



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Química

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO  
DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE  
MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA  
PUREZA A NIVEL LABORATORIO**

**Marjeory Alejandra Micheo Navas**

Asesorado por la MA. Lisbeth Mariela Samayoa Bernal

Guatemala, noviembre de 2021

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO  
DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE  
MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA  
PUREZA A NIVEL LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
POR

**MARJEORY ALEJANDRA MICHEO NAVAS**  
ASESORADO POR LA MA. LISBETH MARIELA SAMAYOA BERNAL.

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**INGENIERA QUÍMICA**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2021

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA**

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Córdova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Kevin Vladimir Armando Cruz Lorente
VOCAL V	Br. Fernando José Paz González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Córdova
EXAMINADOR	Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
EXAMINADOR	Ing. Gerardo Ordoñez
EXAMINADOR	Ing. Jorge Rodolfo García Carrera
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

## **HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA PUREZA A NIVEL LABORATORIO**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha julio de 2020.

**Marjeory Alejandra Micheo Navas**

Guatemala 19 de abril de 2021

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
DIRECTOR  
Escuela Ingeniería Química  
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Le saludo cordialmente, deseándole éxitos en sus actividades. Por medio de la presente hago constar que he revisado y aprobado el Informe Final del trabajo de graduación titulado: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA PUREZA A NIVEL LABORATORIO”**, elaborado por la estudiante de la carrera de Ingeniería Química, **Marjeory Alejandra Micheo Navas**, quien se identifica con el registro académico **2015-13645** y con el CUI **2990 50378 01 01**.

Agradeciendo la atención a la presente, me suscribo de usted,

Atentamente,



Lisbeth Mariela Samayoa Bernal  
ASESOR  
Ingeniera Química  
Colegiado activo no. 2254

Lisbeth Mariela Samayoa Bernal  
Ingeniera Química  
Colegiado No. 2254



Guatemala, 27 de septiembre de 2021.  
Ref. EIQ.TG-IF.027.2021.

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo **045-2020**, le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

**INFORME FINAL**

Solicitado por el estudiante universitario: **Marjeory Alejandra Micheo Navas**.  
Identificado con número de carné: **2990503780101**.  
Identificado con registro académico: **201513645**.  
Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química**.  
En la modalidad: **Informe Final, Seminario de Investigación**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA PUREZA A NIVEL LABORATORIO**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

**Lisbeth Mariela Samayoa Bernal, profesional de la Ingeniería Química**

Habiendo encontrado el referido trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

“ID Y ENSEÑAR A TODOS”

*Julio David Vargas García*  
**Julio David Vargas García**  
**Ingeniero Químico**  
Julio David Vargas García  
profesional de la Ingeniería Química  
COORDINADOR DE TERNAS  
Tribunal de Revisión  
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



Guatemala, 28 de octubre de 2021  
Ref. EIQ.224.2021

**Aprobación del informe final del trabajo de graduación**

Ingeniera  
Aurelia Anabela Cordova Estrada  
Decana  
Facultad de Ingeniería  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Revisado el INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN (TESIS), DENOMINADO **DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA PUREZA A NIVEL LABORATORIO** del(la) estudiante Marjeory Alejandra Micheo Navas, se conceptúa que el documento presentado, reúne todas las condiciones de calidad en materia administrativa y académica (rigor, pertinencia, secuencia y coherencia metodológica), por lo tanto, se procede a la autorización del mismo, para que el(la) estudiante pueda optar al título de Ingeniería Química.

*“Id y Enseñad a Todos”*

  
  
224

Ing. William G. Arriaza Tejada; M.I.Q., M.U.I.E.  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química

Cc. Archivo  
WGAM/wgam



Agencia Centroamericana de Acreditación de  
Programas de Arquitectura y de Ingeniería



Formando Ingenieros Químicos en Guatemala desde 1939



**NO SALGAS  
QUÉDATE EN  
CASA**



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

Decanato  
Facultad de Ingeniería  
24189101 - 24189102  
secretariadecanato@ingenieria.usac.edu.gt

DTG. 589-2021

La Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS EXPERIMENTALES DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LA ENZIMA INVERTASA EN LA PRODUCCIÓN DE MIELES INVERTIDAS DE CAÑA DE AZÚCAR A FIN DE OBTENER UNA MIEL DE ALTA PUREZA A NIVEL LABORATORIO**, presentado por la estudiante universitaria: **Marjeory Alejandra Micheo Navas**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:

Inga. Anabela Cordova Estrada  
Decana



Guatemala, noviembre de 2021

AACE/cc



## **ACTO QUE DEDICO A:**

- Dios** Por el don de la vida, del entendimiento, porque sin él nada soy.
- Mis padres** Olga Navas y Edgar Micheo, por su apoyo y amor incondicional a lo largo de mi vida, por ser mi mejor y más grande ejemplo de superación y perseverancia, esta meta es por y para ustedes.
- Mis hermanos** Edgar y Mariano Micheo, por todo el amor brindado, por estar siempre para mí y apoyarme en cada momento.
- Julio Cordón Cardona** Por ser un pilar fundamental en todos los aspectos de mi vida, por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera, por ser mi roca en momentos de flaqueza y especialmente por todo el amor brindado a mi persona.
- Las incondicionales** Swamy Donis y Cindy Hernández, por brindarme su amistad verdadera desde hace más de 10 años, por todo el cariño y apoyo brindado.

**Mis amigos de la carrera**

Meiby Franco, Mónica Méndez, Heather Salamanca, Fernanda Escobedo, Irene Urrutia, Josseline Obregón, Marleny Álvarez, Abigail Aguirre, Henry Marroquín, Carlos Martínez, Fernando Godínez, por todas las experiencias vividas y los buenos momentos que dejan huella en mi corazón, por cada prueba superada, y por todo el apoyo brindado.

**Mis catedráticos**

Por todos los conocimientos brindados y ser parte fundamental del cumplimiento de esta meta.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

<b>Dios</b>	Por ser guía y luz en mi vida.
<b>Mi familia</b>	Por las oportunidades brindadas, por su apoyo y amor incondicional.
<b>Universidad de San Carlos de Guatemala</b>	Por ser mi casa de estudios y por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.
<b>Facultad de Ingeniería</b>	Por todos los conocimientos y competencias brindadas.
<b>Mi asesora</b>	Mariela Samayoa, por compartirme sus conocimientos, por todo el apoyo, paciencia y amistad brindada.
<b>Ingenio La Unión</b>	Por brindarme la oportunidad de realizar mi investigación de tesis en sus instalaciones, y por todo el apoyo y hospitalidad recibida.
<b>Familiares en general</b>	Por todo el apoyo y cariño brindado, y por compartirme material que fue de mucha ayuda a lo largo de la carrera.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	V
LISTA DE SÍMBOLOS .....	VII
GLOSARIO .....	IX
RESUMEN .....	XV
OBJETIVOS.....	XVII
Hipótesis .....	XVIII
INTRODUCCIÓN .....	XXI
1. ANTECEDENTES .....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Caña de azúcar .....	3
2.1.1. Composición de la caña de azúcar .....	3
2.2. Proceso de elaboración de azúcar .....	4
2.2.1. Preparación y molienda de la caña de azúcar .....	5
2.2.2. Clarificación .....	5
2.2.2.1. Sulfitación .....	5
2.2.2.2. Alcalinización .....	6
2.2.3. Evaporación.....	6
2.2.4. Agotamiento de las mieles y desarrollo del cristal ....	7
2.3. Azúcares invertidos .....	8
2.3.1. Glucosa .....	9
2.3.2. Fructosa.....	10
2.4. Sacarosa .....	11
2.4.1. Inversión de la sacarosa .....	12

	2.4.1.1.	Hidrólisis ácida .....	12
	2.4.1.2.	Hidrólisis enzimática.....	13
2.5.		Prueba de Fehling .....	15
	2.5.1.	Métodos ICUMSA.....	15
3.		MARCO METODOLÓGICO .....	17
	3.1.	Variables .....	17
	3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	18
	3.3.	Recursos humanos disponibles .....	18
	3.4.	Recursos materiales disponibles (equipo, cristalería, reactivos).....	19
	3.4.1.	Materia prima .....	19
	3.4.2.	Reactivos.....	19
	3.4.3.	Instrumentos de medición .....	20
	3.4.4.	Equipo auxiliar .....	20
	3.4.5.	Cristalería .....	20
	3.4.6.	Equipo de protección personal .....	21
	3.5.	Técnica cualitativa o cuantitativa .....	21
	3.5.1.	Medición de grados brix .....	22
		3.5.1.1. Procedimiento .....	22
	3.5.2.	Medición de Pol.....	22
		3.5.2.1. Procedimiento .....	22
	3.5.3.	Medición de azúcares reductores.....	23
		3.5.3.1. Método ICUMSA GS4/3-3 (2007).....	23
		3.5.3.1.1. Primera titulación .....	24
		3.5.3.1.2. Segunda titulación.....	25
		3.5.3.1.3. Tercera titulación.....	26
		3.5.3.2. Método ICUMSA GS4/3-7 (2011).....	28
	3.6.	Recolección y ordenamiento de datos .....	30

3.6.1.	Análisis de grados Brix .....	30
3.6.2.	Concentración de la enzima invertasa .....	31
3.6.3.	Análisis de temperatura de la mezcla inicial .....	31
3.6.4.	Análisis de pH.....	31
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	32
3.7.1.	Procesamiento de la información.....	34
3.8.	Análisis estadístico .....	36
3.8.1.	Análisis de un diseño factorial .....	37
3.8.2.	Programas para utilizar en el análisis de datos .....	37
4.	RESULTADOS .....	39
4.1.	Determinar que arreglo factorial obtiene mayor rendimiento hidrolítico de azúcares reductores totales .....	39
4.2.	Elaborar una correlación que se ajuste a la tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la solución .....	40
4.3.	Evaluar mediante un diseño factorial la influencia de cada factor de operación en función de los azúcares reductores totales obtenidos .....	41
4.4.	Elaborar una documentación que contenga el procedimiento del proceso de hidrólisis enzimática a nivel laboratorio .....	43
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	47

CONCLUSIONES.....53  
RECOMENDACIONES .....55  
BIBLIOGRAFÍA.....57  
APÉNDICES.....61  
ANEXOS.....73

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

1.	Evaporador tipo Roberts .....	7
2.	Diagrama de bloques para la obtención de azúcar .....	8
3.	Reacción de hidrólisis enzimática de la sacarosa. ....	9
4.	Estructura química de la glucosa .....	9
5.	Estructura química de la fructosa .....	10
6.	Estructura química de la sacarosa .....	11
7.	Influencia de la temperatura en la velocidad de inversión enzimática de la sacarosa .....	14
8.	Diagrama de flujo del proceso de hidrólisis enzimática a escala laboratorio .....	35
9.	Gráfica de tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la solución .....	40
10.	Diagrama de Pareto para la determinación de la influencia de cada factor en función de los azúcares reductores totales obtenidos.....	41
11.	Factores estadísticamente significativos en función de los azúcares reductores totales obtenidos .....	42
12.	Instructivo de operación, página 2 .....	44
13.	Instructivo de operación, página 3 .....	45
14.	Instructivo de operación, página 4 .....	46

### TABLAS

I.	Composición química promedio en jugo de caña de azúcar .....	4
----	--	---



II.	Variables por utilizar a escala laboratorio .....	17
III.	Factores de sacarosa .....	28
IV.	Variables y valores por utilizar en cada mezcla inicial. ....	32
V.	Matriz ortogonal resultante .....	33
VI.	Sustitución de datos en matriz ortogonal resultante .....	34
VII.	Arreglos factoriales resultantes con mayor rendimiento hidrolítico de azúcares reductores totales a las concentraciones de 0,053 y 0,066 (g/ 0,5 L muestra) respectivamente .....	39
VIII.	Resultado de las pruebas de hipótesis .....	42
IX.	Instructivo de operación, página 1 .....	43

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
HCl	Ácido Clorhídrico
AR	Azúcares reductores
ART	Azúcares reductores totales
AT	Azúcares totales
Bx	Brix
R	Coeficiente de correlación
s	Desviación estándar
F	Factor de Fisher
F	Factor de sacarosa
FI1	Factor ICUMSA 1
FI2	Factor ICUMSA 2
°C	Grados Celsius
g	Gramo
Ha	High Test Molasses
HO	Hipótesis alterna
HTM	Hipótesis nula
L	Litro
>	Mayor que
<	Menor que
mL	Mililitro
No	Número
SQ	Sacarosa química
T1	Titulación 1

<b>T2</b>	Titulación 2
<b>T3</b>	Titulación 3
<b>VFehling</b>	Volumen añadido de Fehling A y B
<b>V1</b>	Volumen gastado en titulación 1
<b>V2</b>	Volumen gastado en titulación 2

## GLOSARIO

<b>AR</b>	Indica la composición de los azúcares reductores glucosa y fructosa.
<b>ART</b>	Indica la composición total de los azúcares reductores totales, es decir sacarosa, glucosa y fructosa.
<b>Aspergillus</b>	Género conformado por hongos filamentosos.
<b>Azúcares reductores</b>	Hidratos de carbono que contienen un grupo aldehído o cetona libre, por lo que actúan como agentes reductores, es decir que son capaces de donar electrones a otra molécula.
<b>Brix</b>	Concentración de sólidos disueltos contenidos en la solución.
<b>Clarificación</b>	Consiste en la remoción por sedimentación de las impurezas sólidas contenidas en el jugo de caña.
<b>Desnaturalizar</b>	Cambio en la estructura nativa de los ácidos nucleicos o proteínas por medio de agentes desnaturalizantes o por cambios en la polaridad, fuerza iónica, pH o temperatura del disolvente.

<b>Dextrógira</b>	Rotación a la derecha de la luz polarizada de la sacarosa.
<b>Enzima</b>	Proteínas globulares formadas por cadenas polipeptídicas, las cuales ejercen como catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas.
<b>Evaporación flash</b>	Se origina cuando el fluido se pone en contacto con una presión superior a su presión de saturación, provocando que se evapore súbitamente.
<b>Evaporador tipo Roberts</b>	Evaporador de película ascendente el cual se caracteriza por tener un cuerpo cilíndrico vertical con dos placas tubulares donde se encuentra la calandria de tubos internos. El vapor fluye fuera de los tubos de la calandria y el jugo claro dentro de los tubos, ambos en el mismo sentido, generando la salida de flujos en la parte inferior del evaporador.
<b>Factores ICUMSA</b>	Factor que representa el volumen conocido en la titulación 2 y 3 del método ICUMSA GS4/3-3 (2007).
<b>Fehling</b>	Reactivo utilizado para determinar la presencia de azúcares reductores.
<b>Flocs</b>	Unión entre los sólidos en suspensión, proteínas desnaturalizadas y el precipitado de las especies fosfatadas de calcio generado durante el tiempo de retención en la clarificación del jugo de caña.

<b>Fructosa</b>	Hidrato de carbono ubicado principalmente en frutas y en miel de origen natural.
<b>Glucosa</b>	Hidrato de carbono más abundante en la naturaleza, es la principal fuente de energía de la mayor parte de organismos heterótrofos.
<b>Hidrólisis ácida de la sacarosa</b>	Consiste en poner en contacto la sacarosa con un ácido de alta temperatura, esto incorporará una molécula de agua generando que la sacarosa se descomponga en los dos monosacáridos que la conforman.
<b>Hidrólisis enzimática</b>	Consiste en invertir la rotación de la sacarosa frente a la polarización de la luz por medio de la enzima invertasa.
<b>High test molasses (HTM)</b>	Hace referencia a miel de alta pureza, cuyo contenido es exclusivamente azúcares reductores.
<b>ICUMSA</b>	Comisión internacional de métodos uniformes para el análisis del azúcar.
<b>Inhibir</b>	Pausar el accionamiento de la enzima.
<b>Inversión de la sacarosa</b>	Consiste en revertir la sacarosa en sus monosacáridos formadores glucosa y fructosa.

<b>Invertasa</b>	Enzima utilizada para catalizar la hidrólisis de la sacarosa.
<b>Jugo claro</b>	Jugo de caña de azúcar que ha pasado por el proceso de clarificación.
<b>Levógira</b>	Rotación a la izquierda de la luz polarizada de la sacarosa.
<b>Meladura</b>	Material azucarado que ya pasó por el proceso de clarificación y evaporación.
<b>Miel invertida</b>	Material de alta pureza conformado por fructosa y sacarosa.
<b>Octapol</b>	Reactivo utilizado para clarificar, previo al análisis polarimétrico de materiales azucarados.
<b>Oligosacáridos</b>	Hidratos de carbono conformados por la unión de varios monosacáridos.
<b>Orden de reacción</b>	Hace referencia al exponente del término correspondiente a la concentración del reactivo en la ley de velocidad.
<b>pH</b>	Representa la concentración de iones hidrógeno, lo cual a su vez indica la alcalinidad o acidez de una solución.

<b>Pol</b>	Concentración porcentual de la sacarosa contenida en el jugo de caña, obtenida por medio de la técnica analítica de polarimetría.
<b>Polarimetría</b>	Técnica en la cual se analizan isómeros ópticamente activos partiendo del ángulo de rotación que generan.
<b>Pureza</b>	Relación porcentual entre Pol y brix ( $\text{Pol} \times 100 / \text{brix}$ ).
<b>Sacarosa</b>	Disacárido formado por la unión de los monosacáridos glucosa y fructosa.
<b>Sulfitación</b>	Proceso en el cual el jugo de caña se pone en contacto en contracorriente con anhídrido sulfuroso a fin de disminuir la coloración de este.
<b>Tándem de molinos</b>	Arreglo de molinos conectados entre sí.
<b>Viscosidad</b>	Resistencia de un fluido al movimiento.
<b>Zafra</b>	Época del año en la cual se cosecha caña de azúcar para luego procesarla en ingenios azucareros.





## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó las condiciones óptimas de la actividad enzimática de la invertasa ( $\beta$ -D-fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26), a fin de obtener la mayor hidrólisis de la sacarosa, para su ajuste en el proceso de producción de miel invertida.

Se procedió a realizar la reacción enzimática de inversión de la sacarosa en la mezcla inicial de meladura – jugo claro a escala laboratorio, donde se monitoreó la cantidad de sacarosa invertida con base al parámetro analítico Pol, tomando como períodos de monitoreo desde la cuarta hora de inversión y finalizando en la octava hora.

La hidrólisis se efectuó con dos valores de temperatura (50, 55) °C, dos valores de concentración de enzima (0,053, 0,066) g/0,5 L, dos valores de pH (5,5, 6,0) y dos valores de concentración brix de la mezcla (55, 60) °Bx, con el propósito de determinar el mejor arreglo combinatorio de parámetros de proceso.

Luego de finalizar el tiempo de inversión de la sacarosa, se procedió a la concentración de la miel y a la medición de azúcares reductores, obtenidos en el producto terminado, usando como referencia los métodos ICUMSA GS4/ 3-3 (2007) e ICUMSA GS4/ 3-7 (2011).

Se determinó que la mayor inversión de la sacarosa se obtuvo al utilizar una concentración de la enzima de 0,066 g enzima/0,5L muestra, pH de 5,5 y una temperatura de 50 °C, para un tiempo de 7 horas de inversión. Se concluyó que el brix no es un valor influyente en la recuperación de azúcares reductores.



## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar las condiciones óptimas del proceso de hidrólisis enzimática de la sacarosa en mieles de caña de azúcar para la mayor conversión en azúcares invertidos o reductores.

### **Específicos**

1. Determinar que arreglo factorial obtiene mayor rendimiento hidrolítico de azúcares reductores totales.
2. Elaborar una correlación que se ajuste a la tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la solución.
3. Evaluar mediante el diseño factorial de Plackett-Burman la influencia de cada factor de operación en función de los azúcares reductores totales obtenidos.
4. Elaborar una documentación que contenga el procedimiento del proceso de hidrólisis enzimática a nivel laboratorio.

## Hipótesis

### Hipótesis conceptual

- La concentración del sustrato es directamente proporcional a la actividad enzimática obtenida. Debido a que se alcanzará la velocidad máxima de hidrólisis al llegar al nivel saturante de actividad enzimática.
- La concentración de la enzima invertasa es directamente proporcional al porcentaje de azúcares reductores totales obtenidos. Debido a que, a una mayor concentración de enzima, mayor será la velocidad de la reacción catalizada enzimática en la mezcla inicial.

