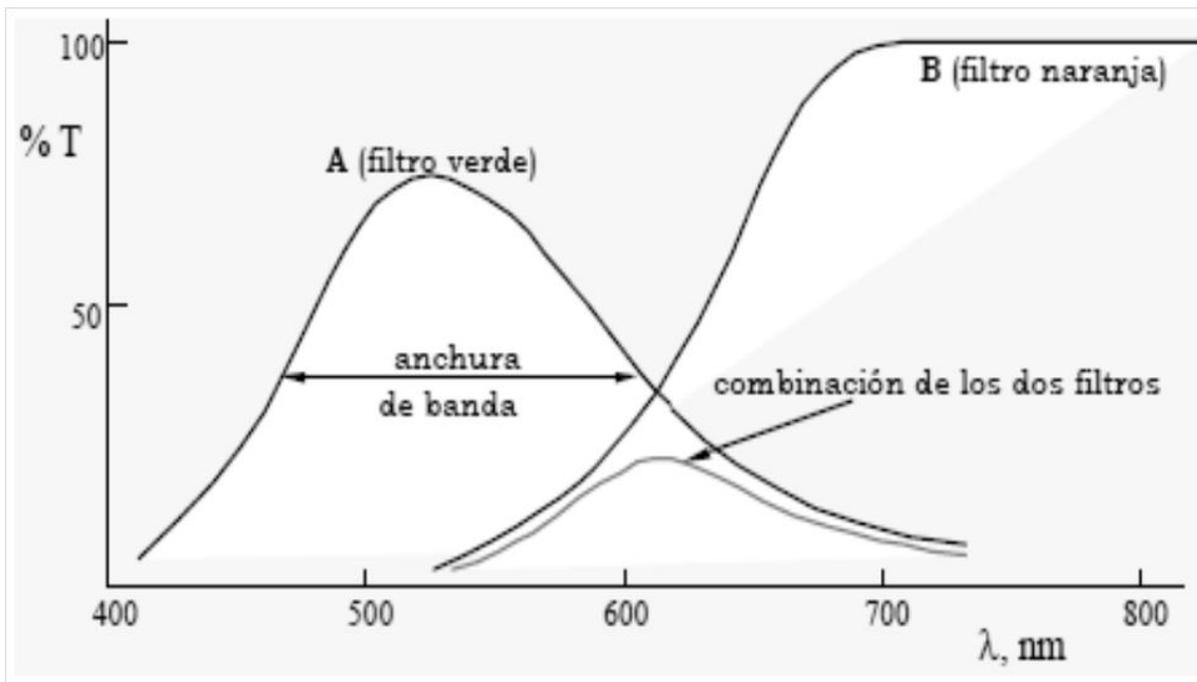
Fuente: <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/>