### Hipótesis estadística

#### Hipótesis nula

- $H_{O1}$ : Las medias de los azúcares reductores totales no varían significativamente en función de la concentración del sustrato.

$$H_{O1}: \mu ART_1 = \mu ART_2 = 0$$

- $H_{O2}$ : Las medias de los azúcares reductores totales no varían significativamente en función de la concentración de la enzima.

$$H_{O2}: \mu ART_1 = \mu ART_2 = 0$$

- HO<sub>3</sub>: Las medias de los azúcares reductores totales no varían significativamente en función de la variación de pH del sustrato.

$$HO_3: \mu ART_1 = \mu ART_2 = 0$$

- HO<sub>4</sub>: Las medias de los azúcares reductores totales no varían significativamente en función de la variación de la temperatura del sustrato.

$$HO_4: \mu ART_1 = \mu ART_2 = 0$$

### **Hipótesis alterna**

- Ha<sub>1</sub>: Las medias de los azúcares reductores totales varían significativamente en función de la concentración del sustrato.

$$Ha_1: \mu ART_1 \neq \mu ART_2 \neq 0$$

- Ha<sub>2</sub>: Las medias de los azúcares reductores totales varían significativamente en función de la concentración de la enzima.

$$Ha_2: \mu ART_1 \neq \mu ART_2 \neq 0$$

- Ha<sub>3</sub>: Las medias de los azúcares reductores totales varían significativamente en función de la variación de pH del sustrato.

$$Ha_3: \mu ART_1 \neq \mu ART_2 \neq 0$$

- Ha<sub>4</sub>: Las medias de los azúcares reductores totales varían significativamente en función de la variación de la temperatura del sustrato.

$$Ha_4: \mu \text{ ART1} \neq \mu \text{ ART2} \neq 0$$

## INTRODUCCIÓN

A través de la investigación se buscó evaluar el efecto y las condiciones óptimas de la temperatura, concentración de enzima, pH y la concentración inicial de sacarosa en la reacción de hidrólisis de la sacarosa a escala laboratorio. Esto se realizó con el objetivo de maximizar la cantidad de azúcares reductores totales obtenidos.

Luego de determinar las condiciones óptimas del proceso, se busca evaluar por medio del diagrama de Pareto si todas las variables analizadas son influyentes para la recuperación de azúcares invertidos.

Para garantizar que la miel invertida sea un producto de calidad, es esencial que exista una guía o documentación del proceso estandarizado que sea de fácil acceso y entendimiento tanto para operadores como para coordinadores de esta línea.

Parte de la investigación consistió en documentar el procedimiento del proceso de hidrólisis enzimática a escala laboratorio, garantizando una obtención eficiente de azúcares totales medidos según los métodos oficiales de ICUMSA GS4/ 3-3 (2007) e ICUMSA GS4/ 3-7 (2011).





## 1. ANTECEDENTES

Se han realizado los siguientes estudios acerca de la hidrólisis enzimática de la sacarosa y mieles invertidas:

En agosto del 2018, se publicó una patente estadounidense realizado por un grupo de investigadores hindúes titulado: *Method for the preparation of high test molasses*, el objetivo de esta patente consistió en proporcionar un método de preparación en cual dicha miel de alta pureza fuera eficiente en términos de recuperación de azúcar y calidad del producto terminado. Durante el desarrollo de dicho método, se concluyó que el uso de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico no es recomendable para la preparación de la miel a invertir, porque es residualmente corrosivo y de baja eficiencia debido a las pérdidas de azúcar. Se concretó que el tiempo de vida de esta miel es de aproximadamente 6 meses, esto también depende de las condiciones en las que esta se almacena.

En 2011, se publicó un artículo acerca de la invertasa, realizado por un grupo de investigadores, titulado: Invertasa del género *Aspergillus* y su impacto biotecnológico, el objetivo de este era la revisión y discusión de las investigaciones más recientes sobre la producción de invertasa por cepas del género *Aspergillus*, purificación y caracterización de la enzima, así también avances en el campo de invertasas recombinantes. Se concluyó como parte de la caracterización fisicoquímica de la enzima que esta actúa en un rango óptimo de pH de 5,0 – 6,5, siendo el óptimo 5,5, registrando la máxima actividad a 50 °C. Además de afirmar que tanto la concentración inicial del sustrato, la temperatura de reacción y el pH son estadísticamente significativos.

En 1987, se realizó un estudio de la hidrólisis de la sacarosa y la subsiguiente conversión de glucosa en fructosa mediante el uso de enzimas para luego separarlos mediante resinas de intercambio iónico, presentado en el Congreso de la Sociedad Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar realizado por un grupo de investigadores Calero, A; Perea, H; Cortes, H. Titulado “Hidrólisis e inversión enzimática de la sacarosa”. El objetivo era optimizar la actividad de la enzima en soluciones de sacarosa, utilizando temperatura en un rango de 45, 55 y 65 °C, pH de 3,5, 4,0 y 4,5. En los resultados se pudo observar que se alcanzó la máxima conversión en un período de 8 horas con un pH de 4,0 y a una temperatura de 55 °C. Se concluyó que no hubo efecto significativo en la concentración del sustrato y su inversión.

En 1985, se publicó un artículo por parte del Centro de Tecnología COPERSUCAR. realizado por el Ing. Stupielo Titulado *Processo de produção de high test molasses*, y su objetivo era describir el proceso de producción de esta miel de alta pureza mediante los métodos de inversión ácida e inversión enzimática, en donde se concluye que la concentración ideal del sustrato a invertir es de 53°Bx y que durante la inversión de la miel se debe evitar temperaturas mayores a 60 °C para no inhibir la actividad enzimática, y al momento de concentrar evitar temperaturas mayores de 90 °C porque se pierde azúcar por posibles reacciones secundarias.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Caña de azúcar

El cultivo de caña de azúcar es uno de los productos más predominantes en Guatemala, y la producción de azúcar una de sus actividades económicas con mayor demanda, tanto que se ubica en el cuarto lugar como país exportador a nivel mundial.

La producción de caña varía significativamente de un área a otra, esto depende de factores climáticos, disponibilidad de agua, variedad de caña, prácticas de cultivo, entre otros. Generalmente, luego de cada corte de caña no se vuelve a sembrar, sino que se deja crecer para producir otra cosecha, la cual se denomina soca o rebrote. Después de varias socas, se ara de nuevo la tierra y se siembra nuevamente la caña. Cada temporada donde inicia la molienda o zafra está delimitada principalmente por factores meteorológicos como el inicio del invierno.<sup>1</sup>

Durante la zafra el objetivo principal consiste en recobrar toda la sacarosa que se encuentra acumulada en el tallo de la caña durante su período de maduración.

#### 2.1.1. Composición de la caña de azúcar

La caña de azúcar proviene de las familias de gramíneas, del género *Saccharum officinarum*, el jugo que se extrae de la misma está constituido principalmente por agua, hidratos de carbono como la sacarosa y a una menor concentración azúcares reductores como la glucosa y fructosa y los oligosacáridos.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> REIN, Peter. *Ingeniería de la caña de azúcar*. p. 37.

<sup>2</sup> ZOSSI, Silvia., CARDENAS, Geronimo., SOROL, Natalia. y SASTRE, Marcos. *Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina): Parte 1: caña limpia y despuntada*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AR2010F00003>. Consulta: 01 de abril de 2020.

La caña de azúcar posee un 85 % jugo y el resto de materia insoluble como fibra. En la Tabla 1, se muestra la composición química promedio contenida en el jugo de caña de azúcar.

Tabla I. **Composición química promedio en jugo de caña de azúcar**

<b>COMPOSICIÓN DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR EN SÓLIDOS SOLUBLES DEL JUGO</b>		
	<b>Descripción</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Azúcares</b>	Sacarosa	75 – 92
	Glucosa	70 – 88
	Fructosa	2 – 4
<b>Sales</b>	Inorgánicas	3,0 – 3,4
	Orgánicas	1,5 – 4,5
<b>Ácidos orgánicos</b>		1,0 – 3,0
<b>Componentes no orgánicos</b>	Proteínas	0,5 – 0,6
	Almidones	0,001 – 0,05
	Gomas	0,3 – 0,6
	Grasas, ceras	0,15 – 0,50
	Compuestos fenólicos	0,10 – 0,80

Fuente: elaboración propia.

## **2.2. Proceso de elaboración de azúcar**

El proceso de producción industrial de azúcar lleva consigo una serie de pasos los cuales inician desde la entrada de la caña de azúcar hacia los molinos, tratamiento del jugo, evaporación, cristalización, centrifugación, hasta concluir con el secado y acondicionamiento de este.

### **2.2.1. Preparación y molienda de la caña de azúcar**

Luego de la quema y corte de la caña inicia el proceso industrial para la elaboración de azúcar, donde los procesos iniciales se resumen en la recepción y manejo de la caña en patio, pasando a las mesas alimentadoras que la transportan hacia las picadoras y desfibradoras de martillos sin filo, para que se homogenice el tamaño de la caña y a su vez se desfibre.

Luego, la caña ingresa al tándem de molinos, donde principalmente se extrae el jugo mediante la acción mecánica de los molinos y luego por el proceso de imbibición compuesta. A la unión del jugo primario (extraído del primer molino) con el jugo secundario (extraído del segundo molino y el resultante de la imbibición) se le conoce como jugo mezclado.<sup>3</sup>

### **2.2.2. Clarificación**

Luego de la molienda de la caña de azúcar se procede al tratamiento y clarificación del jugo obtenido, cuyo principal objetivo consiste en remover todas las impurezas sólidas del jugo al contenerlas mediante la sedimentación, y ocurre mediante los fosfatos de calcio que inician la formación de *flocs* que acumulan toda esta materia. Para llevar a cabo este proceso se inicia de la siguiente manera:

#### **2.2.2.1. Sulfitación**

El jugo mezclado se bombea hacia las torres de sulfitación, en las cuales se le dosificará anhídrido sulfuroso con solución de cal (sacarato), se formará ácido sulfúrico por la hidrólisis del jugo. Los sulfitos reducirán el color del jugo y a su vez eliminará los precursores de color, también ayudará a disminuir la viscosidad de la meladura.<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> CENGICAÑA. *El Cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. p. 320-322.

<sup>4</sup> *Ibíd.* p. 334-335.

### 2.2.2.2. Alcalinización

Al salir el jugo de la torre de sulfitación, inicia la formación de *flocs* mediante la reacción química compleja entre el anión fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  (al adicionar ácido fosfórico) y el catión calcio  $\text{Ca}^{2+}$  (al adicionar sacarato). En esta etapa, el jugo mezclado se calienta hasta el punto de ebullición del agua para que la reacción ocurra. El aire atrapado en el jugo se eliminará mediante la evaporación flash con el fin de evitar que se formen burbujas con sedimentos.<sup>5</sup>

Los *flocs* al unirse con flóculos secundarios y coágulos forman un lodo denso, lo cual se denomina cachaza. Al ser más densa que el jugo alcalizado precipita y mediante bombas se succiona. Luego se filtra la cachaza para recuperar el jugo contenido y se une con el jugo claro obtenido. El jugo clarificado posee una concentración de sólidos suspendidos (brix) en el rango de 15 – 18°Bx y pH alcalino, lo cual evita la inversión de la sacarosa y mejora la recuperación de la sacarosa.<sup>6</sup>

### 2.2.3. Evaporación

“Luego de obtener el jugo claro se procede a la eliminación del agua contenida en el jugo mediante su evaporación. La concentración de los sólidos disueltos (brix) aumenta en un rango entre 65– 67° Bx”<sup>7</sup>. La evaporación del jugo se realiza en evaporadores de múltiple efecto y presiones de vacío, a fin obtener un mayor control en la temperatura y una mejor economía de vapor. Al no trabajar a temperaturas muy elevadas se evita la pérdida de azúcares, la formación de color y la caramelización del material.

Los evaporadores más utilizados en Guatemala son los de concha y tubos y los de película ascendente tipo Roberts, donde este último se caracteriza por tener un cuerpo cilíndrico vertical con dos placas tubulares donde se encuentra la calandria de tubos internos, este tipo de evaporador se caracteriza por lograr una buena circulación del jugo (Pérez, 2001).<sup>8</sup>

---

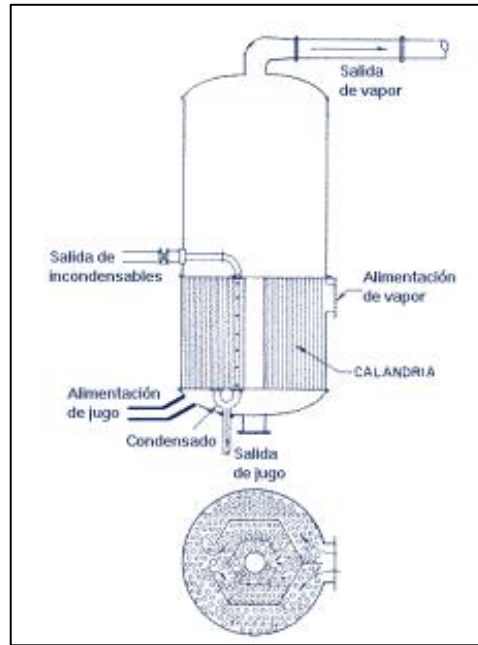
<sup>5</sup> MCCABE, Warren. y SMITH, Julian. *Operaciones básicas de ingeniería química*. p. 336.

<sup>6</sup> REIN, Peter. *Ingeniería de la caña de azúcar*. pp. 338 - 340.

<sup>7</sup> *Ibíd.* p. 340.

<sup>8</sup> SIMÓN PÉREZ, Esther. *Modelado y simulación dinámica en ecosimpro de una estación de evaporación de la industria azucarera*. [https://www.ecosimpro.com/wp-content/uploads/2015/02/C01\\_08\\_es.pdf](https://www.ecosimpro.com/wp-content/uploads/2015/02/C01_08_es.pdf). Consulta: 01 de abril de 2020.

Figura 1. **Evaporador tipo Roberts**



Fuente: SIMÓN PÉREZ, Esther. *Modelado y simulación dinámica en ecosimpro de una estación de evaporación de la industria azucarera*. [https://www.ecosimpro.com/wp-content/uploads/2015/02/C01\\_08\\_es.pdf](https://www.ecosimpro.com/wp-content/uploads/2015/02/C01_08_es.pdf). Consulta: 01 de abril de 2020.

Al salir el jugo del último efecto a ese material se le denomina meladura, el cual posee una densidad elevada y una alta viscosidad. La meladura a su vez contiene sólidos suspendidos que no sedimentan, por lo cual se realiza una clarificación por flotación, donde inicialmente se parte de un tratamiento fisicoquímico que consiste en la dosificación de ácido fosfórico, floculante y cal. Y luego, todas las impurezas del material quedan unidas en una espuma, misma que se genera por medio de la inyección de pequeñas burbujas de aire que hacen ascender todos los *flocs* de impurezas. Y finalmente decantar la meladura clarificada.<sup>9</sup>

#### **2.2.4. Agotamiento de las mieles y desarrollo del cristal**

Luego de que la meladura ya está clarificada ingresa a tachos, los cuales son los encargados de la cocción de la meladura y mieles que salen de las

<sup>9</sup> CENGICAÑA. *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. p. 340-343.



centrífugas, a fin de formar cristales de azúcar para su posterior centrifugación, secado y acondicionamiento. Estos equipos trabajan al vacío e involucran procesos simultáneos de transferencia de calor y de masa.

Para fines de esta investigación únicamente se utilizarán los tachos para la cocción y concentración del material final.

Figura 2. Diagrama de bloques para la obtención de azúcar

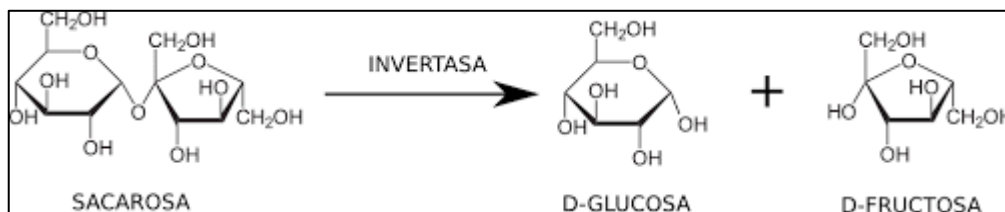


Fuente: elaboración propia.

### 2.3. Azúcares invertidos

Estos azúcares, glucosa y fructosa cuentan con un grupo carbonilo en su estructura, mismo con el que reaccionan como oxidantes con otras moléculas debido a la alta reactividad del doble enlace de oxígeno, he de ahí que se les llame reductores. También se les conoce como azúcares invertidos porque estos se obtienen a partir de la hidrólisis ácida o enzimática de la sacarosa, que invierte la rotación de la solución frente a la polarización de la luz.

Figura 3. **Reacción de hidrólisis enzimática de la sacarosa.**



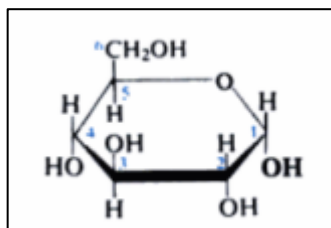
Fuente: ALLINGER, Norman., JHONSON, Carl. y LEBEL, Norman. *Química orgánica*. p. 984.

Su poder endulzante es más alto que el de la sacarosa, y su poder anticongelante también, por ende, no son azúcares cristalizables.

### 2.3.1. Glucosa

La glucosa es un monosacárido que contiene 6 átomos de carbono, es decir una hexosa. Al ubicarse este grupo hexosa al extremo de la molécula lo convierte a su vez en una aldosa. A este monosacárido se le conoce también como D-glucopiranososa, ya que su heterociclo formado es muy parecido al compuesto heterocíclico pirano.<sup>10</sup>

Figura 4. **Estructura química de la glucosa**



Fuente: THORNTON MORRISON, Robert. y NEILSON BOYD, Robert. *Química orgánica*. p. 1292.

<sup>10</sup> THORNTON MORRISON, Robert. y NEILSON BOYD, Robert. *Química orgánica*. p. 1 291 – 1 295.

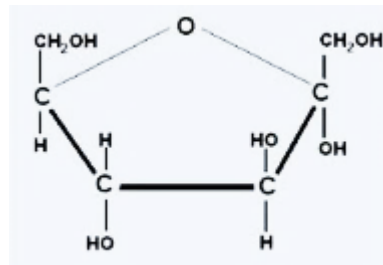
A la glucosa también se le conoce como dextrosa, porque en el plano de luz polarizada esta gira hacia la derecha.

La glucosa es el monosacárido más importante y abundante en la naturaleza, además de ser la principal fuente de energía del cuerpo, esta circula en el torrente sanguíneo durante la digestión o bien es almacenada también como un glucógeno. Además, también constituye uno de los principales productos en la fotosíntesis y energía en la respiración celular. En resumen, la glucosa es la fuente de energía de la mayor parte de los organismos heterótrofos mediante el proceso de glicólisis.<sup>11</sup>

### 2.3.2. Fructosa

Este azúcar consiste en una cadena simple de seis carbonos, diferenciándose de la glucosa en que la ubicación del doble enlace con el oxígeno está cerca al último carbono de la cadena, en este caso reacciona el hidroxilo del carbono 5 con el carbono 2 del grupo cetona, formando un heterociclo, al parecerse al compuesto furano se le denomina también fructofuranosa.<sup>12</sup>

Figura 5. Estructura química de la fructosa



Fuente: ATKINS, Peter. *Las moléculas de Atkins*. p. 110.

Se le conoce también como levulosa y azúcar de la fruta. El primer nombre hace referencia a que en el plano de luz polarizada esta tiende a girar hacia la izquierda (levógira), y el segundo es porque a mayor parte de ella se encuentra en las frutas y verduras.

<sup>11</sup> ATKINS, Peter. *Las moléculas de Atkins*. p. 111.

<sup>12</sup> *Ibíd.* pp. 110 - 112.