**Fig. No. 3:** Espectrofotómetro de doble haz.

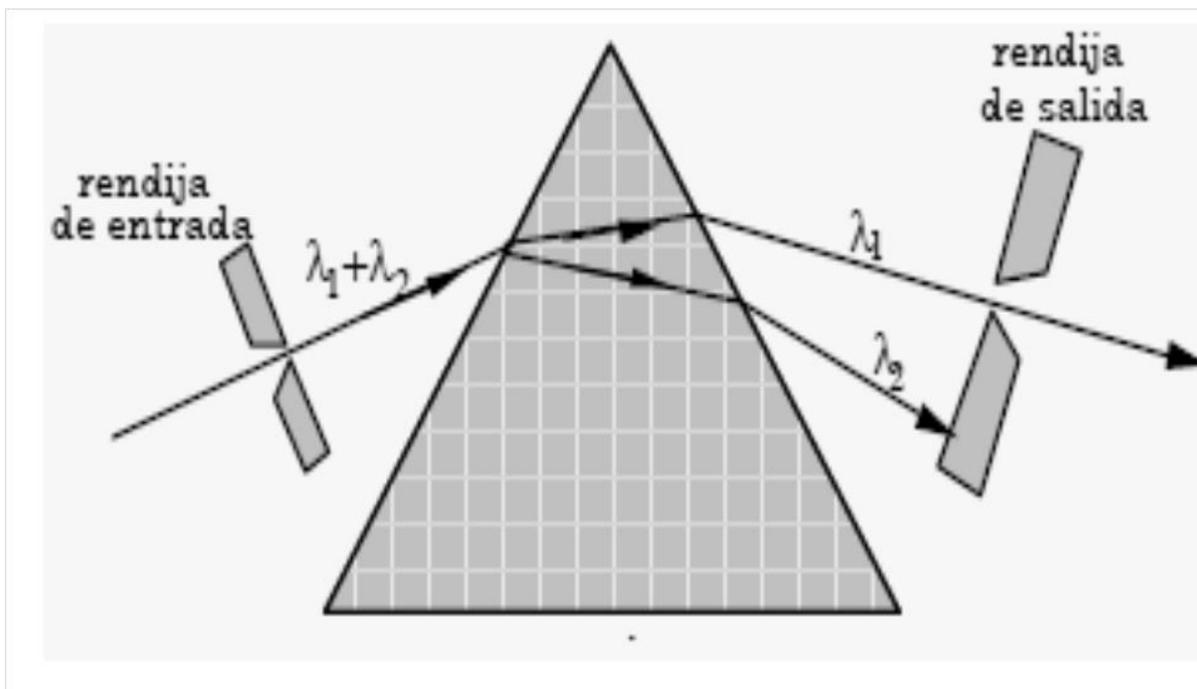


**Fig. No. 4:** Curvas de distribución espectral de las lámparas de deuterio y wolframio.

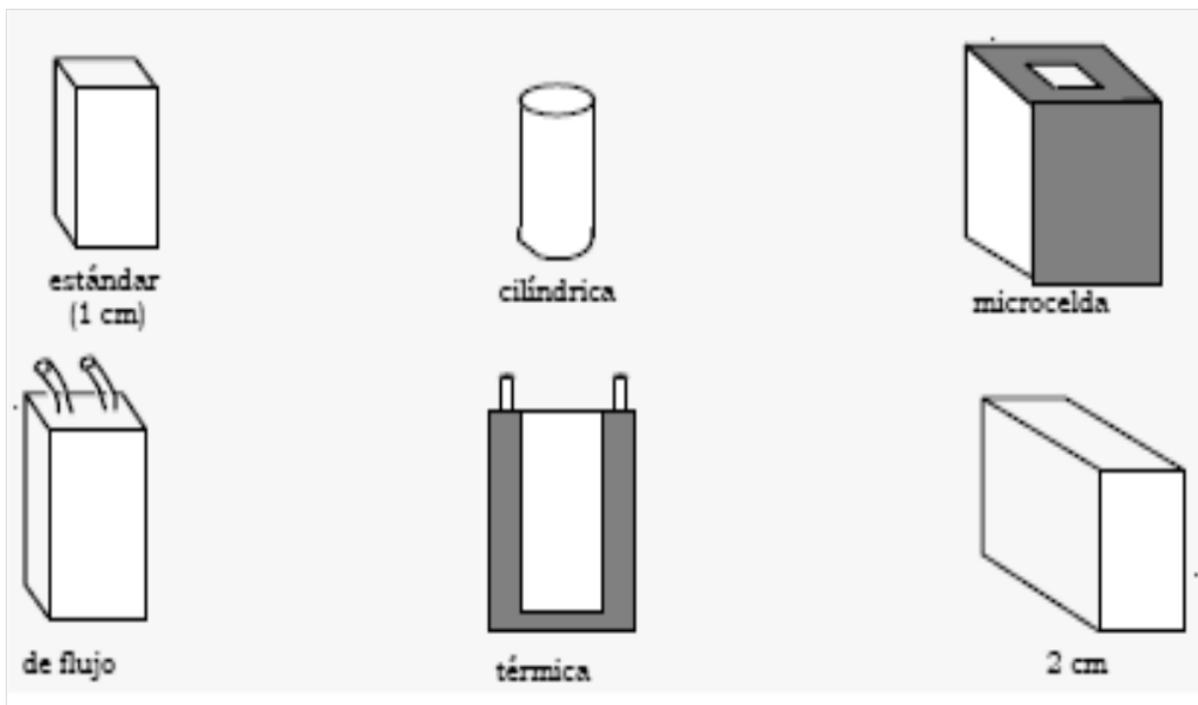


**Fig. No. 5:** Transmitancia de algunos filtros.

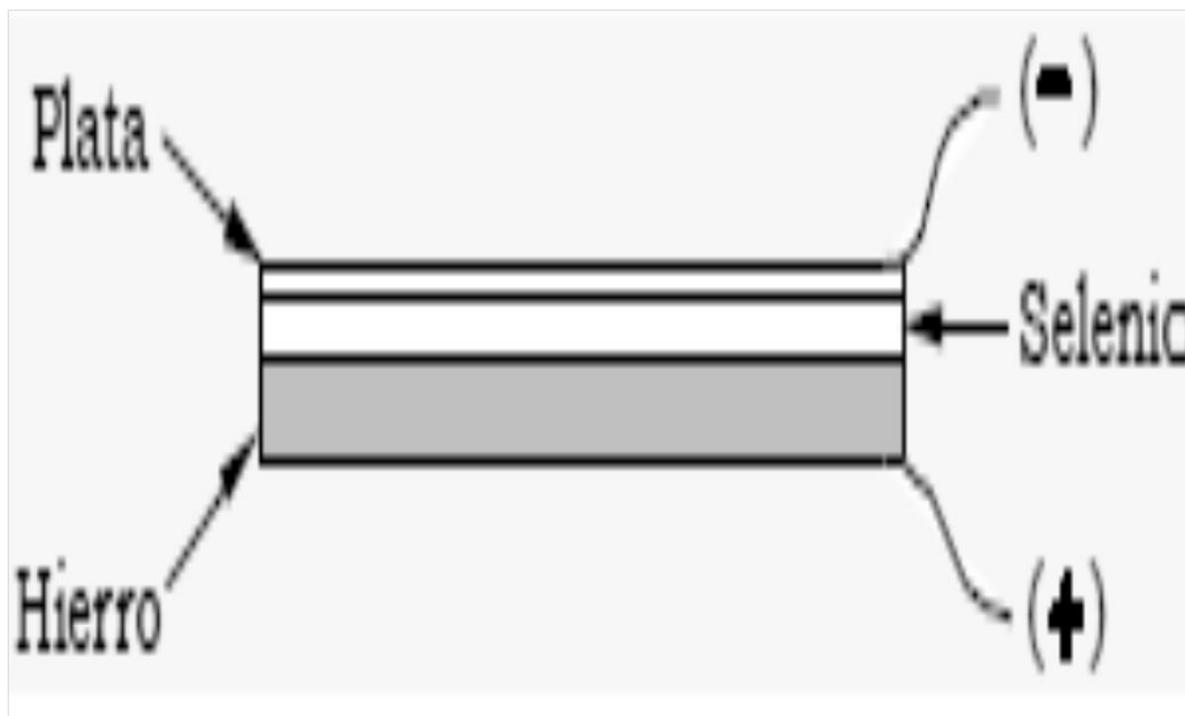
Fuente: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf).

**Fig. No 6:** Dispersión de radiación por un prisma.

Fuente: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf)