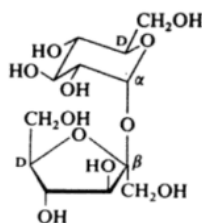
De los tres azúcares, la fructosa posee el sabor más dulce, es alrededor de un 50% más dulce que la glucosa, y es más soluble que la glucosa y sacarosa. Debido a su alto poder edulcorante genera el menor impacto en los niveles de azúcar en la sangre, sin embargo, la fructosa reduce la oxidación de ácidos grasos, por lo que aumenta la síntesis de lípidos en el hígado, generando con su consumo excesivo una sobrecarga hepática e hígado graso.<sup>13</sup>

## 2.4. Sacarosa

La sacarosa es el disacárido resultante de la unión química de dos monosacáridos los cuales son glucosa y fructosa. La glucosa se encuentra en forma de anillo de seis miembros (cinco carbonos y un oxígeno), es decir en forma de piranosa, mientras que la fructosa se presenta como un anillo de 5 miembros (cuatro carbonos y un oxígeno), es decir similar a la furanosa.

“El enlace que los une es de tipo glucosídico, donde para la glucosa es el enlace  $\alpha$ , y para la fructosa el enlace  $\beta$ . Por tanto, la sacarosa es una  $\alpha$ -D-glucanopiranososa (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D- fructofuranósido”<sup>14</sup>. En la figura 7, se muestra la estructura química de la sacarosa, que fue determinada mediante degradación y rayos X.

Figura 6. Estructura química de la sacarosa



Fuente: ALLINGER, Norman., JHONSON, Carl. y LEBEL, Norman. *Química orgánica*. p. 984.

<sup>13</sup> ATKINS, Peter. *Las moléculas de Atkins*. p. 110 - 112.

<sup>14</sup> RAUTER, Amélia., VOGEL, Pierre. y QUENEAU, Yves. *Carbohydrates in Sustainable Development I*. p. 80.

La sacarosa no presenta mutarrotación, no forma osazonas y no es reductora, ya que los carbonos anoméricos de sus dos monosacáridos constituyentes se encuentran unidos covalentemente con un enlace O-glucosídico, es decir que sus grupos carbonilos se encuentran totalmente como acetal y cetal.<sup>15</sup>

La sacarosa, comúnmente conocida como azúcar comercial, es utilizada en los alimentos debido a su alto poder endulzante, se extrae principalmente de la caña de azúcar, remolacha y maíz. Al llegar al estómago, sufre una hidrólisis ácida y una parte de la sacarosa ingerida se desdobla en sus componentes glucosa y fructosa, el resto pasa al intestino delgado donde por medio de una hidrólisis enzimática se desdobla la sacarosa restante.

#### **2.4.1. Inversión de la sacarosa**

En términos químicos, esto hace referencia al cambio en el sentido de la rotación de la luz polarizada de la sacarosa, pasando de dextrógira a levógira para la obtención de glucosa y fructosa. Por ello es por lo que a los monosacáridos separados se les conoce como azúcares invertidos.

Estos cambios en la actividad óptica suelen lograrse por medio de la acción hidrolítica ácida o enzimática.

##### **2.4.1.1. Hidrólisis ácida**

La hidrólisis ácida de la sacarosa puede realizarse utilizando cualquier ácido fuerte, en donde la velocidad de la inversión dependerá básicamente del pH y la temperatura y de la concentración del jarabe a utilizar. Generalmente, para evitar reacciones secundarias que generen pérdidas de azúcar se evitan temperaturas mayores a 90 °C y pH inferiores a 2.

---

<sup>15</sup> ALLINGER, Norman., JHONSON, Carl. y LEBEL, Norman. *Química orgánica*. p. 984.

La reacción de hidrólisis presenta una cinética de 1er orden, como el tiempo en la hidrólisis ácida es más pequeño, se requiere de un equipo de pequeñas dimensiones, porque al utilizar bajos pH y ácidos fuertes, la corrosividad es bastante grande, por lo que se recomienda utilizar materiales más nobles.

Se tiene que tomar en cuenta también cual será el uso de la miel invertida, por ejemplo, si se tiene destinado para una destilería, no es recomendable utilizar ácido clorhídrico, porque los cloruros generarían una corrosión en las columnas de acero inoxidable, si se tiene destinado para alimentar al ganado, se debe evitar utilizar ácido sulfúrico, ya que los sulfatos les provocarían diarrea

#### **2.4.1.2. Hidrólisis enzimática**

En la inversión enzimática de la sacarosa se utiliza como catalizador a la enzima invertasa (EC 3.2.1.26), cuya especificidad es absoluta, la cual se encuentra en varios microorganismos, especialmente en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, ya que se ha demostrado que son buenos productores de la enzima mediante fermentación en cultivo sumergido.<sup>16</sup>

Las enzimas son catalizadores biológicos selectivos específicos, con una alta eficiencia, donde sus actividades catalíticas se pueden regular de una manera muy precisa. Estas proteínas se encargan de acelerar la velocidad de una reacción química, sin afectar su equilibrio, al contrario, alcanzan el equilibrio mucho más rápido que una reacción no catalizada. Las enzimas no se transforman durante la reacción, por lo que únicamente pueden desnaturalizarse por factores como temperaturas elevadas y pH's muy bajos o altos.

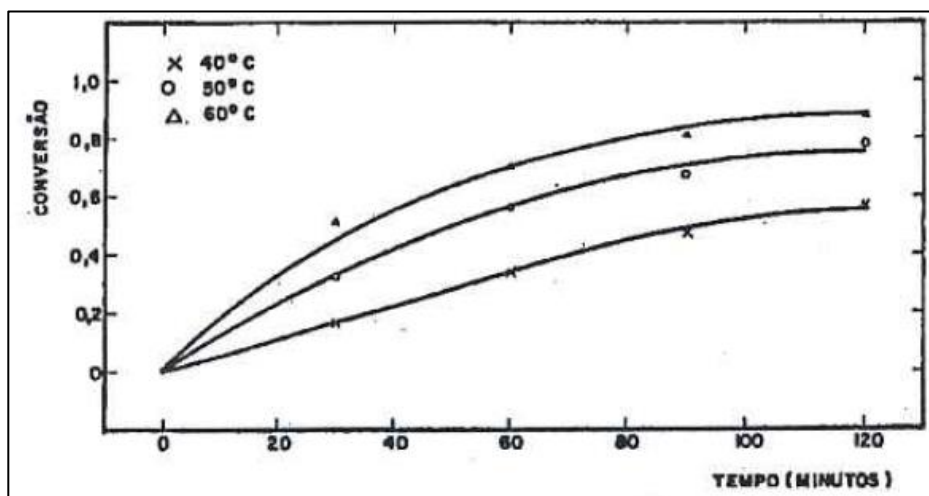
La hidrólisis enzimática se da en el orden de reacción de horas, sin embargo, presenta mayores ventajas que la hidrólisis ácida, por ejemplo, se evita la degradación de azúcar en el proceso al no existir reacciones secundarias, al utilizar

---

<sup>16</sup> VEANA, Fabiola., DURÓN-VÁZQUEZ, Ricardo., GUERRERO OLAZARÁN, Martha., VIADER SALVADÓ, José María., AGUILAR, Cristóbal. y RODRÍGUEZ HERRERA, Raúl. *Invertasa del género Aspergillus y su impacto biotecnológico*. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62045307006.pdf>. Consulta: 29 de marzo de 2020.

enzimas el producto final se adecúa a cualquier propósito que fuese destinado, caso contrario de la hidrólisis ácida en la que se necesita elegir el ácido y base adecuado según su propósito final. También que ofrecen mayor ventaja en las condiciones de reacción como temperatura y pH, ya que ocurren en un intervalo entre 40 y 60 °C y en un rango de pH entre 4,0 y 8,0.<sup>17</sup>

Figura 7. **Influencia de la temperatura en la velocidad de inversión enzimática de la sacarosa**



Fuente: COPERSUCAR. *Processo de produção de high test molasses*. p. 3.

Se observa como la cinética de la reacción se ve beneficiada con el aumento de temperatura, sin embargo, para el caso de esta miel invertida que se encuentra a 55 °Bx y a una concentración de 5,0 kg enzima/ ton miel, se debe evitar temperaturas mayores a 60 °C durante la inversión de la sacarosa para que la enzima no se desnaturalice, y durante la concentración final del producto temperaturas mayores de 90 °C para evitar que se pierda azúcar por reacciones secundarias o bien destruir los azúcares reductores previamente formados.

La concentración del material final es de gran influencia en la hidrólisis enzimática, ya que a mayor concentración la velocidad de inversión es más baja, y de 83 – 85° Brix la actividad de la enzima prácticamente cesa.<sup>18</sup>

<sup>17</sup> ROMERO VARGAS, Gissell Astrid. y REYES CUELLAR, Julia Constanza. *Hidrólisis de sacarosa por invertasa de Saccharomyces cerevisiae inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto*. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-28122019000200115&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-28122019000200115&lng=en&nrm=iso&tlng=es). Consulta: 06 de abril de 2020.

<sup>18</sup> COPERSUCAR. *Processo de produção de high test molasses*. p. 3.

## **2.5. Prueba de Fehling**

La prueba de Fehling es una prueba orgánica capaz de detectar azúcares reductores y aldehídos en solución. Esta fue descrita por el químico alemán Hermann Von Fehling. Sirve para afirmar la presencia de glucosa en la solución como sus derivados como la sacarosa y fructosa. La prueba consiste en dos soluciones acuosas: la solución A de Fehling es de sulfato II de cobre, y la solución B de Fehling es la solución alcalina de tartrato sódico, 2,3 dihidroxibutanodioato, mismas que se agregan en cantidades iguales en la solución a controlar.

Tras ocurrir la ebullición de la solución con Fehling pasa de un color azul a un precipitado color rojo ladrillo, este se da por la oxidación del ácido y la reducción de la sal de cobre (II), a cobre (I), en medio alcalino.

Cabe resaltar que la reacción se produce en un medio alcalino fuerte, por lo que algunos compuestos no reductores como la fructosa que contiene cetonas pueden enolizarse (transformarse en enol) a un aldehído dado un falso positivo. Si reacciona con monosacáridos la coloración de la solución final se tornará verdosa, mientras que si lo hace con disacáridos se tornará rojo ladrillo.

### **2.5.1. Métodos ICUMSA**

Estos métodos analíticos se utilizan para la identificación y determinación de azúcares reductores, azúcares reductores totales y sacarosa química en la miel invertida final, con el objetivo de satisfacer un requerimiento comercial. Para esto se utiliza el método volumétrico de Lane & Eynon, que consiste en encontrar el volumen del titulante necesario para reducir un volumen conocido del reactivo alcalino de cobre.



El método consiste en tres titulaciones, donde el volumen gastado en la última titulación dará la pauta de cuantos azúcares reductores y azúcares reductores totales contiene la muestra, expresado en porcentaje masa/masa.

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Variables

Para cumplir con los objetivos planteados, se definió las variables a utilizar para dicha investigación a escala laboratorio.

Tabla II. Variables por utilizar a escala laboratorio

Variables	Unidades	Constante	Variable
Grados Brix	%		X
Volumen de meladura	L	X	
Volumen de jugo clarificado	L		X
Temperatura de trabajo	°C		X
Volumen de agua para preparación de la enzima	L	X	
Concentración de la enzima	g/L		X
pH	-		X
Pol	%		X
Tiempo de hidrólisis enzimática	h	X	
AR	%		X
ART	%		X
Sacarosa química (SQ)	%		X
AT	%		X

Fuente: elaboración propia.

### **3.2. Delimitación del campo de estudio**

La investigación y experimentación se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Control y Gestión de Calidad de Ingenio La Unión. Esta investigación se enfocó en la hidrólisis enzimática de la sacarosa, utilizando para este caso la enzima invertasa. A dicha enzima se le analizó sus condiciones óptimas de operación, variando concentración de la invertasa y concentración, temperatura y pH del sustrato, a fin de verificar si todas las anteriores son influyentes en la cantidad recuperada de azúcares totales invertidos.

Se monitoreó la hidrólisis de la sacarosa a partir de la cuarta hora de inversión y se finalizó en la octava hora de inversión, luego se procedió a la concentración de esta en un rango de 80 – 83°Bx. Finalmente se realizó el conteo de azúcares reductores y azúcares reductores totales obtenidos utilizando los métodos ICUMSA GS4/ 3-3 (2007) e ICUMSA GS4/ 3-7 (2011), respectivamente.

Al determinar el arreglo experimental con la mayor cantidad de azúcares invertidos se procedió a realizar una propuesta de estandarización del proceso.

### **3.3. Recursos humanos disponibles**

- Investigador: Marjeory Alejandra Micheo Navas
- Asesorado por: Ingeniera Química, Lisbeth Mariela Samayoa Bernal, colegiada No. 2254.
- Profesionales de Ingenio La Unión.
  - Gerente Industrial: Ing. Elfego Arturo Bautista Sandoval
  - Superintendente de Fabricación: Ing. Mynor Rolando Estrada

- Análisis Externos: Operadores de Laboratorio de Control y Gestión de la Calidad.
- Operadores del área de evaporadores.

### **3.4. Recursos materiales disponibles (equipo, cristalería, reactivos)**

Se describen los requerimientos necesarios de materia prima, cristalería y reactivos con los que se llevó a cabo la experimentación.

#### **3.4.1. Materia prima**

- Meladura
- Jugo Clarificado
- Invertasa
- Agua desmineralizada

#### **3.4.2. Reactivos**

- Ácido Fosfórico al 20 %
- EDTA al 4 %
- Fehling A y B
- Azul de metileno
- Ácido clorhídrico al 10 %
- Ácido clorhídrico al 6,34 N
- Ácido clorhídrico al 0,5 %
- Fenofaleína al 1 %
- Hidróxido de sodio al 2N

### **3.4.3. Instrumentos de medición**

- Balanza analítica, marca Mettler Toledo, modelo ML204
- Balanza semi – analítica, marca Mettler Toledo, modelo MS4002S
- Refractómetro de bolsillo, marca ATAGO, serie YS13530
- Termómetro digital, marca Traceable
- Cronómetro digital, marca Casio, modelo HS-3V-1
- Potenciómetro, marca Multical, modelo WTW
- Polarímetro de flujo continuo, marca Schmidt Haensch, serie 29791
- Pipeta serológica de 5 mL
- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Balones aforados de diferentes capacidades
- Buretas de diferentes capacidades

### **3.4.4. Equipo auxiliar**

- Plancha de calentamiento y agitación magnética, marca IKA, modelo C-MAG HS 7.
- Agitador magnético.
- Papel filtro de 0,85  $\mu\text{m}$ .
- Soporte universal.
- Pinzas para Erlenmeyer.
- Soportes para buretas.
- Perlas de ebullición.

### **3.4.5. Cristalería**

- *Beackers* de diferentes capacidades

- Varilla de agitación
- Pizeta
- Gotero
- Vidrio de reloj
- Espátula
- Probetas de 100 mL
- Cápsulas
- Embudos
- Corchos de diferentes capacidades
- Erlenmeyers

#### **3.4.6. Equipo de protección personal**

- Botas industriales
- Lentes de protección
- Guantes de látex
- Bata

#### **3.5. Técnica cualitativa o cuantitativa**

Para estandarizar y establecer las condiciones óptimas de operación de la enzima invertasa se realizó el análisis cuantitativo de la concentración de invertasa óptimo y grados brix, temperatura, Pol y pH de la mezcla inicial, en el rango de 4 a 8 horas de inversión, como también la obtención total de los azúcares invertidos. Como análisis cualitativo se llevó a cabo la prueba de Fehling, esta al indicar presencia de azúcares reductores pasó de un color azul a rojo ladrillo, dicho análisis se realizó mediante el método ICUMSA GS4/3-3

(2007)<sup>19</sup> para los azúcares reductores y el método “ICUMSA GS4/3-7 (2011), para los azúcares reductores totales.

### **3.5.1. Medición de grados brix**

Se describe el procedimiento para la medición de grados brix, utilizando el refractómetro de bolsillo marca ATAGO.

#### **3.5.1.1. Procedimiento**

- Se lavó el prisma del refractómetro con abundante agua desmineralizada y se secó.
- Se agregó agua desmineralizada hasta cubrir el prisma y se comprobó que diera una lectura de cero.
- Se agregó cada una de las mezclas iniciales hasta cubrir el prisma, luego se tapó y tomó la lectura de brix.

### **3.5.2. Medición de Pol**

Se describe el procedimiento para la medición de pol, utilizando el polarímetro de flujo marca Schmidt Haensch.

#### **3.5.2.1. Procedimiento**

- Se realizó la disolución 1:1 de mezclas iniciales / agua en *beacker* de 100mL.
- Se agitó para obtener una mezcla homogénea.

---

<sup>19</sup> ICUMSA. *Libro de métodos 2007*. <https://www.yumpu.com/es/document/view/395788/libro-de-metodos-icumsa-2007>. Consulta: 20 de abril de 2020.

- Se dejó enfriar a  $20 \pm 2$  °C.
- Se pesó 26g de muestra en la cápsula y luego se trasladó a un balón de 100 mL y se aforó.
- Se colocó un corcho en la boquilla del balón y se agitó.
- Se trasladó la muestra a *beaker* de 100mL y se le agregó 1 gramo de octapol.
- Se agitó hasta que el octapol se disolvió completamente.
- Se filtró la mezcla con papel filtro de 0,85  $\mu\text{m}$ .
- Se trasladó la muestra al polarímetro de flujo continuo y se tomó la lectura de Pol.

### **3.5.3. Medición de azúcares reductores**

Luego de que la miel invertida se concentró en un rango de 80 – 83°Brix, se procedió al conteo de azúcares reductores y azúcares reductores totales obtenidos, mediante los métodos ICUMSA GS4/3-3 (2007) e ICUMSA GS4/3-7 (2011). Al tener dichos valores se procedió a determinar la cantidad de sacarosa química obtenida por medio de la diferencia de azúcares reductores totales y azúcares reductores, multiplicada por 0,95, luego se determinó el porcentaje de azúcares totales encontrados con la suma de la sacarosa química obtenida y los azúcares reductores.

#### **3.5.3.1. Método ICUMSA GS4/3-3 (2007)**

Este método determina los azúcares reductores contenidos en miel de caña invertida y ciertos jarabes refinados con el procedimiento de volumen constante, que procedió de la siguiente forma:



- Para el titulante se agregó 8g de miel invertida en una cápsula y se añadió agua desmineralizada a manera de disolver la muestra.
- Se trasvasó la solución a un balón de 200 mL, se aforó y agitó hasta homogeneizar la solución.
- Se tomó una alícuota de 100 mL de muestra y se trasvasó a un balón aforado de 250 mL y se guardó el resto de muestra para el método ICUMSA GS4/ 3-7 (2011).
- Se agregó al balón 15 mL de EDTA al 4 %, luego se aforó a 250 mL y se homogeneizó.
- Para el analito se prepararon 3 erlenmeyers con 20 mL de Fehling A y B cada uno.
- Se agregó una cucharadita de perlas de ebullición y un magneto a cada Erlenmeyer.
- Se preparó una bureta de agua y otra con la solución.
- Se calentó la plancha a 70 °C.

#### **3.5.3.1.1. Primera titulación**

- Se colocó un erlenmeyer en la plancha caliente y se agitó
- Se tituló 10 mL de la muestra y se detuvo la agitación al iniciar ebullición y presenciar un cambio de color en el analito de azul a rojo ladrillo.
- Se agregó 4 gotas de azul de metileno.
- Se inició de nuevo la agitación y se tituló la muestra con un goteo más lento hasta que se observó de nuevo un cambio de color de azul a rojo ladrillo.
- Se anotó el volumen gastado y se quitó el erlenmeyer de la plancha con ayuda de unas pinzas.
- Se neutralizó la solución contenida en el erlenmeyer con ácido clorhídrico (HCL) al 10 %, y se añadió agua hasta lavarse.

- Finalmente, con un colador se retiraron las perlas de ebullición y el magneto.

### 3.5.3.1.2. Segunda titulación

- Se aforó nuevamente la bureta con muestra y se añadió al siguiente erlenmeyer el volumen de agua determinado por la siguiente ecuación:

$$V_{agua2} = (V1 + VFehling - FI1) \quad (\text{Ecuación No.1})$$

Donde:

$V_{agua2}$  = volumen de agua para titulación 2 (mL).

$V1$  = volumen gastado en titulación 1 (mL).

$VFehling$  = volumen añadido de Fehling A y B (mL).

$FI1$  = factor ICUMSA 1 para 2da titulación (73).

- El volumen de muestra por agregar en el erlenmeyer se determinó con la siguiente ecuación:

$$V_{muestra} = V1 - 2mL \quad (\text{Ecuación No.2})$$

Donde:

$V_{muestra}$  = volumen de agua para titulación 2 (mL).

$V1$  = volumen gastado en titulación 1 (mL).

- Se detuvo la agitación al iniciar ebullición observar cambio de color de azul a rojo ladrillo.
- Se cronometraron 2 minutos y luego se añadió 4 gotas de azul de metileno.

- Se agitó la muestra y se tituló hasta observar nuevamente un cambio de color.
- Se anotó el volumen gastado.
- Se neutralizó la solución contenida en el erlenmeyer con ácido clorhídrico (HCL) al 10 %, y se añadió agua hasta lavarse.
- Finalmente, con un colador se retuvieron las perlas de ebullición y el magneto.

### 3.5.3.1.3. Tercera titulación

- Se aforó nuevamente la bureta de agua y la de mezcla
- Se añadió al siguiente erlenmeyer la cantidad de agua determinado en la siguiente ecuación:

$$V_{agua3} = (V_2 + V_{Fehling} - FI_2) \quad (\text{Ecuación No.3})$$

Donde:

$V_{agua3}$  = volumen de agua para titulación 3 (mL).

$V_2$  = volumen gastado en titulación 2 (mL).

$V_{Fehling}$  = volumen añadido de Fehling A y B (mL).

$FI_2$  = factor ICUMSA 2 para 3era titulación (74,5).

- Para el volumen de muestra a agregar se aplicó la siguiente ecuación:

$$V_{muestra} = V_2 - 1mL \quad (\text{Ecuación No.4})$$

Donde:

$V_{muestra}$  = volumen de agua para titulación 2 (mL).

V2 = volumen gastado en titulación 2 (mL).

- Se detuvo la agitación, al iniciar la ebullición y observar un cambio de color de azul a rojo ladrillo.
- Se cronometró 2 minutos y luego se añadió 4 gotas de azul de metileno.
- Se continuó con la agitación y se tituló hasta observar nuevamente un cambio de color.
- Se anotó el volumen gastado.
- Se neutralizó la solución contenida en el erlenmeyer con ácido clorhídrico (HCL) al 10 %, y se añadió agua hasta lavarse.
- Finalmente, con un colador se retiraron las perlas de ebullición y el magneto.

El volumen gastado en la 3era titulación es el que se utilizó para determinar los azúcares reductores obtenidos, empleando la siguiente ecuación:

$$\%AR = \frac{10,000 * F}{T * C} \quad (\text{Ecuación No. 5})$$

Donde:

%AR = porcentaje de azúcares reductores (%).

F = factor de sacarosa

T = volumen gastado en titulación 3 (mL).

C = concentración de la muestra en solución (g/L).

Tabla III. **Factores de sacarosa**

<b>g de sacarosa presente en volumen final de titulación</b>	<b>Factor (F)</b>
0,0	1,000
0,5	0,988
1,0	0,975
2,0	0,950
3,0	0,934
4,0	0,917
5,0	0,906
6,0	0,894
7,0	0,884
8,0	0,874
9,0	0,865
10,0	0,856

Fuente: elaboración propia, empleando el Método ICUMSA GS4/ 3-3 (2007).

### **3.5.3.2. Método ICUMSA GS4/3-7 (2011)**

Este método determina los azúcares reductores totales contenidos en miel de caña invertida y ciertos jarabes refinados con el procedimiento de volumen constante, que procedió de la siguiente forma:

- De la solución inicial preparada en el método ICUMSA GS4/3-3 (2007), se tomó una alícuota de 25 mL de muestra y se trasvasó a un balón aforado de 250 mL.

- En el mismo balón se agregó 5 mL de HCL al 6,34 % y se trasladó a baño maría a 60 °C.
- Se agitó la muestra por 3 minutos hasta homogeneizar la muestra.
- Se dejó reposar la muestra por 12 minutos en baño maría.
- Se enfrió la muestra a 20 ±2 °C y luego en el mismo balón se añadió 95mL de agua desmineralizada y 3 gotas de fenolftaleína al 1,0 %.
- En el mismo balón se añadió de gota en gota NaOH al 2N hasta que la muestra se tornó de color rojo.
- Luego se añadió de gota en gota HCl al 0,5 % hasta desvanecer el color.
- Por último, se agregó en el balón 2 mL de EDTA al 4,0 % y se aforó.

El procedimiento de las titulaciones se realizó de la misma forma que en el método ICUMSA GS4/3-3 (2007). Los azúcares reductores totales obtenidos se determinaron mediante la siguiente ecuación:

$$\%ART = \frac{1000}{C * T} \quad (\text{Ecuación No.6})$$

Donde:

%ART = azúcares reductores totales (%)

C = concentración de la solución sometida a ensayo de miel (g/100 mL).

T = volumen gastado en titulación 3 (mL)

Luego, se determinó la sacarosa química obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$SQ = (ART - AR) * 0,95 \quad (\text{Ecuación No.7})$$

Donde:

SQ = sacarosa química (%)

ART = azúcares reductores totales (%)

AR = azúcares reductores (%)

Finalmente se determinaron los azúcares totales obtenidos mediante la siguiente ecuación:

$$\%AT = AR + SQ \quad (\text{Ecuación No.8})$$

Donde:

%AT = azúcares totales obtenidos (%)

AR = azúcares reductores (%)

SQ = sacarosa química (%)

### **3.6. Recolección y ordenamiento de datos**

A continuación, se describe el análisis utilizado en cada una de las variables experimentales.

#### **3.6.1. Análisis de grados Brix**

La meladura se tomó de la salida del vaso melador, que se encuentra en un rango de operación estándar entre 60 – 66 °Bx.

Se verificó si realmente es influyente el brix en términos del Pol obtenido a lo largo del tiempo de hidrólisis. Para disminuir el brix de la mezcla inicial ya sea a 55 o 60 °Bx, se dosificó jugo claro, que trabaja en un rango de operación estándar entre 11 – 14 °Bx.

- El refractómetro de bolsillo, marca ATAGO, serie YS13530., está diseñado para la medición de brix en muestras de hasta 100 °C y 93 °Bx, por lo que no fue necesario realizar una dilución de la muestra ni enfriarla.

### **3.6.2. Concentración de la enzima invertasa**

A condiciones estándar de fábrica se le añaden 20 kg de invertasa (lo equivalente a 1 saco), diluida en agua potable, a 40 000 galones de mezcla inicial, lo cual representa a escala laboratorio a 0,066g de invertasa por 500 mililitros de mezcla inicial, se estudió el efecto del Pol en la hidrólisis enzimática al trabajar con diferentes concentraciones de invertasa. Se procedió a trabajar a concentraciones de 0,80 y 1 saco, que equivale a (0,053 y 0,066), g invertasa en 500 mililitros de mezcla inicial.

### **3.6.3. Análisis de temperatura de la mezcla inicial**

Al obtener la mezcla inicial de meladura – jugo claro al brix deseado, se procedió a evaluar el impacto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de la sacarosa, misma que a condiciones estándar se trabaja a 50 °C, por lo que se procedió a trabajar a temperaturas de 50 y 55 °C.

### **3.6.4. Análisis de pH**

El pH estándar utilizado en el procedimiento es de 5,5, y se procedió a evaluar el Pol obtenido en función de la variación de pH, siendo estos fijados en 5,5 y 6,0 porque al determinarse que no fuese influyente esto representaría un ahorro en el flujo volumétrico de ácido fosfórico a utilizar.



### 3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Debido a que el número de combinaciones posibles es elevado al tener múltiples variables con distintos valores se eligió utilizar un diseño factorial de Plackett-Burman, que reduce y fracciona el número estricto de ensayos, mismo que cubre todas las posibles combinaciones siendo estas menos sensibles a los factores aleatorios (o ruidos).

Se analizó cuatro variables con dos valores de incidencia cada uno, haciendo un total de dos repeticiones, para ello se acomodó el arreglo de matriz ortogonal ( $2^4$ ). Este arreglo se utilizó para cada concentración de sustrato planteado, se procedió a controlar las horas de inversión propuestas y al cumplir dichas horas se inició con la concentración del sustrato a temperaturas altas, no mayores de 90 °C, para evitar reacciones secundarias, hasta que finalmente alcanzó un brix entre 80 – 83°Bx, para desnaturalizar la enzima y así analizar los azúcares reductores y totales obtenidos en función del tiempo.

Tabla IV. **Variables y valores por utilizar en cada mezcla inicial**

Variables	Valores	
	1	2
Temperatura (°C)	50	55
Concentración invertasa (g/ L muestra)	0,053	0,066
Brix	55	60
pH	5,5	6

Fuente: elaboración propia.

Tabla V. **Matriz ortogonal resultante**

<b>Factores asignados</b>				
<b>No. experimentos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Concentración de la invertasa (g enzima / 0,5L muestra)</b>	<b>Brix inicial</b>	<b>pH</b>
1	2	2	2	1
2	2	2	2	1
3	2	2	1	2
4	2	1	2	2
5	2	2	1	2
6	2	1	2	1
7	1	2	1	2
8	1	1	1	2
9	1	1	2	2
10	1	2	2	1
11	1	1	2	1
12	1	1	2	2
13	2	1	2	2
14	2	2	2	2
15	2	1	2	1
16	2	2	2	2
17	2	1	1	2
18	1	1	1	1
19	1	2	1	2
20	1	1	1	1
21	2	2	1	1
22	1	2	2	1
23	2	1	1	2
24	1	2	1	1
25	2	1	1	1
26	2	1	1	1
27	1	1	2	1
28	2	2	1	1
29	1	2	1	1
30	1	2	2	2
31	1	2	2	2
32	1	1	1	2

Fuente: elaboración propia.

### 3.7.1. Procesamiento de la información

A continuación, se muestra el resultado de la matriz ortogonal obtenida utilizando el diseño factorial de Plackett-Burman.

Tabla VI. Sustitución de datos en matriz ortogonal resultante

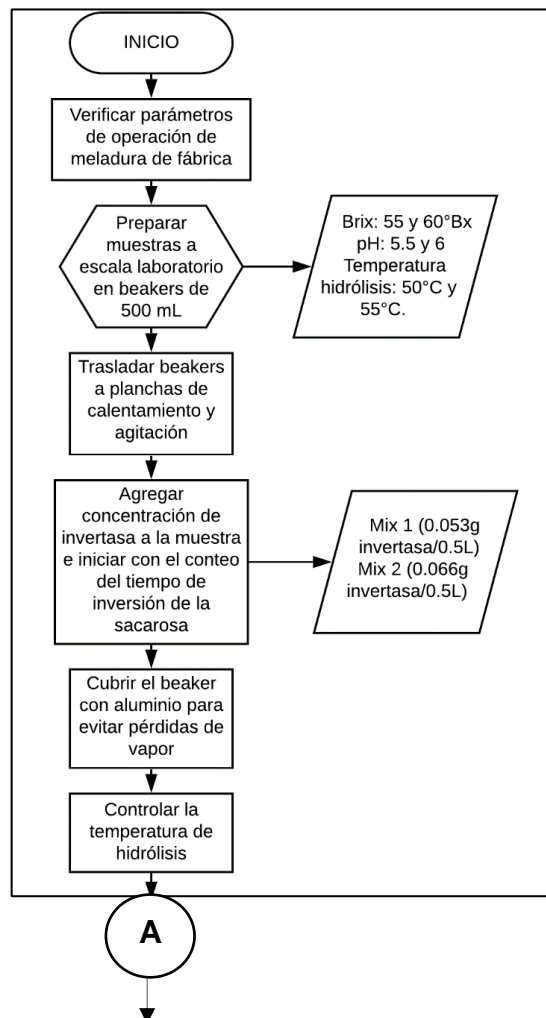
No.	Temperatura (°C)	Concentración enzima (g enzima/ 0,5L muestra)	Brix	pH
1	55	0,066	60	5,5
2	55	0,066	60	5,5
3	55	0,066	55	6,0
4	55	0,053	60	6,0
5	55	0,066	55	6,0
6	55	0,053	60	5,5
7	50	0,066	55	6,0
8	50	0,053	55	6,0
9	50	0,053	60	6,0
10	50	0,066	60	5,5
11	50	0,053	60	5,5
12	50	0,053	60	6,0
13	55	0,053	60	6,0
14	55	0,066	60	6,0
15	55	0,053	60	5,5
16	55	0,066	60	6,0
17	55	0,053	55	6,0
18	50	0,053	55	5,5
19	50	0,066	55	6,0
20	50	0,053	55	5,5
21	55	0,066	55	5,5
22	50	0,066	60	5,5
23	55	0,053	55	6,0
24	50	0,066	55	5,5
25	55	0,053	55	5,5
26	55	0,053	55	5,5
27	50	0,053	60	5,5
28	55	0,066	55	5,5

Continuación de la tabla VI.

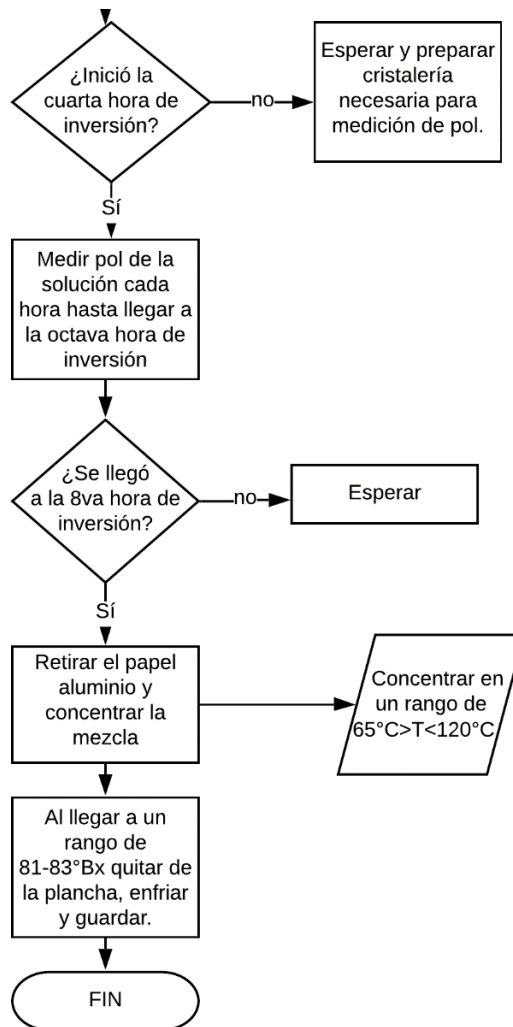
<b>29</b>	50	0,066	55	5,5
<b>30</b>	50	0,066	60	6,0
<b>31</b>	50	0,066	60	6,0
<b>32</b>	50	0,053	55	6,0

Fuente: elaboración propia.

Figura 8. **Diagrama de flujo del proceso de hidrólisis enzimática a escala laboratorio**



Continuación de la figura 8.



Fuente: elaboración propia, empleando Visio 2019.

### 3.8. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizará mediante métodos gráficos y estadísticos, en los cuales se podrán determinar las condiciones óptimas de operación de la enzima, como también identificar las variables más influyentes

para la mayor obtención de azúcares invertidos, y finalmente realizar una propuesta de estandarización del procedimiento.

### **3.8.1. Análisis de un diseño factorial**

El análisis del diseño factorial se llevará a cabo mediante el programa estadístico Minitab 17, mismo que analizará todas las combinaciones posibles para el diseño factorial de Plackett-Burman ( $2^4$ ).

### **3.8.2. Programas para utilizar en el análisis de datos**

- Microsoft Excel 2016, en la realización de los cálculos, gráficas y análisis de varianza ANOVA.
- Microsoft Word 2016, en la edición y redacción de la interpretación de datos.
- Minitab 19, para análisis estadísticos.



## 4. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del diseño experimental con relación a la determinación de las condiciones óptimas del proceso de hidrólisis enzimática de la sacarosa a escala laboratorio.

### 4.1. Determinar que arreglo factorial obtiene mayor rendimiento hidrolítico de azúcares reductores totales

En la Tabla VII se muestran los arreglos factoriales con mayor rendimiento hidrolítico, luego de realizadas las 32 corridas experimentales.

Tabla VII. **Arreglos factoriales resultantes con mayor rendimiento hidrolítico de azúcares reductores totales a las concentraciones de 0,053 y 0,066 (g/ 0,5 L muestra) respectivamente**

No. Corrida	Temperatura (°C)	Concentración enzima (g/0,5 L muestra)	Brix (°Bx)	pH	Pol final	Tiempo inversión (h)	SQ	%AT
26	55	0,053	55	5,5	10,4	8,0	24,3	70,6
29	50	0,066	55	5,5	5,02	7,0	3,22	76,8

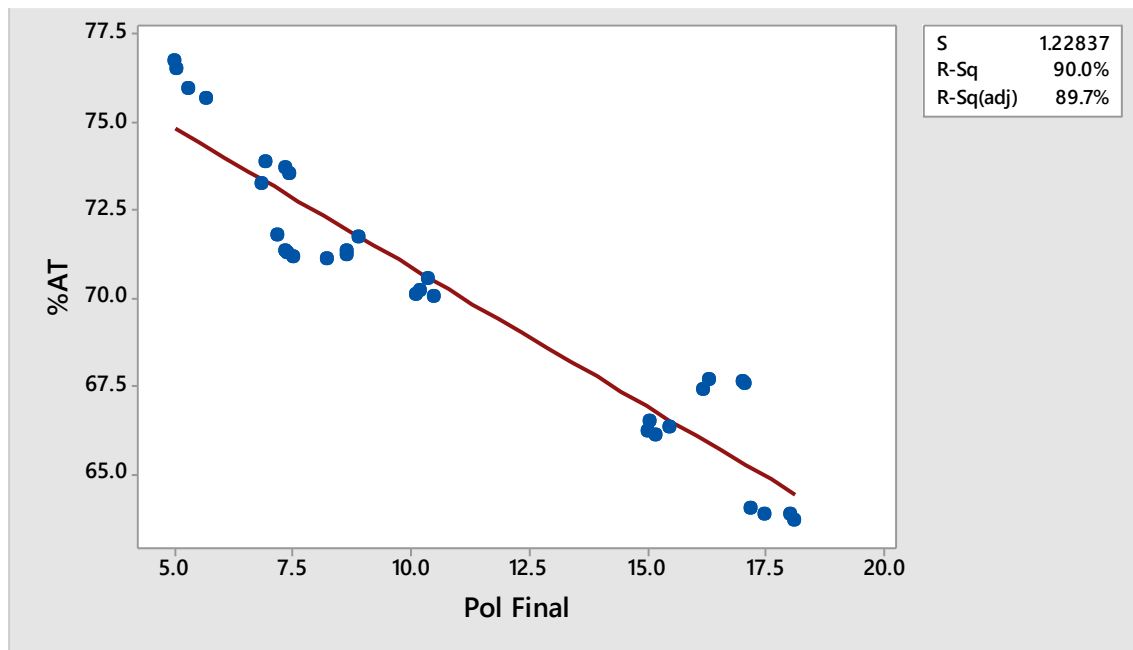
Fuente: elaboración propia.



**4.2. Elaborar una correlación que se ajuste a la tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la solución**

En la figura 9 se muestra la tendencia lineal del porcentaje de azúcares reductores totales en función del pol final de la solución invertida.