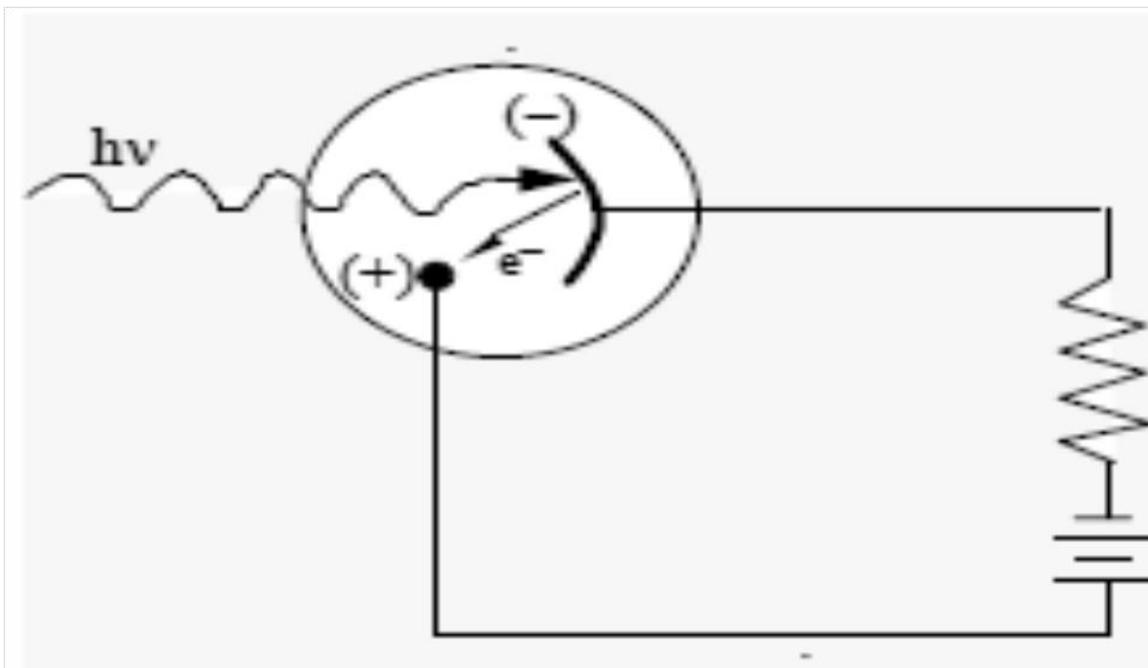
**Fig. No. 7:** Celdas para espectrofotometría.

Fuente: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf)

**Fig. No. 8:** Célula fotovoltaica.

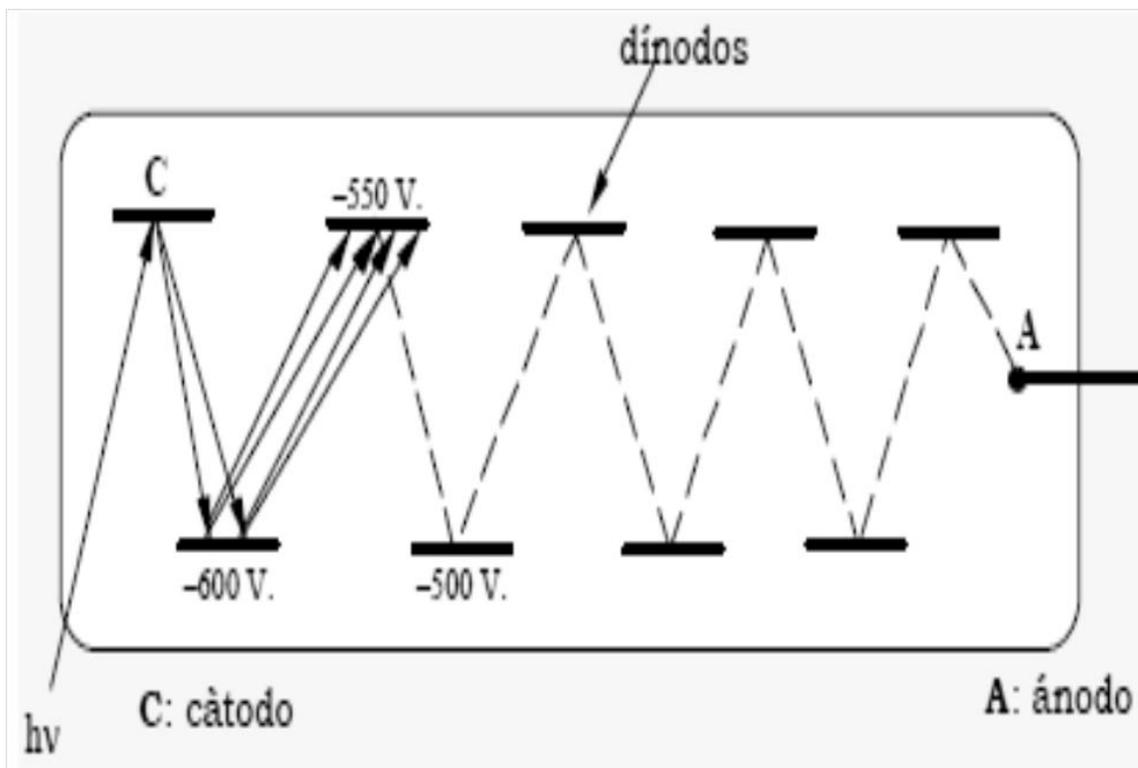
Fuente: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf)

Fig. No. 9: Fototubo.