Figura 9. **Gráfica de tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la solución**



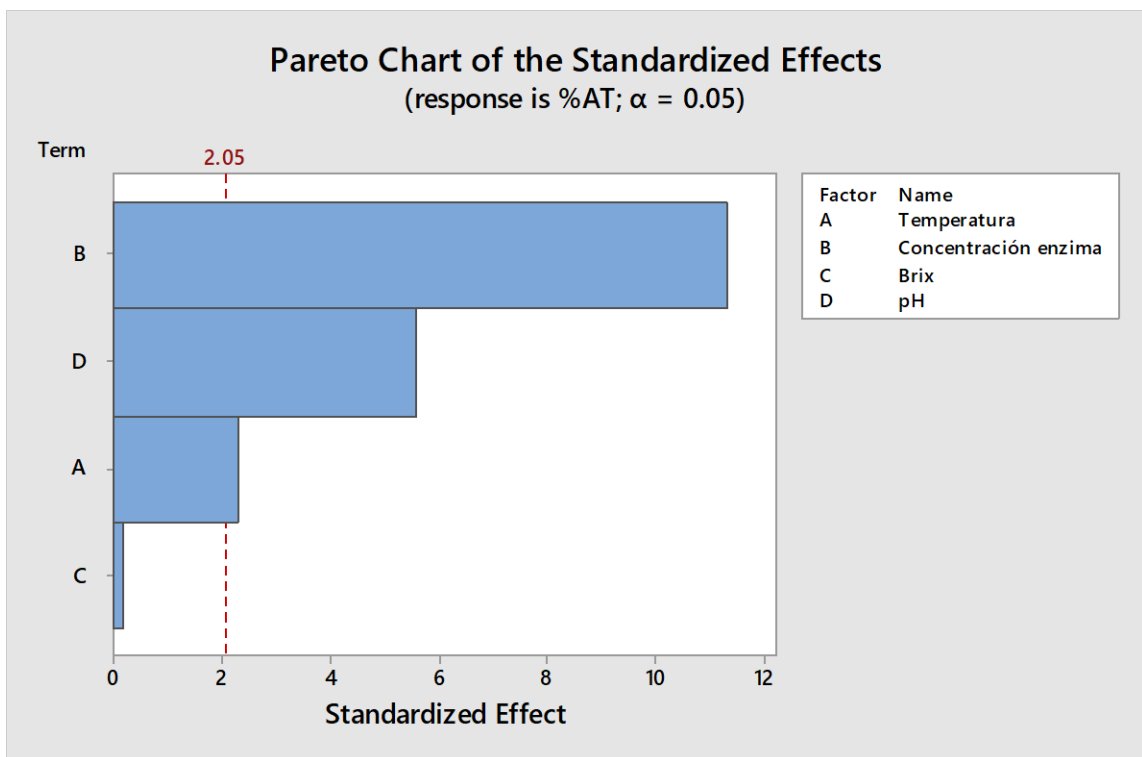
Color	Ecuación	Rango	R2
	$\%AT = 78,8 - 0,794PF$	[5,02 – 18,1] Pol	90,0 %

Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 17.

#### 4.3. Evaluar mediante un diseño factorial la influencia de cada factor de operación en función de los azúcares reductores totales obtenidos

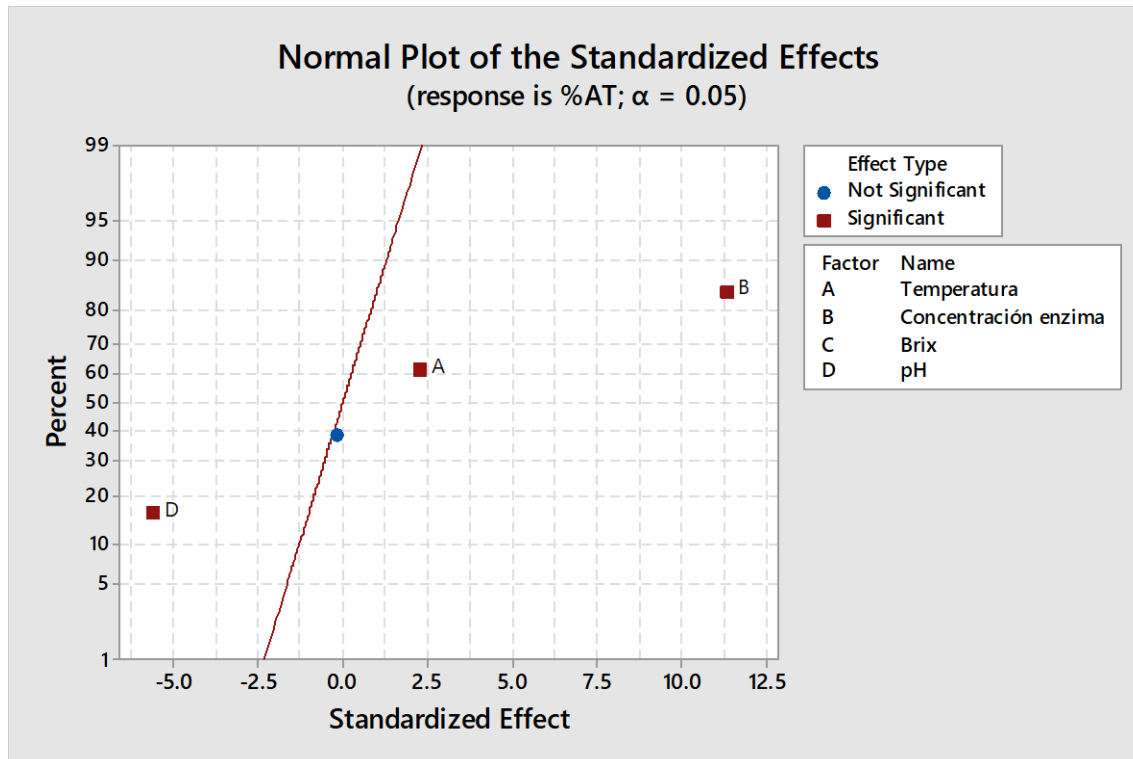
Utilizando el Diagrama de Pareto se determinó cuáles de los factores eran influyentes para la obtención de azúcares reductores totales obtenidos.

Figura 10. **Diagrama de Pareto para la determinación de la influencia de cada factor en función de los azúcares reductores totales obtenidos**



Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 17.

Figura 11. Factores estadísticamente significativos en función de los azúcares reductores totales obtenidos



Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 17.

Tabla VIII. Resultado de las pruebas de hipótesis

Coded Coefficients						
Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		70.057	0.272	257.20	0.000	1.00
Temperatura	1.245	0.623	0.272	2.29	0.030	1.00
Concentración enzima	6.166	3.083	0.272	11.32	0.000	1.00
Brix	-0.096	-0.048	0.272	-0.18	0.862	1.00
pH	-3.034	-1.517	0.272	-5.57	0.000	1.00

Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 17.

#### 4.4. Elaborar una documentación que contenga el procedimiento del proceso de hidrólisis enzimática a nivel laboratorio





En la tabla IX se describe el instructivo para el proceso de hidrólisis enzimática a nivel laboratorio.

Tabla IX. Instructivo de operación, página 1

LOGO DE LA COMPAÑÍA	<b>Instructivo de Operación producción de High Test Molasses HTM a escala laboratorio</b>		<b>Código: U-I-PE-LAB</b>
			<b>Fecha:</b>
			<b>Edición: 01</b>
			<b>Página 1/4</b>
Proceso: Producción de Edulcorantes	Subproceso: Recuperación Sacarosa	Operación: producción de HTM	
<b>Objetivo general: estandarizar la operación de producción de HTM a escala laboratorio y verificar que cumpla con los requerimientos de calidad.</b>			
<b>Procedimiento <i>high test molasses</i> (HTM) a escala laboratorio</b>			
<b>DESARROLLO</b>			
La meladura clarificada es preparada para tener las condiciones ideales de temperatura y acidez al realizar la inversión de la misma, por medio de la hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa. Luego, se concentra la meladura invertida hasta el brix requerido. Seguidamente, el HTM debe pesarse por medio de la balanza analítica y finalmente esperar a que se enfríe para ser almacenada.			
<b>Parámetros de operación</b>			
1	Temperatura de lechada de invertasa: 50-60 °C		
2	Temperatura de inversión: 50-60 °C		
3	pH inversión: 5,5		
4	Horas de inversión: 7-8h		
5	Brix refractométrico de concentración: 83°Bx		
6	Temperatura enfriado de HTM: 25°C		
<b>Equipo</b>			
1	Polarímetro de flujo continuo, marca: Schmidt Haensch, serie: 29791		
1	Plancha de calentamiento, marca: IKA, serie: C-MAG HS 7		
1	Balanza semi analítica, marca: Mettler Toledo, serie: MS4002S		
1	Balanza analítica, marca: Mettler Toledo, serie: ML204		
1	Potenciómetro, marca: MultiCal		
1	Refractómetro, serie: YS13530		



Fuente: elaboración propia.

Figura 12. Instructivo de operación, página 2

LOGO DE LA COMPAÑÍA		Instructivo de operación producción de <i>High Test Molasses</i> HTM a escala laboratorio		Código: U-I-PE-LAB	
				Fecha:	
				Edición: 01	
				Página 2/4	
Proceso: Producción de Edulcorantes		Subproceso: Recuperación Sacarosa	Operación: producción de HTM		
No.	Secuencia de operación (Qué)	Puntos Clave -(Cómo)-	Razones -(Por qué)-	Responsable	Ilustraciones
<b>1 Preparación de muestra de meladura a invertir</b>					
1.1	Tomar muestra de meladura y jugo clarificado de fábrica	Tomar al menos 1 L de meladura del toma muestra ubicado a la salida del 5to efecto y 0,5 L de jugo clarificado y trasladarlo al laboratorio	Se procede también a tomar muestra de jugo clarificado para regular el pH de la meladura si en dado caso esta llega a estar con pH mayor al requerido.	Analista de laboratorio	
1.2	Medir pH	Trasvasar muestra de meladura a un <i>beaker</i> de 1 000 mL y colocarlo en una plancha de agitación y calentamiento a 50 °C, luego introducir el electrodo del potenciómetro en la muestra.	Para cuantificar la acidez de la muestra.	Analista de laboratorio	
1.3	Regular pH	Si la lectura de pH fue mayor a 5,5, aumentar la agitación y dosificar pequeñas cantidades de jugo clarificado hasta llegar al parámetro de calidad solicitado.	Se aumenta la agitación para lograr una mezcla homogénea y que la lectura de pH de la muestra sea confiable.	Analista de laboratorio	
1.4	Preparación lechada de invertasa	Dosificar la cantidad de enzima según la escala que se utilice a nivel fábrica y diluirla en agua. ** Si se utiliza 1 saco de enzima por 40 000 gal mezcla, utilizar en laboratorio la dilución de 0,066g enzima en 2mL agua, para 1 L de muestra.	Para preparar la lechada de invertasa necesaria para convertir de sacarosa a azúcares reductores.	Analista de laboratorio	






Fuente: elaboración propia.

Figura 13. Instructivo de operación, página 3

LOGO DE LA COMPAÑÍA		Instructivo de operación producción de High Test Molasses HTM a escala laboratorio			Código: U-I-PE-LAB	
					Fecha:	
					Edición: 01	
					Página 3/4	
Proceso: Producción de edulcorantes		Subproceso: Recuperación sacarosa	Operación: producción de HTM			
No.	Secuencia de operación (Qué)	Puntos clave -(Cómo)-	Razones -(Por qué)-	Responsable	Ilustraciones	
<b>2 Operación</b>						
2.1	Muestra en etapa de inversión	Introducir la lechada de invertasa preparada previamente en la muestra de meladura, anotar la hora.	Para iniciar la inversión de la muestra.	Analista de laboratorio		
2.2		Dejar una velocidad media de agitación a la temperatura solicitada, luego cubrir el beaker de muestra con aluminio.	Para evitar que se pierda material por evaporación.	Analista de laboratorio		
2.3	Lectura de Pol	Pasadas las 5 horas de inversión iniciar a tomar cada hora, una alícuota de muestra en relación 1:1 y homogeneizarla.	Para parametrizar el valor de pol real en la muestra	Analista de laboratorio		
2.4		De la alícuota anterior tomar 26 g de muestra en una cápsula de aluminio, luego depositarlo en un balón aforado de 100 mL, aforar y agitar hasta homogeneizar la muestra.		Analista de laboratorio		
2.5		Trasladarlo a un beaker de 250 mL y agregar 1 g de octapol hasta que este se disuelva completamente.		Analista de laboratorio		
2.6		Filtrar muestra con papel filtro de 0,85 µm, y trasladarlo al polarímetro de flujo continuo para la medición de pol y anotarlo.		Analista de laboratorio		

Fuente: elaboración propia.

Figura 14. Instructivo de operación, página 4

LOGO DE LA COMPAÑÍA		Instructivo de operación producción de <i>High Test Molasses</i> HTM a escala laboratorio			Código: U-I-PE-LAB	
					Fecha:	
					Edición: 01	
					Página 4/4	
Proceso: Producción de edulcorantes		Subproceso: Recuperación sacarosa	Operación: producción de HTM			
No.	Secuencia de operación (Qué)	Puntos Clave -(Cómo)-	Razones -(Por qué)-	Responsable	Ilustraciones	
2,7	Lectura de Pol	Realizar lecturas de pol en la muestra hasta que tenga un pol menor a 7.	Para garantizar un mayor porcentaje de rendimiento en azúcares reductores.	Analista de Laboratorio		
2,8	Concentración de la muestra	Luego de llegar al pol requerido, se procede a concentrar la muestra, para lo cual se coloca el <i>beacker</i> en una plancha con agitación constante, se eleva la temperatura de 80-85 °C y se monitorea el brix con el refractómetro de bolsillo hasta llegar a 81-83 °Bx.	Para garantizar una correcta concentración de la muestra sin temperaturas mayores a 90 °C, para evitar destruir los azúcares reductores formados.	Analista de Laboratorio		
2,9	Pesaje y envasado de la muestra	Trasladar a un recipiente con tapa (con peso conocido) la miel invertida y proceder a pesarla con una balanza analítica. Restando el peso del recipiente y tapa para determinar únicamente el peso de la miel.	Para determinar la la cantidad de miel invertida obtenida.	Analista de Laboratorio		
2,10	Enfriamiento y almacenaje de la muestra	Enfriar la muestra a temperatura ambiente, y luego almacenarla en un lugar fresco.	Para garantizar que la miel invertida no se siga concentrando al tener elevadas temperaturas.	Analista de Laboratorio		
2,11	Pruebas de control de calidad	Luego de tener la miel invertida a temperatura ambiente se procede a realizar los análisis correspondientes a la calidad del producto.	Para garantizar que la miel invertida se encuentre entre los rangos de % AT, cenizas, pol correspondientes	Analista de Laboratorio		

Fuente: elaboración propia.

## 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de este diseño de investigación consiste en la estandarización del proceso de producción de miel invertida, a las condiciones óptimas de la enzima invertasa, a fin de aprovechar al máximo su actividad en la hidrólisis enzimática.

Este proceso se realizó a escala laboratorio para lograr condiciones de trabajo más controladas, sin embargo, se realizó la relación de conversión de la concentración de enzima y meladura utilizadas a escala fábrica para su posterior replicación.

Por medio del diseño factorial de Plackett-Burman se determinó que el número de ensayos estadísticamente representativos para las 4 variables (temperatura, concentración enzima, brix, pH), y 2 valores era de 16, con una repetición, para dar un total de 32 ensayos.

En la tabla VII, se encuentran los arreglos factoriales resultantes con mayor rendimiento de azúcares totales finales, a las diferentes concentraciones de enzima utilizadas, en esta se observó que la concentración de enzima es uno de los factores más significativos para la recuperación de azúcares totales, puesto que, en el ensayo 29 se trabajó con una menor interacción de calor con respecto al ensayo 26, y a pesar de ello, el tiempo de inversión concluyó una hora antes y recuperando un 6,19 % más de azúcares. Se observó que para ambos ensayos se obtuvo mejores resultados utilizando un pH de 5,5.



Para que una muestra de miel invertida sea aceptada, esta debe estar en un rango de 80 – 83 °Bx y un porcentaje de AT  $\geq 70$  %, en la tabla VII se observó que únicamente las corridas realizadas con una concentración de enzima de 0,066 g/0,5L muestra, se encuentran en el límite permisible de porcentaje de azúcares totales al utilizar un pH de 6, y se podría evaluar el economizar el uso del ácido fosfórico en la preparación del material a invertir, o bien, trabajar con la misma dosificación de ácido pero a su vez, asegurar el cumplimiento del requerimiento de azúcares totales en el producto final.

En esta misma tabla se observó que en las corridas donde se utilizó la concentración menor de enzima, únicamente cumplen con la especificación de azúcares totales aquellas en las cuales se dosificó mayor cantidad de ácido fosfórico y utilizó mayor temperatura, por lo que no se recomienda trabajar con esta concentración de enzima, porque se compromete mucho la calidad del producto al no cumplir con los requerimientos solicitados, adicionalmente que la temperatura es un factor difícil de controlar y mantener constante.

En la figura 9, se encuentra la tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la solución, en ella se observa un comportamiento inversamente proporcional, es decir que, a menor valor de Pol en la muestra, mayor porcentaje de azúcares totales se obtendrá. Se analizó que con valores de Pol en el rango de 7 a 10, el porcentaje de azúcares totales se encuentra dentro de la especificación requerida (AT  $\geq 70$  %).

El valor de S representa la desviación estándar, la cual indica que tan dispersos se encuentran los datos alrededor de la media, para este modelo, se obtuvo una desviación de 1,23 es decir, bastante ajustados al valor promedio. También se observó que el modelo se ajusta bastante bien a los datos, dado que obtuvo un valor de  $R^2$  de 90,0 %, por ende, el modelo predice con

bastante precisión el porcentaje de azúcares totales obtenidos en el rango de 5,02 – 18,1 Pol.

El objetivo principal de esta gráfica fue proporcionar un modelo que predijera con bastante precisión el valor del porcentaje de azúcares totales obtenidos en la mezcla que se está invirtiendo, y así garantizar que esta cumplirá con las especificaciones requeridas y a su vez, reducir el tiempo de inversión al saber que ya se encuentra dentro del rango, sin necesidad de esperar los resultados que proporcionen los métodos ICUMSA.

En la figura 10, se determinó la influencia de cada factor de operación (temperatura, brix, pH, concentración de enzima) en función de los azúcares totales obtenidos, por medio de un diagrama de Pareto, que muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados, desde el efecto más influyente hasta el menos influyente, dicho diagrama muestra una línea de referencia brindada por el nivel de significancia estadística, lo que indica que los factores ubicados antes de esta línea de referencia, no son estadísticamente significativos en el nivel de 0,05, en este caso el único factor que resultó no significativo fue el brix, esto indica que la concentración de grados brix que obtenga la muestra a invertir, no afecta en el porcentaje de azúcares totales que se puedan obtener.

Otro factor que resultó mínimamente significativo fue la temperatura, porque se encuentra cerca de la línea de referencia, la cual se comprobó que fue influyente únicamente en las corridas realizadas a menor concentración de enzima, puesto que, al utilizar la concentración mayor de enzima, la temperatura no fue influyente en el resultado. Dicho diagrama ubicó como los factores más influyentes para la obtención de azúcares totales a la concentración utilizada de enzima y al pH.

En la figura 11, se encuentra la gráfica normal de los efectos estandarizados, y se encuentran las probabilidades o porcentajes en función de los efectos estandarizados.

Dicha gráfica indica la magnitud, importancia y dirección de los factores, la línea roja representa a una distribución normal, los factores ubicados a la izquierda de esta línea, representa a los factores estandarizados negativos, donde únicamente se encontró el pH, es decir que, cuando el pH aumente en la muestra a invertir, el porcentaje de azúcares totales obtenidos disminuirá, y se sabe también que la enzima invertasa trabaja mejor en ambientes ácidos en el rango de 5 - 6 de pH.

Los factores estandarizados positivos se ubican del lado derecho de la línea roja de distribución normal, representan a los factores que son directamente proporcionales con el porcentaje de azúcares totales, en este caso siendo más influyente la concentración de la enzima, seguidamente de la temperatura.

En la tabla VIII, se encuentra el resultado de las pruebas de hipótesis planteadas, donde se comparó el valor p con el nivel de significancia (5 %), para determinar si las variables de temperatura, concentración de la enzima, brix y pH influyen en la obtención de azúcares reductores totales, donde únicamente se rechaza la hipótesis nula para el brix, dado que presenta un valor p de 0,862 que es mayor que el valor crítico 0,05, esto indica que la media de los azúcares reductores totales no varían en función de esta variable, y no es un valor estadísticamente significativo, por lo que convendría ajustar nuevamente el modelo experimental sin esta variable, caso contrario de las variables temperatura, concentración de enzima y pH, donde la recuperación de azúcares reductores totales sí se ve influenciada por estos valores y son estadísticamente significativos.

En la tabla IX y en las figuras 12, 13 y 14, se adjuntó una propuesta de documentación sobre el proceso estandarizado de la elaboración de mieles invertidas a escala laboratorio, utilizando un lenguaje claro y conciso, en el que se enlistó cada paso del proceso, utilizando los valores de pH y concentración de enzima en donde se encontró mayor recuperación de azúcares reductores totales.



## CONCLUSIONES

1. Se determinó que para lograr rendimientos hidrolíticos de azúcares totales mayores del 70 % a escala laboratorio, es necesario utilizar una concentración de enzima de 0,066 gramos por cada medio litro de muestra a invertir, con un pH de 5,5 y un tiempo de inversión de aproximadamente siete horas.
2. Se determinó que el modelo matemático:  $\%AT = 78,8 - 0,794 \text{ Pol}$  se ajusta a la tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la muestra, el cual se cumple en el rango de 5,02 a 18,1 de Pol, con un coeficiente de correlación del 90,0 %.
3. Por medio del diagrama de Pareto se concluyó que los factores con mayor influencia estadística fueron la concentración de enzima utilizada y el pH de la muestra a invertir, mientras que la temperatura resultó influyente en una proporción menor. Esto es sumamente favorable, debido a que por lo general la temperatura es una variable que presenta dificultades para ser controlada con precisión. Así mismo, el brix se quedó como el único factor con una influencia no significativa.
4. Se elaboró una propuesta de documentación del procedimiento de obtención de miel invertida a escala laboratorio, utilizando los parámetros encontrados con mayor recuperación de azúcares invertidos.



## RECOMENDACIONES

1. Evaluar el modelo experimental sin incluir la variable brix de la muestra a invertir, ya que se determinó que no es influyente en la obtención de azúcares reductores.
2. Evaluar la cantidad de azúcares totales obtenidos utilizando el método de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), puesto que agrega un valor con mayor certeza y precisión que al determinarse por metodología experimental ICUMSA, debido a que esta técnica no incluye el error humano ni el instrumental.
3. Monitorear la inversión de la sacarosa en términos del Pol de la muestra en períodos de tiempo más estrechos, es decir cada 15 o 30 minutos, a fin de que el modelo matemático que analiza la tendencia de azúcares reductores totales en función del Pol de la muestra prediga con mayor precisión el comportamiento de este.
4. Asegurar que al momento de concentrar la muestra invertida no sobrepase temperaturas de 90 °C, puesto que se degradarían los azúcares reductores obtenidos.





## BIBLIOGRAFÍA

1. ALLINGER, Norman., JHONSON, Carl. y LEBEL, Norman. *Química orgánica*. 2a ed. Barcelona: Reverté. S.A. 1979. 728 p.
2. ATKINS, Peter. *Las moléculas de Atkins*. Madrid: Ediciones Akal, 2007. 231 p.
3. CENGICAÑA. *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. Guatemala: Artemis Edinter, 2007. 512 p.
4. COPERSUCAR. *Processo de produção de high test molasses*. Brasil: Cooperativa de Productores de caña de azúcar y alcohol del estado de Sao Paulo LTDA. 1985. 11 p.
5. MCCABE, Warren. y SMITH, Julian. *Operaciones básicas de ingeniería química*. España: Reverté. S.A.1981. 459 p.
6. RAUTER, Amélia., VOGEL, Pierre. y QUENEAU, Yves. *Carbohydrates in Sustainable Development I*. New York: Springer, 2010. 218 p.
7. REIN, Peter. *Ingeniería de la caña de azúcar*. Berlin: Verlag Dr. Albert Bartens Kt, 2012. 872 p.

8. ROMERO VARGAS, Gissell Astrid. y REYES CUELLAR., Julia Constanza. *Hidrólisis de sacarosa por invertasa de Saccharomyces cerevisiae inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto.* [en línea]. <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-28122019000200115&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-28122019000200115&lng=en&nrm=iso&tlng=es)>. [Consulta: 06 de abril de 2020].
9. SIMÓN PÉREZ, Esther. *Modelado y simulación dinámica en ecosimpro de una estación de evaporación de la industria azucarera.* [en línea]. <[https://www.ecosimpro.com/wp-content/uploads/2015/02/C01\\_08\\_es.pdf](https://www.ecosimpro.com/wp-content/uploads/2015/02/C01_08_es.pdf)>. [Consulta: 01 de abril de 2020].
10. SONI, Ajaykumar Chhaganlal., MORE, Sandip Vishnu. y BADGUJAR, Mahesh Devidas. *Method for the preparation of high test molasses.* [en línea]. <<https://patentimages.storage.googleapis.com/d5/8b/d0/e775747cde4b0a/US20180223382A1.pdf>>. [Consulta: 21 de marzo de 2020].
11. THORNTON MORRISON, Robert. y NEILSON BOYD, Robert. *Química orgánica.* 5a ed. México: Pearson Education, 1998. 1 474 p.
12. VEANA, Fabiola., DURÓN-VÁZQUEZ, Ricardo., GUERRERO OLAZARÁN, Martha., VIADER SALVADÓ, José María., AGUILAR, Cristóbal. y RODRÍGUEZ HERRERA, Raúl. *Invertasa del género Aspergillus y su impacto biotecnológico.* [en línea]. <<https://www.redalyc.org/pdf/620/62045307006.pdf>>. [Consulta: 29 de marzo de 2020].

13. ZOSSI, Silvia., CARDENAS, Geronimo., SOROL, Natalia. y SASTRE, Marcos. *Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina): Parte 1: caña limpia y despuntada.* [en línea]. <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AR2010F00003>>. [Consulta: 01 de abril de 2020].



## APÉNDICES

### Apéndice 1. Pol resultante de cuatro a ocho horas de inversión

No. experimento	Tiempo de inversión (h)				
	4	5	6	7	8
1	15,4	13,47	11,18	8,89	6,94
2	14,7	12,69	11,01	9,33	7,39
3	13,5	12,03	10,57	9,11	8,65
4	20,07	19,89	18,74	17,18	16,2
5	13,91	12,09	10,48	8,87	8,26
6	14,93	14,12	13,48	11,23	10,12
7	13,25	11	10,02	8,04	7,37
8	20,22	19,74	18,4	17,93	17,52
9	21,3	20,83	19,3	18,71	18,13
10	15,7	12,87	10,4	8,2	5,32
11	18,57	17,2	15,84	15,4	15,08
12	21,17	20,05	18,89	18,58	18,06
13	20,1	19,39	18,76	17,88	16,33
14	18,3	16,51	14,74	11,19	8,69
15	13,2	12,84	11,94	11,57	10,2
16	17,75	16	14,26	10,8	8,9
17	19,89	19,31	18,69	17,94	17,04
18	17,2	16,88	16,39	15,75	15,02
19	14,81	12,15	9,51	8,15	7,2
20	17,95	17,13	16,75	15,98	15,5
21	12,21	10,54	8,84	7,14	6,89
22	15,9	13	9,87	8,9	5,69
23	20	19,03	18,59	17,83	17,1
24	11,43	9,83	8,09	6,57	5,05
25	16,4	15,93	14,65	12,59	10,49
26	15,69	14,83	13,53	11,93	10,37
27	18,93	17,83	16,44	15,88	15,2
28	10,91	10	9,38	8,3	7,45
29	15,3	13,34	11,43	9,52	5,02
30	19,8	10,59	10,2	8,69	7,52
31	16,3	10,17	9,58	8,5	7,4
32	20,18	19,77	18,99	17,68	17,2

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. **Resultado método ICUMSA GS4/3-3 (2007) para azúcares reductores**

%AR						
No. experimento	Pol Final	T1 (mL)	Volumen de agua T2 (mL)	T2 (mL)	Volumen de agua T3 (mL)	T3 (mL)
1	6,94	15,8	37,2	13,8	40,7	13,5
2	7,39	14,7	38,3	15,1	39,4	14,6
3	8,65	16,2	36,8	15,6	38,9	15,6
4	16,2	21,9	31,1	22	32,5	22
5	8,26	15,3	37,7	15,1	39,4	15,1
6	10,12	14,5	38,5	14,2	40,3	14,1
7	7,37	17	36	16,5	38	16,3
8	17,52	23	30	22,9	31,6	23
9	18,13	27,3	25,7	26,9	27,6	26,8
10	5,32	9,5	43,5	9,5	45	9,4
11	15,08	22,8	30,2	21,7	32,8	22
12	18,06	31,4	21,6	31,3	23,2	31,2
13	16,33	23,2	29,8	23,4	31,1	23,1
14	8,69	17,6	35,4	16,5	38	16,5
15	10,2	15	38	14,5	40	14,4
16	8,9	18,6	34,4	16,6	37,9	16,6
17	17,04	21,5	31,5	21,5	33	21,6
18	15,02	21,1	31,9	20,7	33,8	19
19	7,2	16,1	36,9	16	38,5	16
20	15,5	16,7	36,3	16,3	38,2	16
21	6,89	13,2	39,8	12,3	42,2	12,1
22	5,69	9,1	43,9	9,2	45,3	9
23	17,1	25,5	27,5	25,4	29,1	25,5
24	5,05	9,8	43,2	9,8	44,7	9,7
25	10,49	14,7	38,3	14,4	40,1	14,4
26	10,37	14	39	13,5	41	13,5
27	15,2	23,1	29,9	22,4	32,1	22,3
28	7,45	13	40	13	41,5	13
29	5,02	8,8	44,2	8,5	46	8,5
30	7,52	20,4	32,6	19,8	34,7	20,3
31	7,4	15,8	37,2	15,6	38,9	15,5
32	17,2	23,9	29,1	23,7	30,8	23,7

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Resultado método ICUMSA GS4/3-3 (2007) para azúcares reductores totales**

No. experimento	%ART						
	T1 (mL)	Volumen de agua T2 (mL)	T2 (mL)	Volumen de agua T3 (mL)	T3 (mL)	%AR	%ART
1	34,5	18,5	33,3	21,2	33,2	46,30	75,30
2	33,3	19,7	33,4	21,1	33,2	42,81	75,30
3	34,2	18,8	34,3	20,2	34,3	40,06	72,89
4	36,4	16,6	36	18,5	36	28,41	69,44
5	34,4	18,6	34,4	20,1	34,4	41,39	72,67
6	34,9	18,1	34,9	19,6	35	44,33	71,43
7	34,2	18,8	34,4	20,1	34,2	38,34	73,10
8	37,9	15,1	37,9	16,6	38	27,17	65,79
9	38	15	38,1	16,4	38	23,32	65,79
10	32,8	20,2	32,8	21,7	32,7	66,49	76,45
11	36,7	16,3	36,5	18	36,5	28,41	68,49
12	37,9	15,1	37,9	16,6	37,8	20,03	66,14
13	35,8	17,2	35,9	18,6	35,8	27,06	69,83
14	34,3	18,7	34,2	20,3	34,2	37,88	73,10
15	34,8	18,2	34,9	19,6	34,9	43,40	71,63
16	34	19	34	20,5	34	37,65	73,53
17	35,6	17,4	35,8	18,7	35,9	28,94	69,64
18	36,7	16,3	36,7	17,8	36,8	32,89	67,93
19	34,2	18,8	34	20,5	34	39,06	73,53
20	36,9	16,1	36,8	17,7	36,9	39,06	67,75
21	33,5	19,5	33,3	21,2	33,6	51,65	74,40
22	32,9	20,1	32,9	21,6	32,9	69,44	75,99
23	35,8	17,2	35,7	18,8	35,8	24,51	69,83
24	32,3	20,7	32,3	22,2	32,4	64,43	77,16
25	35	18	35	19,5	35	43,40	71,43
26	34,7	18,3	34,7	19,8	34,8	46,30	71,84
27	36,9	16,1	36,7	17,8	36,7	28,03	68,12
28	33,5	19,5	33,5	21	33,4	48,08	74,85
29	32,5	20,5	32,6	21,9	32,5	73,53	76,92
30	34,2	18,8	34,3	20,2	34,1	30,79	73,31
31	34,3	18,7	34,2	20,3	34,3	40,32	72,89
32	38	15	37,9	16,6	37,9	26,37	65,96

Fuente: elaboración propia.

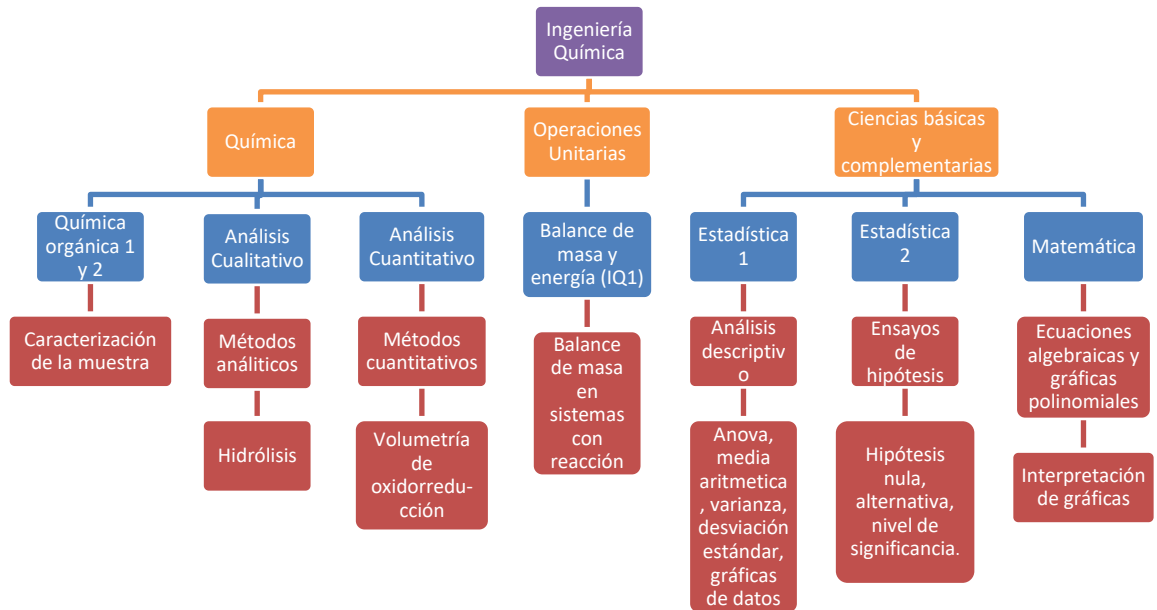


Apéndice 4. **Sacarosa química, porcentaje de azúcares reductores  
totales y brix final de las muestras**

<b>No. experimento</b>	<b>%ART</b>	<b>SQ</b>	<b>%AT</b>	<b>Bx</b>
1	75,30	27,55	73,85	80,90
2	75,30	30,87	73,68	80,20
3	72,89	31,18	71,25	81,30
4	69,44	38,98	67,39	81,80
5	72,67	29,72	71,11	80,70
6	71,43	25,75	70,07	80,90
7	73,10	33,02	71,36	81,30
8	65,79	36,68	63,86	82,30
9	65,79	40,35	63,67	80,90
10	76,45	9,47	75,95	82,00
11	68,49	38,08	66,49	79,40
12	66,14	43,80	63,83	79,40
13	69,83	40,64	67,69	82,60
14	73,10	33,46	71,34	82,70
15	71,63	26,82	70,22	81,00
16	73,53	34,08	71,74	82,20
17	69,64	38,67	67,60	83,20
18	67,93	33,29	66,18	80,00
19	73,53	32,74	71,81	82,00
20	67,75	27,25	66,32	83,30
21	74,40	21,61	73,27	81,40
22	75,99	6,22	75,66	79,80
23	69,83	43,06	67,57	83,10
24	77,16	12,09	76,52	80,90
25	71,43	26,62	70,03	81,10
26	71,84	24,27	70,56	81,10
27	68,12	38,09	66,12	81,10
28	74,85	25,43	73,51	81,70
29	76,92	3,22	76,75	82,10
30	73,31	40,40	71,19	80,90
31	72,89	30,94	71,26	81,50
32	65,96	37,61	63,98	82,40

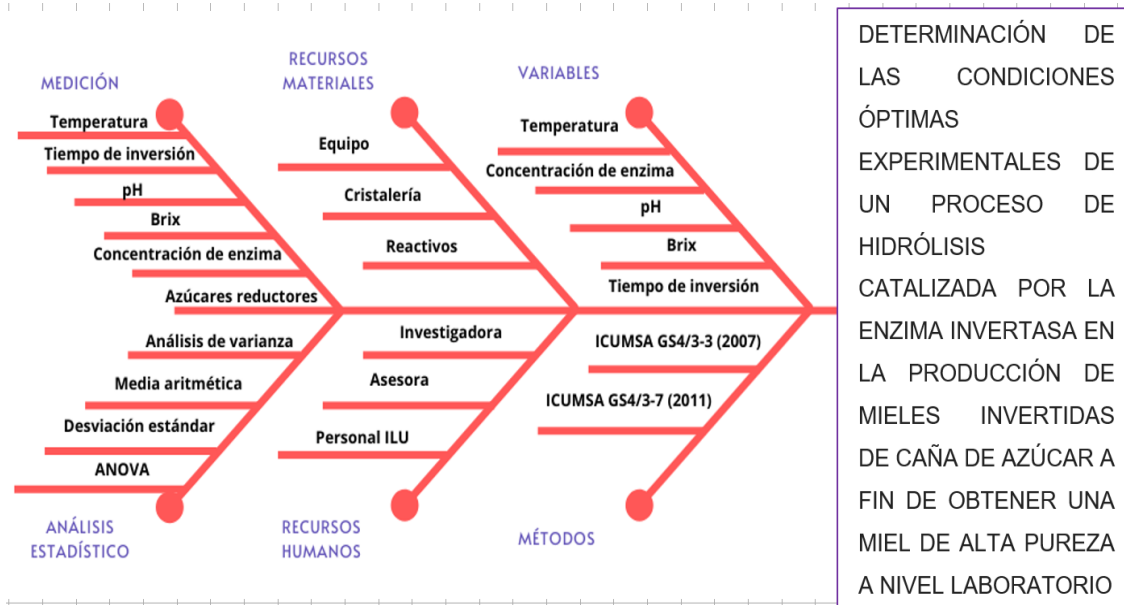
Fuente: elaboración propia.

## Apéndice 5. Requisitos académicos



Fuente: elaboración propia.

## Apéndice 6. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia, empleando Canva 2020.

## Apéndice 7. Ajuste de pH en muestra a invertir



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. **Lectura de brix en muestra a invertir**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. **Muestras en período de inversión**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 10. **Monitoreo de temperatura en tiempo de inversión**



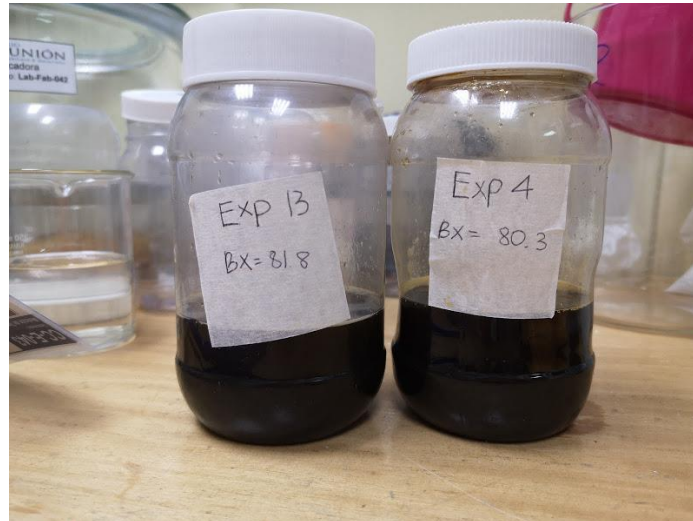
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. **Etapas de concentración de la miel invertida**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 12. **Muestras de miel invertida obtenida**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 13. **Preparación de miel invertida para su respectiva lectura de pol**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 14. **Lectura de pol obtenida en polarímetro de flujo continuo,  
marca Schmidt Haensch**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 15. **Erlenmeyers con Fehling A y B para metodología ICUMSA**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 16. **Preparación de muestras para la metodología ICUMSA GS4/ 3-7 (2011) de azúcares reductores totales a la izquierda e ICUMSA GS4/3-3 (2007) de azúcares reductores a la derecha**



Fuente: elaboración propia.

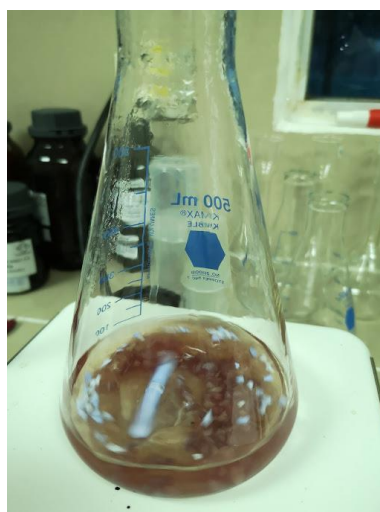


Apéndice 17. **Erlenmeyer luego de la primera titulación, utilizando metodología ICUMSA**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 18. **Erlenmeyer luego del cambio de viraje durante la tercera titulación, utilizando metodología ICUMSA**



Fuente: elaboración propia.