Fuente: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_3.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_3.pdf)

Fig. No. 10: Tubo fotomultiplicador.



Fuente: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplico-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/tema\\_3.pd.f](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplico-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/tema_3.pd.f)

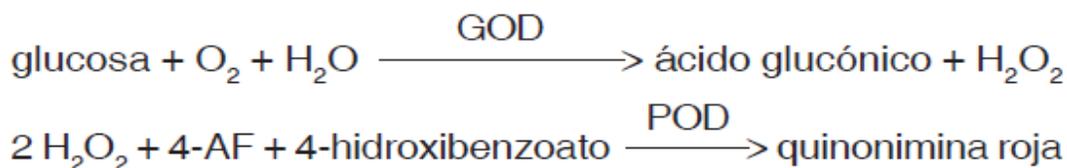
### 14.3. Reacciones

#### 14.3.1. Reacción general de la hidrólisis de la sacarosa



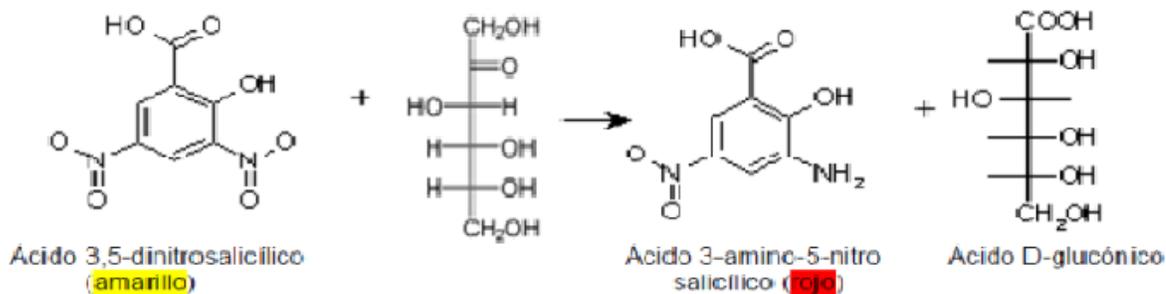
#### 14.3.2. Esquemas de reacción

- Para la glucosa a través de la glucosa oxidasa.



La quinonimina roja es proporcional al contenido de glucosa y es la que se determina espectrofotométricamente.

- Para la fructosa a través del DNSA.



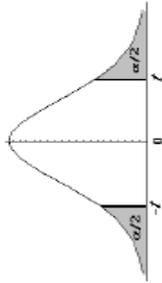
El complejo Ácido 3-amino-5-nitrosalicílico es el que se determina espectrofotométricamente y es proporcional al contenido de fructosa en la muestra.

#### 14.4. Resultados de referencia

14.5. Tabla de distribuciones “t de Student”

Tabla de la t de Student.

Contiene los valores  $t$  tales que  $P(|T| > t) = \alpha$ ,  
donde  $n$  son los grados de libertad.



$n \setminus \alpha$	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,1584	0,3249	0,5095	1,0000	1,9626	3,0777	6,3137	12,7062	31,8210	63,6559	636,5776
2	0,1421	0,2887	0,4447	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9645	9,9250	31,5998
3	0,1366	0,2767	0,4242	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	12,9244
4	0,1338	0,2707	0,4142	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,6041	8,6101
5	0,1322	0,2672	0,4082	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8685
6	0,1311	0,2648	0,4043	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9587
7	0,1303	0,2632	0,4015	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	5,4081
8	0,1297	0,2619	0,3995	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0414
9	0,1293	0,2610	0,3979	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,2602	0,3966	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5868
11	0,1286	0,2596	0,3956	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4369
12	0,1283	0,2590	0,3947	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,2586	0,3940	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2209
14	0,1280	0,2582	0,3933	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1403
15	0,1278	0,2579	0,3928	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,2576	0,3923	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0149
17	0,1276	0,2573	0,3919	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,2571	0,3915	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9217
19	0,1274	0,2569	0,3912	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8833
20	0,1273	0,2567	0,3909	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8496
21	0,1272	0,2566	0,3906	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,2564	0,3904	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7922
23	0,1271	0,2563	0,3902	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,2562	0,3900	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7970	3,7454
25	0,1269	0,2561	0,3898	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251
26	0,1269	0,2560	0,3896	0,6840	1,0575	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,7067
27	0,1268	0,2559	0,3894	0,6837	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,6895
28	0,1268	0,2558	0,3893	0,6834	1,0560	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,6739
29	0,1268	0,2557	0,3892	0,6830	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,6595
30	0,1267	0,2556	0,3890	0,6828	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,6460
40	0,1265	0,2550	0,3881	0,6807	1,0500	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,5510
80	0,1261	0,2542	0,3867	0,6776	1,0432	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	3,4164
120	0,1259	0,2539	0,3862	0,6765	1,0409	1,2886	1,6576	1,9799	2,3578	2,6174	3,3734
$\infty$	0,126	0,253	0,385	0,674	1,036	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	3,291