## ANEXOS

### Anexo 1. Método ICUMSA GS4/3-3 (2007)

#### **Determinación de azúcares reductores en melaza de caña y en algunos jarabes refinados por medio del procedimiento Lane & Eynon a volumen constante — Oficial**

\* versión precedente de 2003

##### **1 Alcance**

El método descrito es aplicable a melaza de caña<sup>1</sup> que contenga azúcares reductores normalmente en el rango del 10 al 25 % (General Subject 4). También puede aplicarse a jarabes refinados que contengan invertidos en el mismo rango (General Subject 3).

##### **2 Campo de aplicación**

El método, que puede constituir la base de los contratos de compra de melaza, mide las sustancias reductoras en melaza de caña. No puede ser utilizado para determinar la sacarosa real por diferencia con respecto a los azúcares reductores totales, debido a la interferencia de otras sustancias con propiedades reductoras. Es un método para evaluar el valor de la melaza en base a sus azúcares reductores con objeto de satisfacer un requerimiento comercial. El método también es utilizado para determinar el contenido de azúcar invertido en jarabes de azúcar refinado.

##### **3 Definiciones<sup>2</sup>**

**3.1 Azúcares reductores** — son básicamente la glucosa y fructosa presentes en la melaza.

**3.2 Invertidos** — mezcla equimolar de glucosa y fructosa.

**3.3 Melaza de caña** — subproducto ya sea de la fabricación de azúcar crudo de caña o de su refinación. Es un líquido oscuro de alta viscosidad del que no puede cristalizarse más azúcar por los métodos normales de fabricación.

##### **4 Fundamento**

El método se basa en la capacidad de los azúcares reductores de reducir la solución de Fehling bajo condiciones estándar.

## Continuación del anexo 13.

El método volumétrico de Lane & Eynon es ampliamente conocido en la industria azucarera y es sencillo y capaz de suministrar resultados reproducibles en condiciones estándar. Algunos no azúcares, particularmente el calcio, pueden influir en los resultados de esta determinación posiblemente formando un complejo con glucosa y fructosa. Este efecto es eliminado secuestrando el calcio presente en la melaza con el uso de EDTA.

Con jarabes de refinería usualmente no hay necesidad de agregar EDTA.

NOTA - La descripción del método que sigue a continuación es el que se aplica a la melaza de caña, pero cada detalle, exceptuando la adición de EDTA, es también aplicable a jarabes refinados que contengan del 10 al 25 % de azúcares invertidos.

### 5 Reactivos y materiales

#### PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

SE RECOMIENDA A LOS USUARIOS DE ESTE MÉTODO CONSULTAR SU LEGISLACIÓN DE SALUD Y SEGURIDAD ANTES DE TRABAJAR CON ESTOS REACTIVOS.

Utilizar únicamente agua destilada o agua de pureza equivalente. Los reactivos deben ser de grado analítico o mejor, a menos que se especifique lo contrario.

**5.1 Ácido clorhídrico, concentrado,  $\rho_{20} \approx 1,18$  g/mL.**

**5.2 Ácido benzoico** - reactivo de calidad para uso general

**5.3 Solución de azul de metileno, 1 g/100 mL.** Disolver 1 g de azul de metileno (puro) en agua y enrasar a 100 mL.

**5.4 Solución de hidróxido de sodio, aproximadamente 1 mol/L.** Disolver 40 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 500 mL de agua. Enfriar la solución, transferirla a un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua.

**5.5 Ácido clorhídrico, aproximadamente 0,5 mol/L.** Diluir 44,5 mL de ácido concentrado (5.1) a 1L.

**5.6 Solución de sal disódica de EDTA, 40 g/L.** Disolver 20 g de la sal en agua y enrasar a 500 mL.

### Continuación del anexo 13.

**5.7 Parafina líquida** —para controlar la formación de espuma o cualquier otro antiespumante que no reduzca la solución de Fehling.

**5.8 Solución de fenolftaleína, 1 g/100 mL.** Disolver 1g de fenolftaleína (de grado indicador) en 60 mL de alcohol industrial metilado (alcohol desnaturalizado) y enrasar a un volumen de 100 mL con agua.

**5.9 Solución de invertidos patrón, 2,5 g/L.** Pesar 9,50 g de sacarosa y transferirla, sin pérdidas, a un matraz aforado de 1 L con la ayuda de  $100 \pm 5$  mL de agua.

Agregar 5 mL de ácido clorhídrico concentrado (5.1) a la solución de sacarosa, mezclando cuidadosamente durante la adición del ácido. Cubrir la boca del matraz con un vaso de precipitados pequeño para evitar la entrada de materiales extraños y permitir reposar por un período de tiempo suficiente para completar la inversión de sacarosa. Este período depende de las condiciones de temperatura. La inversión se habrá completado al reposar durante 3 días a 20-25 °C o durante 8 días a 12-15 °C.

Diluir la solución de invertidos con agua hasta obtener aproximadamente 800 mL.

Disolver aproximadamente 2 g de ácido benzoico (5.2) en aproximadamente 75 mL de agua caliente y agregar la solución de ácido benzoico a la solución de invertidos. Finalmente enrasar el volumen de la solución a 1 L a 20 °C y mezclar, produciendo de esta forma una solución de azúcares invertidos de 10 g/L. Cuando se guarda en un recipiente cerrado, la solución de invertidos permanece estable durante al menos 6 meses.

Preparar una solución de invertidos patrón neutra de 2,5 g/L, pipeteando 50 mL de la solución de invertidos de 10 g/L a un matraz aforado de 200 mL, agregar dos gotas de solución de fenolftaleína (5.8). Agregar solución de hidróxido de sodio, 1 mol/L (5.4) con agitación suave hasta desarrollar una coloración rosa. Eliminar la coloración rosa de la solución de invertidos con la adición de una o dos gotas de solución de ácido clorhídrico 0,5 mol/L (5.5). Finalmente enrasar la solución con agua y mezclar. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de utilizarse.

Continuación del anexo 13.

#### **5.10 Solución de Fehling**

- Solución de cobre (Solución A). Pesar 138,56 g de sulfato de cobre pentahidratado y disolver en agua. Transferir la solución, evitando derrames, a un matraz aforado de 2 L, enrasar con agua a una temperatura de 20 °C y mezclar. Si fuera necesario, filtrar a través de un medio filtrante inerte, como por ejemplo, cerámica porosa o vidrio sinterizado.
- Solución de tartrato alcalina (Solución B). Pesar por separado 692,18 g de tartrato de sodio y potasio y 200 g de hidróxido de sodio y disolver en aproximadamente 500 mL de agua. Enfriar la solución y transferirla sin pérdida a un matraz aforado de 2 L; enrasar a una temperatura de 20 °C con agua y mezclar. Si es necesario, filtrar a través de un medio inerte, como por ejemplo cerámica porosa o vidrio sinterizado.
- Solución de Fehling mezclada. Mezclar volúmenes iguales de Solución A y Solución B agregando la Solución A a la Solución B mientras se agita con una varilla de vidrio. Filtrar si es necesario y conservar en un recipiente adecuado cerrado.

**5.11 Piedra pómez** — en polvo (o perlas de vidrio).

### **6 Aparatos**

**6.1 Material de vidrio volumétrico** — calibrado, de clase A, con trazabilidad de acuerdo a estándares nacionales.

**6.2 Termómetros.** Utilizar termómetros que hayan sido calibrados contra un termómetro de referencia certificado en todas las etapas dependientes de la temperatura.

**6.3 Valorador en caliente/iluminador.** El calentador/ iluminador combinado diseñado por UM es adecuado para este propósito, aunque no es esencial.

NOTA —UM = United Molasses Co Ltd. Calentador/iluminador disponible en Clive Shelton Associates, Provident House, Burrell Row, Beckenham, Kent BR3 1AT, Gran Bretaña.

Continuación del anexo 13.

**6.4 Balanza analítica** — con resolución de 1 mg.

**6.5 Cápsulas de pesada.**

**6.6 Reloj (1 hora)** - que indique minutos y segundos.

**6.7 Matraces para ebullición, de vidrio Pirex** - esféricos o de diseño similar de 400 mL de capacidad.

**6.8 Embudo para filtro.**

**6.9 Baño María** - mantenido a  $20 \pm 1$  °C.

**6.10 Anillos de plomo** - u otros dispositivos de peso para mantener los matraces en posiciones estables en el baño de agua.

## **7 Muestras**

**7.1 Preparación de muestras.** Mezclar la muestra por medio de agitación cuidadosa.

## **8 Procedimiento**

### **8.1 Notas generales.**

- **Material de vidrio.** Las superficies de todo el material volumétrico debe estar libre de trazas de grasa. Es deseable una limpieza ocasional con una mezcla de ácido crómico. El uso de un detergente especializado para uso de laboratorio reducirá la frecuencia de la necesidad de limpieza con ácido crómico.
- **Condiciones de calentamiento.** La ausencia de condiciones estándar de calentamiento proporciona resultados que no son reproducibles día a día.

En la determinación de azúcares reductores por este método, se requieren las siguientes condiciones.

El calentamiento deberá realizarse de manera que 75 mL de agua contenidos en un matraz de 400 mL alcancen el punto de ebullición en 2,5 minutos partiendo de 20 °C.

## Continuación del anexo 13.

La fuente de luz debe proporcionar un medio para visualizar el cambio de color. Podrán ser necesarios algunos ajustes en la posición de la lámpara por los analistas individuales con objeto de lograr el mejor efecto de iluminación.

Al establecer las condiciones de calentamiento para el ensayo, es esencial agregar aproximadamente 50 mg de piedra pómez o algunas perlas de vidrio (5.11) al agua para facilitar una ebullición homogénea. Se considera que se ha alcanzado el punto de ebullición cuando las burbujas de vapor rompen uniformemente sobre la superficie de agua en el matraz.

- **Temperatura de laboratorio.** Todos los métodos de las siguientes páginas se refieren a una temperatura estándar del laboratorio de 20 °C, aunque se acepta también un cuidadoso control de temperatura utilizando baño de agua a 20 °C.

**8.2 Estandarización de la solución de Fehling.** Ajustar el aparato de calentamiento de modo que 75 mL de agua contenidos en el matraz inicien su ebullición en un período de 2,5 min.  $\pm$  5 seg. partiendo de 20 °C. Para asegurar una ebullición homogénea, puede agregarse una pequeña cantidad de piedra pómez en polvo. Si se utiliza un calentador UM, éste deberá encenderse por lo menos 10 min. antes de realizar la determinación de los requerimientos térmicos.

Enjuagar y llenar una bureta de 50 mL con la solución de invertidos patrón neutra (5.9) de 2,5 g/L y llenar con agua otra bureta de 50 mL.

Pipetar 20 mL de la solución de Fehling mezclada (5.10) a un matraz de ebullición y agregar, por medio de la bureta, 15 mL de agua. Agregar 39 mL de la solución de invertidos patrón (5.9) de la bureta obteniendo así un volumen total de 74 mL.

Agregar una pequeña cantidad de piedra pómez (5.11) y unas gotas de antiespumante (5.7). Mezclar las soluciones agitando suavemente.

Colocar el matraz en el aparato de calentamiento y dejar que la solución alcance su punto de ebullición. Poner en marcha el cronómetro y dejar hervir la solución durante exactamente 2 min. Agregar 4 gotas de solución de azul de metileno (5.3). Completar la valoración agregando lentamente la solución de invertidos de la bureta.

### Continuación del anexo 13.

Agregar la solución de invertidos en pequeños incrementos que se reduzcan progresivamente, comenzando con adiciones de 0,2 mL, luego de 0,1 mL y finalmente gota a gota. Completar la valoración tras haber transcurrido 1 min.  $\pm$  5 seg. desde el momento en que se agregó la solución de azul de metileno . Esto da un tiempo total de ebullición de 3 min.  $\pm$  5 seg.

El punto final del ensayo queda determinado por la ausencia de tonalidad azul del colorante y cuando la solución presente un color rojo ladrillo débil ocasionada por el precipitado de óxido cuproso. Repetir el ensayo si fuera necesario, de manera que se alcance el punto final en el intervalo correcto. En ningún momento durante el ensayo deberá retirarse el matraz de la fuente de calor o agitarse.

Registrar el volumen requerido en la valoración. Si la solución de Fehling es de la potencia correcta, 20 mL deben requerir 40 mL de solución de invertidos proporcionando un volumen total de solución de 75 mL. Si el volumen requerido en la valoración es menor que 40 mL, entonces la solución es deficiente en cobre. Por consiguiente agregar:

$$34,64 \times \left[ 1 - \frac{\text{volumen requerido}}{40,0} \right] \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

a cada litro de solución de Fehling.

Disolver el 105 % de la cantidad calculada en la solución y valorar de nuevo. De esta forma la potencia de la solución de Fehling se ajustará finalmente por dilución. Este es el procedimiento más simple.

Si el volumen requerido en la valoración es mayor de 40 mL, hay exceso de cobre en la solución y cada litro deberá diluirse con una cantidad de:

$$1000 \times \left[ \frac{\text{volumen requerido}}{40,0} - 1 \right] \text{ mL de agua}$$

Agregar el 95 % del volumen calculado de agua y valorar de nuevo.



## Continuación del anexo 13.

Cuando la solución de Fehling es de la potencia correcta, 20 mL de la solución de Fehling mezclada serán equivalentes a 100 mg de azúcar invertido.

**8.3 Solución de muestra.** Pesar tan rápido como sea posible en un vaso de precipitados limpio y pesado previamente,  $10 \pm 0,2$  g de muestra y registrar el peso aproximando a 0,001 g. Agregar aproximadamente 15 mL de agua a la muestra y mezclar completamente con una varilla de vidrio pequeña. Transferir la solución, evitando derrames, a un matraz aforado de 200 mL. Enjuagar la varilla con adiciones sucesivas de agua y agregar los lavados al contenido del matraz.

Agregar suficiente agua hasta obtener un volumen de aproximadamente 90 mL y agitar el matraz para mezclar la solución. Finalmente, enrasar a 200 mL a 20 °C y mezclar para obtener una solución de melaza de 50 g/L.

Preparar una solución de 20 g/L de la muestra pipetando 100 mL de la solución de melaza en un matraz aforado de 250 mL y agregar 15 mL de solución EDTA (5.6), utilizando una probeta graduada. Mezclar la solución, enrasar a 20 °C y mezclar nuevamente.

**8.4 Valoración de la muestra.** Asegurarse de que el dispositivo de calentamiento opera bajo las condiciones preestablecidas y luego enjuagar y llenar la bureta con la solución de 20 g/L. Realizar la valoración preliminar.

Pipetar 20 mL de la solución de Fehling (5.10) en el matraz de ebullición, depositar en el 20 mL de la solución de melaza, agrega una pequeña cantidad de piedra pómez en polvo (5.11) y algunas gotas de antiespumante (5.7).

Colocar el matraz en el aparato de calefacción, calentar hasta que la solución alcance el punto de ebullición y agregar 4 gotas de solución de azul de metileno (5.3).

NOTA — si la coloración azul de la solución desaparece, la solución de melaza está muy concentrada y deberá prepararse una solución menos concentrada.

## Continuación del anexo 13.

Valorar agregando inicialmente incrementos de 2 mL de la solución de melaza, reduciendo progresivamente la adición hasta 0,2 mL e intentando obtener el punto final en aproximadamente 1 min, contado a partir del momento en que la solución inicie la ebullición. El punto final se manifiesta por la ausencia de la coloración azul del colorante y por la presencia de una débil coloración rojo ladrillo debido al precipitado de óxido cuproso. Registrar el volumen requerido en la valoración (T1).

NOTA — Si después de la adición de 50 mL la coloración azul no desaparece, el contenido de azúcares reductores será menor del 10 %. Deberá prepararse una solución de melaza de mayor concentración y repetir el análisis.

Tomar otra bureta y llenarla con agua y realizar una segunda valoración agregando al matraz en ebullición 20 mL de solución de Fehling, el volumen de la solución de melaza obtenido de la primera valoración menos 2 mL y suficiente agua de la bureta como para obtener un volumen de 73 mL. Después de 2 min. de ebullición agregar 4 gotas de azul de metileno y completar la valoración inicialmente con incrementos de 0,1 mL y finalmente gota a gota. La valoración debe completarse transcurridos 1 min.  $\pm$  5 seg. adicionales, obteniéndose un tiempo total de ebullición de 3 min.  $\pm$  5 seg. Registrar el volumen requerido en la valoración (T2).

La valoración final se realiza agregando al matraz de ebullición 20 mL de la solución de Fehling, el volumen de la solución de melaza obtenido de la segunda valoración (T2) menos 0,5 mL y suficiente agua de la bureta como para obtener un volumen de 74,5 mL. La valoración se realiza de la misma manera que la segunda valoración. Registrar el volumen requerido en la valoración (T3) y utilizarlo para calcular los azúcares reductores.

NOTA — Si la valoración preliminar (T1) es menor de 30 mL o para un control de análisis de fábrica, la segunda valoración (T2) puede omitirse.

## 9 Expresión de resultados

**9.1 Cálculo de los azúcares reductores.** Si existe sacarosa presente, deberá utilizarse un factor de corrección en los cálculos.<sup>4</sup> El factor varía con la cantidad de sacarosa presente en el volumen final de valoración (T3) (ver abajo). No es necesario conocer el contenido de sacarosa de la muestra con gran exactitud para determinar el factor a utilizar. Para este propósito se puede asumir que la melaza de caña, por ejemplo, contiene un 33 % de sacarosa.

Continuación del anexo 13.

Debido a que 20 mL de solución de Fehling son equivalentes a 100 mg de azúcar invertido, el contenido de azúcares reductores será:

$$\frac{100}{T} \times \frac{1\,000}{C} \times \frac{100}{1\,000} \times F \text{ \%m/m}$$

y el contenido de azúcares reductores, % m/m:

$$\frac{10\,000 \times F}{TC}$$

Donde:

g de sacarosa presente en volumen final de valoración (T3)	Factor (F)
0,0	1,000
0,5	0,988
1,0	0,975
2,0	0,950
3,0	0,934
4,0	0,917
5,0	0,906
6,0	0,894
7,0	0,884
8,0	0,874
9,0	0,865
10,0	0,856

F = factor de sacarosa a partir de la Tabla,

C = concentración de la muestra en solución (g/L),

T = T3 = volumen requerido en la valoración (mL).

Expresar los resultados aproximando al 0,05 % más próximo (m/m).

Continuación del anexo 13.

**9.2 Precisión.**<sup>5</sup> La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad no debiera ser mayor del 0,77 % de azúcares reductores en melaza.

La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad no debiera ser mayor del 1,60 % de azúcares reductores en melaza.

### **10 Bibliografía**

1. Proc. 17th Session ICUMSA, 1978, 211
2. Baker B P, ed. (1987): Composition, Properties and Uses of Molasses and Related Products, United Molasses Co Ltd
3. Schneider F, ed. (1979): Sugar Analysis. ICUMSA Methods, 41-55
4. Proc. 20th Session ICUMSA, 1990, 330
5. Eggleston G (2006): Referee's Report, General Subject 4, ICUMSA

Fuente: ICUMSA. *Libro de métodos 2007*.

<https://www.yumpu.com/es/document/view/395788/libro-de-metodos-icumsa-2007>. Consulta: 20 de abril de 2020.

## Anexo 14. Método ICUMSA GS4/3-7 (2011)

### **Determinación de azúcares reductores totales en melaza y jarabes refinados después de hidrólisis por el procedimiento Lane & Eynon a volumen constante — Oficial (de Referencia)<sup>1,2</sup>**

#### **1 Alcance**

El método se aplica a todas las muestras de melaza (General Subject 4). También puede aplicarse a ciertos jarabes azucarados (General Subject 3).

#### **2 Campo de aplicación**

El método, que puede constituir la base de los contratos de compra de melaza, mide los azúcares reductores totales, como azúcar invertido después de la hidrólisis de las muestras de melaza. No puede ser utilizado para determinar la sacarosa real<sup>1</sup> por sustracción de los azúcares reductores iniciales y multiplicando por 0,95 (ver también Método GS4/3-9).

Ya sea que se utilice esta práctica o la multiplicación directa de los azúcares reductores totales después de la hidrólisis por 0,95 para obtener el 'azúcar' (sacarosa), el resultado obtenido es únicamente para satisfacer un requerimiento comercial. No es una medida precisa de azúcar (sacarosa).

Este método ha sido designado como Método Oficial ICUMSA (de Referencia)<sup>2</sup>. Es el método que ICUMSA recomienda para la Determinación de Azúcares Reductores en Melaza y Jarabes Refinados, con preferencia con respecto al Método GS4/3-9.

El método también es utilizado para determinar 'sacarosa' mas 'invertidos' en jarabes refinados determinando los azúcares reductores totales después de la hidrólisis. El resultado usualmente es convertido a '% de sacarosa' multiplicando el valor de los azúcares reductores totales por 0,95.

#### **3 Definiciones**

**3.1 Azúcares reductores.** Los azúcares reductores en melaza después de la hidrólisis son principalmente, pero no exclusivamente, la glucosa y la fructosa.

Continuación del anexo 14.

**3.2 Invertidos** — mezcla equimolar de glucosa y fructosa.

#### **4 Fundamento**

El método se basa en la capacidad de los azúcares reductores de reducir la solución de Fehling bajo condiciones estándar.

El método volumétrico de Lane & Eynon es ampliamente conocido en la industria azucarera<sup>4</sup> y es sencillo y capaz de suministrar resultados reproducibles en condiciones estándar. Algunos no azúcares, particularmente el calcio, pueden influir en los resultados de esta determinación posiblemente formando un complejo con glucosa y fructosa. Este efecto es eliminado secuestrando el calcio presente en la melaza con el uso de EDTA.

Con jarabes refinados usualmente no hay necesidad de agregar EDTA.

NOTA — La descripción del método que se presenta a continuación es la que se aplica a la melaza, pero cada detalle, excepto la adición de EDTA, es también aplicable a jarabes refinados.

#### **5 Reactivos y materiales**

##### **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD**

SE RECOMIENDA A LOS USUARIOS DE ESTE MÉTODO CONSULTAR SU LEGISLACIÓN DE SALUD Y SEGURIDAD ANTES DE TRABAJAR CON ESTOS REACTIVOS.

Utilizar únicamente agua destilada o agua de pureza equivalente. Los reactivos deben ser de grado analítico o mejor, a menos que se especifique lo contrario.

**5.1 Ácido clorhídrico, concentrado**  $\rho_{20} \approx 1,18 \text{ g/mL}$ .

**5.2 Ácido benzoico** — reactivo de calidad para uso general.

**5.3 Solución de azul de metileno, 1 g/100 mL.** Disolver 1 g de azul de metileno (puro) en agua y enrasar a 100 mL.

Continuación del anexo 14.

**5.4 Solución de hidróxido de sodio, aproximadamente 2 mol/L.** Disolver 80 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 500 mL de agua. Enfriar la solución, transferirla a un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua.

**5.5 Solución de hidróxido de sodio, aproximadamente 1 mol/L.** Diluir el reactivo 2 mol/L (5.4) en proporción 1:1 V/V.

**5.6 Ácido clorhídrico, 6,34 mol/l.,  $\rho_{20} = 1,1029$  g en cada mL.** Diluir con agua 630  $\pm$  5mL de ácido clorhídrico,  $\rho_{20} = 1,18$  g/mL a 1 L y ajustar para obtener exactamente 6,34 mol/L después de valorar 5 mL con NaOH 1 mol/L utilizando como indicador naranja de metilo.

**5.7 Ácido clorhídrico, aproximadamente 0,5 mol/L.** Diluir 44,5 mL de ácido concentrado (5.1) a 1 L.

**5.8 Solución de sal disódica de EDTA, 40 g/L.** Disolver 20 g de la sal en agua y enrasar a 500mL.

**5.9 Parafina líquida** -para controlar la formación de espuma o cualquier otro antiespumante que no reduzca la solución de Fehling.

**5.10 Solución de fenolftaleína, 1 g,/100 mL.** Disolver 1 g de fenolftaleína (de grado indicador) en 60 mL de alcohol industrial metilado (alcohol desnaturalizado) y enrasar a un volumen de 100 mL con agua.

**5.11 Solución de invertidos patrón, 2,5 g/L.** Pesar 9,50 g de sacarosa y transferirla, sin pérdidas, a un matraz aforado de 1 L con la ayuda de 100  $\pm$  5 mL de agua.

Agregar 5 mL de ácido clorhídrico concentrado (5.1) a la solución de sacarosa, mezclando cuidadosamente durante la adición del ácido. Cubrir la boca del matraz con un vaso de precipitados pequeño para evitar la entrada de materiales extraños y permitir reposar por un período de tiempo suficiente para completar la inversión de sacarosa. Este período depende de las condiciones de temperatura. La inversión se habrá completado al reposar durante 3 días a 20-25 °C o durante 8 días a 12-15 °C.

Diluir la solución de invertidos con agua hasta obtener aproximadamente 800 mL.

## Continuación del anexo 14.

Disolver aproximadamente 2 g de ácido benzoico (5.2) en aproximadamente 75 mL de agua caliente y agregar la solución de ácido benzoico a la solución de invertidos. Finalmente enrasar el volumen de la solución a 1 L a 20 °C y mezclar produciendo de esta manera una solución de azúcares invertidos de 10 g/L. Cuando se guarda en un recipiente cerrado, la solución de invertidos permanece estable durante al menos 6 meses.

Preparar una solución de invertidos patrón neutra de 2,5 g/L pipeteando 50 mL de una solución de invertidos de 10 g/L en un matraz aforado de 200 mL, agregar dos gotas de solución de fenoltaleína (5.10). Agregar solución de hidróxido de sodio, 1 mol/L (5.5) con agitación suave hasta desarrollar una coloración rosa. Eliminar la coloración rosa de la solución de invertidos con la adición de una o dos gotas de solución de ácido clorhídrico 0,5 mol/L (5.7). Finalmente enrasar la solución con agua y mezclar. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de utilizarse.

### 5.12 Solución de Fehling

- **Solución de cobre (Solución A).** Pesar 138,56 g de sulfato de cobre pentahidratado y disolver en agua. Transferir la solución, evitando derrames, a un matraz aforado de 2 L. enrasar con agua a una temperatura de 20 °C y mezclar. Si fuera necesario, filtrar a través de un medio filtrante inerte, como por ejemplo, cerámica porosa o vidrio sinterizado.
- **Solución de tartrato alcalina (Solución B).** Pesar por separado 692,18 g de tartrato de sodio y potasio y 200 g de hidróxido de sodio y disolver en aproximadamente 500 mL de agua. Enfriar la solución y transferirla sin pérdidas a un matraz aforado de 2 L, enrasar a una temperatura de 20 °C con agua y mezclar. Si es preciso, filtrar a través de un medio inerte, como por ejemplo cerámica porosa o vidrio sintetizado.
- **Solución de Fehling mezclada.** Mezclar volúmenes iguales de Solución A y Solución B agregando la Solución A a la Solución B mientras se agita con una varilla de vidrio. Filtrar si fuera necesario y almacenar en un contenedor adecuado cerrado.

### 5.13 Piedra pómez —en polvo (o perlas de vidrio).



Continuación del anexo 14.

## **6 Aparatos**

**6.1 Material de vidrio volumétrico** — calibrado, de clase A, con trazabilidad de acuerdo a estándares nacionales.

**6.2 Termómetros.** Utilizar termómetros que hayan sido calibrados contra un termómetro de referencia certificado en todas las etapas dependientes de la temperatura.

**6.3 Valorador en caliente/iluminador.** El calentador/ iluminador combinado diseñado por UM es adecuado para este propósito, aunque no es esencial.

NOTA - UM = United Molasses Co Ltd. Calentador/iluminador disponible en Clive Shelton Associates, Provident House, Burreli Row, Beckenham, Kent BR3 1 AT, Gran Bretaña.

**6.4 Balanza analítica** — con resolución de 1 m g.

**6.5 Cápsulas de pesada.**

**6.6 Reloj (1 hora)** — que indique minutos y segundos.

**6.7 Matraz para ebullición, de vidrio Pyrex** —esférico o de diseño similar de 400 mL de capacidad.

**6.8 Embudo para filtro.**

**6.9 Baño de agua** — mantenido a  $20 \pm 1$  °C.

**6.10 Anillos de plomo** — u otros dispositivos de peso para mantener los matraces en posiciones estables en el baño María.

## **7 Muestras**

**7.1 Preparación de muestras.** Mezclar la muestra por agitación cuidadosa.

Continuación del anexo 14.

## 8 Procedimiento

### 8.1 Notas generales.

- **Material de vidrio.** Las superficies de todo el material de vidrio volumétrico deben estar libre de trazas de grasa. Es deseable una limpieza ocasional con una mezcla de ácido crómico. El uso de un detergente especializado para uso de laboratorio reducirá la frecuencia de la necesidad de limpieza con ácido crómico.
- **Condiciones de calentamiento.** La ausencia de condiciones estándar de calentamiento proporciona resultados que no son reproducibles día a día.

En la determinación de azúcares reductores por este método, se requieren las siguientes condiciones.

El calentamiento deberá realizarse de manera que 75 mL de agua contenidos en un matraz de 400 mL alcancen el punto de ebullición en 2,5 minutos partiendo de 20 °C.

La fuente de luz deberá proporcionar un medio para visualizar el cambio de color. Podrán ser necesarios algunos ajustes en la posición de la lámpara por los analistas individuales con objeto de lograr el mejor efecto de iluminación.

Al establecer las condiciones de calentamiento para el ensayo, es esencial agregar aproximadamente 50 mg de piedra pómez o algunas perlas de vidrio (5.13) al agua para facilitar una ebullición homogénea. Se considera que se ha alcanzado el punto de ebullición cuando las burbujas de vapor rompen uniformemente sobre la superficie de agua en el matraz.

- **Temperatura de laboratorio.** Todos los métodos de las siguientes páginas se refieren a una temperatura estándar del laboratorio de 20 °C, aunque se acepta también un cuidadoso control de temperatura utilizando baño de agua a 20 °C.

**8.2 Estandarización de la solución de Fehling.** Ajustar el aparato de calentamiento de modo que 75 mL de agua contenidos en el matraz inicien su ebullición en un período de 2,5 min.  $\pm$  5 seg. partiendo de 20 °C.

Para asegurar una ebullición homogénea, puede agregarse una pequeña cantidad de piedra pómez en polvo. Si se utiliza un calentador UM, éste deberá encenderse por lo menos 10 min. antes de realizar la determinación de los requerimientos térmicos.

## Continuación del anexo 14.

Enjuagar y llenar una bureta de 50 mL con la solución de invertidos patrón neutra (5.11) de 2,5 g/L y llenar con agua otra bureta de 50 mL.

Pipetar 20 mL de la solución de Fehling mezclada (5.12) en un matraz de ebullición y agregar por medio de la bureta 15 mL de agua. Agregar 39 mL de la solución de invertidos patrón (5.11) de la bureta obteniendo así un volumen total de 74 mL. Agregar una pequeña cantidad de piedra pómez (5.13) y unas gotas de antiespumante (5.9). Mezclar las soluciones agitando suavemente.

Colocar el matraz en el aparato de calentamiento y dejar que la solución alcance su punto de ebullición. Poner en marcha el cronómetro y dejar hervir la solución durante exactamente 2 min. Agregar 4 gotas de solución de azul (le metileno (5.3). Completar la valoración agregando lentamente la solución de invertidos de la bureta.

Agregar la solución de invertidos en pequeños incrementos que se reducen progresivamente, comenzando con adiciones de 0,2 mL, luego de 0,1 mL y finalmente gota a gota. Completar la valoración tras haber transcurrido 1 min.  $\pm$  5 seg. desde el momento en que se agregó la solución de azul de metileno. Esto da un tiempo total de ebullición de 3 min.  $\pm$  5 seg.

El punto final del ensayo queda determinado por la ausencia de tonalidad azul del colorante y cuando la solución presente un color rojo ladrillo débil ocasionada por el precipitado de óxido cuproso. Repetir el ensayo si fuera necesario, de manera que se alcance el punto final en el intervalo correcto. En ningún momento durante el ensayo deberá retirarse el matraz de la fuente de calor o agitarse.

Registrar volumen requerido en la valoración. Si la solución de Fehling es de la potencia correcta, 20 mL deben requerir 40 mL de solución de invertidos proporcionando un volumen total de solución de 75 mL. Si el volumen requerido en la valoración es menor de 40 mL, la solución es deficiente en cobre.

En ese caso agregar:

$$34,64 \times \left[ 1 - \frac{\text{volumen requerido}}{40,0} \right] \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

a cada litro de solución de Fehling.

## Continuación del anexo 14.

Disolver el 105 % de la cantidad calculada en la solución y valorar de nuevo. De esta manera la potencia de la solución de Fehling se ajustará finalmente por dilución. Esta es la forma más sencilla de hacerlo.

Si el volumen requerido es mayor de 40,0 mL, habrá exceso de cobre en la solución y cada litro deberá diluirse con una cantidad igual a:  
volumen requerido.

$$1\ 000 \times \left[ \frac{\text{volumen requerido}}{40,0} - 1 \right] \text{ mL de agua.}$$

Agregar 95 % del volumen calculado de agua y valorar de nuevo.

Cuando la solución de Fehling es de la potencia correcta, 20 mL de la solución serán equivalentes a 100 mg de azúcar invertido.

**8.3 Preparación de la solución de melaza hidrolizada.** Primeramente, preparar una solución de melaza 50 de g/L. Pesar tan rápido como sea posible y transferir a un vaso de precipitados limpio y pre-pesado  $10 \pm 0,2$  g de muestra, registrando el peso con una aproximación de 0,001g.

Agregar aproximadamente 15 mL de agua a la muestra y mezclar completamente con una varilla pequeña de vidrio. Transferir la solución, evitando derrames, a un matraz aforado de 200 mL. Enjuagar la varilla de vidrio y el vaso de precipitados con adiciones sucesivas de agua y agregar los lavados al contenido del matraz.

Agregar suficiente agua como para obtener un volumen de aproximadamente 90 mL y agitar el matraz para mezclar la solución. Finalmente enrasar a 200 mL a la temperatura adecuada y mezclar para obtener una solución de melaza de 50 g/L.

Pipetar 25 mL de la solución de 50 g/L a un matraz aforado de 250 mL. Agregar 5 mL de ácido clorhídrico 6,34 mol/L utilizando una bureta de 25 mL, agitando la solución suavemente para impedir concentraciones puntuales de ácido en la solución.

## Continuación del anexo 14.

Después de ello, sumergir el matraz en un baño de agua a 60 °C y agitar suavemente durante 3min. para elevar la temperatura de la melaza acidulada tan rápido como sea posible. Colocar el dispositivo de peso (anillo de plomo) alrededor del cuello del matraz y dejar reposar en el baño de agua durante otros 12 min. adicionales.

Durante el período de reposo no permitir que el matraz entre en contacto con ninguna parte de la superficie de calentamiento del baño María. Para evitar que esto ocurra, debiera incorporarse al baño María algún dispositivo espaciador adecuado.

Retirar el matraz del baño María y después de quitar el dispositivo de peso, enfriar el contenido rápidamente colocando el matraz en agua en una corriente de agua fría. Diluir la solución hasta aproximadamente 125 mL y agregar unas gotas de solución de fenolftaleína (5.10). Después agregar suficiente solución de hidróxido de sodio 2 mol/L (5.4) para conferir una coloración rojiza a la solución. Durante la adición de álcali deberá agitarse suavemente la solución.

Eliminar la coloración roja de la solución agregando unas gotas de ácido clorhídrico 0,5 mol/L (5.7).

Agregar 4,0 mL de solución EDTA, mezclar bien la solución, enrasar con agua a 20 °C y mezclar. Esta solución es equivalente a 0,5 g de melaza por 100 mL.

**8.4 Valoración de la muestra.** Asegurarse de que el dispositivo de calentamiento opera bajo las condiciones preestablecidas y luego enjuagar y llenar la bureta con la solución de melaza hidrolizada. Realizar la valoración preliminar.

Pipetar 20 mL de la solución de Fehling (5.12) al matraz de ebullición, depositar en el 20 mL de la solución de melaza hidrolizada y agregar una pequeña cantidad de piedra pómez en polvo. Colocar el matraz en el aparato de calefacción, permitir que la solución alcance el punto de ebullición y agregar 4 gotas de solución de azul de metileno (5.3).

Valorar agregando inicialmente incrementos de 2 mL de la solución de melaza y reduciendo progresivamente la adición hasta 0,2 mL e intentando obtener el punto final en aproximadamente 1 min. contado a partir del momento en que la solución inicie la ebullición. El punto final se manifiesta por la ausencia de la coloración azul del colorante y por la presencia de una débil coloración rojo ladrillo debido al precipitado de óxido cuproso. Registrar el volumen requerido en la valoración (T1).

## Continuación del anexo 14.

Tomar otra bureta y llenarla con agua y realizar una segunda valoración agregando al matraz en ebullición 20 mL de solución de Fehling, el volumen de la solución de melaza hidrolizada obtenido de la primera valoración menos 2 mL y suficiente agua de la bureta como para obtener un volumen de 73 mL. Después de 2 min. de ebullición agregar 4 gotas de azul de metileno y completar la valoración agregando la solución de melaza hidrolizada, inicialmente en incrementos de 0,1 mL y finalmente gota a gota. La valoración debe completarse transcurridos 1 min.  $\pm$  5 seg. adicionales, obteniéndose un tiempo total de ebullición de 3 min.  $\pm$  5 seg. Registrar el volumen requerido en la valoración (T2). La valoración final se realiza agregando al matraz en ebullición 20 mL de la solución de Fehling el volumen de la solución de melaza obtenido de la segunda valoración (T2) menos 0,5 mL y suficiente agua de la bureta como para obtener un volumen de 74,5 mL.

La valoración se realiza de la misma manera que la segunda valoración. Registrar el volumen requerido en la valoración (T3) y utilizarlo para calcular los azúcares reductores.

NOTA —si la valoración preliminar (T1) es menor de 30 mL, o para análisis de control de fábrica, puede omitirse la segunda valoración (T2).

NOTA —debido al alto contenido de invertidos totales en melazas de alta polarización (HTM) después de la hidrólisis, el procedimiento de preparación de la solución debiera modificarse de la siguiente manera. Pipetar 25 mL de una solución de 40 g/L de la melaza de alta polarización (HTM) y considerarla como melaza ordinaria (ver 8.3), excepto que 2 mL de solución EDTA deben agregarse antes de enrasar a un volumen que proporcione una solución de concentración 0,4g/100 mL para la valoración.

## 9 Expresión de resultados

**9.1 Cálculo.** La concentración de azúcares reductores totales en la melaza después de la hidrólisis viene dada por:

$$\% \text{ de azúcares reductores (como azúcar invertido)} = \frac{1\ 000}{C \times T}$$

Donde:

C = concentración de la solución sometida a ensayo de melaza (g/100mL),

T = T3= valoración (mL de solución de melaza utilizada).

## Continuación del anexo 14.

Cuando:

C= 0,5 g/100 ml

$$\% \text{ de azúcares reductores} = \frac{2\ 000}{T}$$

El % de azúcares reductores totales normalmente está comprendido entre el 50 y el 60 % para melaza. El uso de una solución de melaza hidrolizada de 0,5 g/100 mL permite un % de azúcares reductores totales en el rango del 40 % (valoración = 50 mL) al 80 % (valoración = 25mL).

**9.2 Precisión.**<sup>5</sup> La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad no debiera ser mayor del 1,51 % de azúcares reductores totales en melazas.

La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad no debiera ser mayor del 2,47 % de azúcares reductores totales en melazas.

### 10 Bibliografía

1. Proc. 18th Session ICUMSA, 1982, 135
2. Proc. 27th Session ICUMSA, 2010. 22
3. Proc. 17th Session ICUMSA, 1978, 107
4. Schneider F, cd. (1979): Sugar Analysis. ICUMSA Methods, 41-55
5. Eggleston G (2006): Referee's Report, General Subject 4, ICUMSA

<https://www.yumpu.com/es/document/view/395788/libro-de-metodos-icumsa-2011>. Consulta: 21 de abril de 2020.