---

Mazatenango 29 de Abril de 2014.

Señores:

Comisión de Trabajo de Graduación.

Ingeniería en Alimentos.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Centro Universitario del Sur Occidente.

Respetable comisión:

Es un gusto saludarles, esperando se encuentren gozando de bienestar en sus labores cotidianas.

El motivo de la presente es para informar que recibimos el trabajo de graduación titulado **“Evaluación de un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución”**, presentado por el estudiante Eduardo Francisco Tun Velásquez, carné 200640879.

El informe está revisado y contiene las correcciones que fueron indicadas, por lo que consideramos está listo para darle el trámite correspondiente.

Atentamente,

Asesores:



Inga. Aurora Carolina Estrada Elena

Asesor principal



Ing. Fernando Antonio Ramírez Chaclán.

Asesor Adjunto.

Mazatenango 29 de Abril de 2014.

Señores:

Comisión de Trabajo de Graduación.

Ingeniería en Alimentos.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Centro Universitario del Sur Occidente.

Respetable comisión:

Es un gusto saludarles, esperando se encuentren gozando de bienestar en sus labores cotidianas.

El motivo de la presente es para informar que recibimos el trabajo de graduación titulado **“Evaluación de un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución”**, presentado por el estudiante Eduardo Francisco Tun Velásquez, carné 200640879.

El informe está revisado y contiene las correcciones que fueron indicadas, por lo que consideramos está listo para darle el trámite correspondiente.

Atentamente,

Evaluadores:



Ing. Ángel Solórzano



Dr. Marco Antonio Del Cid.



Licda. Q.B. Gladys Calderón

Mazatenango 29 de Abril de 2014.

Atención:

Lic. José Alberto Chuga  
Director del Centro Universitario del Sur Occidente  
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Respetable Lic. Chuga.

Es un gusto saludarle, esperando se encuentre gozando de bienestar en sus labores cotidianas.

El motivo de la presente es para informar que se recibió el trabajo de graduación titulado **“Evaluación de un método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en mieles utilizadas para la producción de alcohol etílico, como alternativa de sustitución de un método por cromatografía líquida de alta resolución”**, presentado por el estudiante Eduardo Francisco Tun Velásquez, carné 200640879.

El informe está revisado y contiene las correcciones que fueron indicadas, por lo que se considera está listo para darle el trámite correspondiente.

Atentamente,



Licda. Q.B. Gladys Calderón Castañeda

Coordinadora de la Carrera de Ingeniería en Alimentos





**USAC**  
TRICENTENARIA  
Universidad de San Carlos de Guatemala

**CUNSUROC/USAC-I-22-2014**

DIRECCIÓN DEL CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUROCCIDENTE,  
Mazatenango, Suchitepéquez, trece de mayo de dos mil catorce.-----

Encontrándose agregados al expediente los dictámenes de la Comisión de Tesis y del Secretario del comité de Tesis, SE AUTORIZA LA IMPRESIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO: "EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DISEÑADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA EN MIELES UTILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO, COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.", del estudiante: **Eduardo Tun Velásquez**, carné **200640879** de la carrera Ingeniería en Alimentos.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



LIC. JOSÉ ALBERTO CHUGA ESCOBAR  
DIRECTOR