

00528  
2

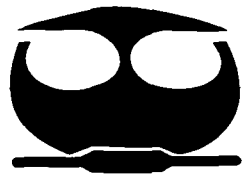


# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OPTIMIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE SILILACIÓN  
PARA CARBOHIDRATOS Y SU ANÁLISIS POR  
CROMATOGRAFÍA DE GASES

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**ANA LUISA /ALARCÓN JIMÉNEZ**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

A  
2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


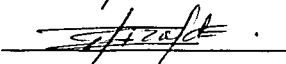
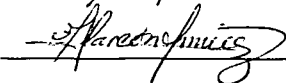
# PAGINACION DISCONTINUA

## JURADO ASIGNADO

**Presidente** Prof. Francisca Iturbe Chinas  
**Vocal** Prof. Josefina Elizalde Torres  
**Secretario** Prof. Elba Rojas Escudero  
**1er. Suplente** Prof. Georgina Artemisa Duarte Lisci  
**2º. Suplente** Prof. Luz Sandra Sánchez del Ángel

### SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 224 del Departamento de Química Orgánica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR	M. en C. Elba Rojas Escudero	
SUPERVISOR TÉCNICO	Q. Patricia Elizalde Galván	
SUSTENTANTE	Ana Luisa Alarcón Jiménez	

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Ana Luisa Alarcón Jiménez  
FECHA: 29 de Julio de 2009  
FIRMA: Ana Luisa Alarcón Jiménez

B

*Gracias a Dios*

*Por la salud y el bienestar, por las alegrías y las satisfacciones; por darme la oportunidad de conocer a toda esta gente que quiero y aprecio.*

*Gracias Mamá y Papá*

*Por haberme dado la vida, por su constante esfuerzo, por todo el apoyo, cariño y confianza. Porque en las caídas siempre tuvieron palabras que me alentaron.*

*A mis hermanos Blanca e Iván*

*Por darme su cariño, por estar conmigo en todo momento, por su paciencia y comprensión. Por que son lo mejor que tengo.*

*A aquellos que se nos adelantaron en el camino y que siempre están en mi pensamiento, gracias abuelita ...si tan solo pudieras estar aquí.*

*A mis tías: Aristela, Marina, Romina y Guisela;*

*Por que son mi ejemplo a seguir, gracias por todo su apoyo, por la oportunidad y la confianza que depositaron en mi, por cuidarme y mimarme durante todo este tiempo.*

*A mi familia, en especial a Genaro, Juvenal, Iván, Tío Jesús,...gracias por cada minuto de su tiempo.*

*A mis asesoras: Elba y Paty, por la oportunidad, la paciencia y el cariño que me han brindado hasta este momento. Gracias por el consejo que me guió; por haberme abierto su corazón.*

*A mis maestros (as): Erika Sánchez, Margarita Ramírez, Blas Flores, Francisco Rojo, Fernando León; por la confianza y el tiempo dedicado a mi persona, por todo su apoyo, gracias.*

*A mis amigos: Daphne, Claudia, Ivette, Alejandra, Rogelio, Paco, Martín, Miguel, Ale, Vladimir, Ivonne, Mónica, Sergio, Diana, Roberto, Alejandro, Alex, Rafita, Jesús, Erika, Roger, Manuel y Noemí. Gracias por darme su amistad, por los momentos agradables e inolvidables.*

*A ti... a quien amo por sobre todas las cosas.  
Gracias por creer en mí, por darme tanto amor, por "coincidir".  
Gonzalo, te amo.*

*Al Dr. Humberto Bravo, Dr. Rodolfo Sosa, Biol. Pablo Sánchez y Dr. Rogelio  
Soto, por darme la oportunidad y el apoyo para continuar creciendo.*

*A toda esta gente maravillosa que de alguna u otra manera me ha demostrado  
su cariño, gracias por su apoyo y sus consejos, por aceptarme tal como soy.*

## **INDICE**

	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	i
<b>HIPÓTESIS</b>	iii
<b>OBJETIVOS</b>	iv
<b>CAPÍTULO I. <u>ANTECEDENTES</u></b>	
<b>I.1 CARBOHIDRATOS</b>	<b>1</b>
<b>I.1.1 PRINCIPALES CARBOHIDRATOS Y SU IMPORTANCIA</b>	<b>1</b>
<b>I.1.2 CLASIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS</b>	<b>2</b>
<b>I.1.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA CARBOHIDRATOS</b>	<b>4</b>
<b>I.2 CROMATOGRAFÍA</b>	<b>6</b>
<b>I.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS</b>	<b>6</b>
<b>I.2.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES</b>	<b>7</b>
<b>I.2.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA</b>	<b>8</b>
<b>I.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES</b>	<b>10</b>
<b>I.3.1 FORMACIÓN DE DERIVADOS</b>	<b>11</b>
<b>I.3.2 TÉCNICA DE FORMACIÓN DE LA OXIMA EN EL ANÁLISIS         DE CARBOHIDRATOS</b>	<b>14</b>
<b>I.3.3 AGENTES SILILANTES</b>	<b>15</b>



## **CAPÍTULO II. METODOLOGÍA**

Página

<b>II.1 REACTIVOS Y MATERIALES</b>	<b>17</b>
<b>II.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EXPERIMENTALES</b>	<b>18</b>
<b>II.3 PROCEDIMIENTO</b>	<b>19</b>
<b>II.3.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO EXPERIMENTAL</b>	<b>19</b>
<b>II.3.2 PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS OXIMA -TMS</b>	<b>20</b>
<b>II.3.2.1 OBTENCIÓN DE LA OXIMA</b>	<b>20</b>
<b>II.3.2.2 OBTENCIÓN DEL DERIVADO SILILADO</b>	<b>21</b>
<b>II.3.3 MODIFICACIÓN DE LA BASE (MEDIO DE REACCIÓN)</b>	<b>22</b>
<b>II.3.3.1 RECUPERACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LA OXIMA FORMADA</b>	<b>24</b>
<b>II.3.4 EXTRACCIÓN DE LOS AZÚCARES DE LA MUESTRA ALIMENTICIA</b>	<b>25</b>
<b>II.3.5 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS AZÚCARES EN PERA</b>	<b>26</b>
<b>II.3.5.1 PROCEDIMIENTO</b>	<b>27</b>

## **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>III.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO</b>	<b>28</b>
<b>III.2 MODIFICACIÓN DE LA BASE (MEDIO DE REACCIÓN)</b>	<b>31</b>
<b>III.3 FACTOR DE RESPUESTA</b>	<b>34</b>
<b>III.4 ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS OXI-TMS</b>	<b>35</b>
<b>III.5 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO</b>	<b>37</b>

	Página
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	41
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	44
<b><u>ANEXOS</u></b>	
ANEXO I. CROMATOGRAMAS	48
ANEXO II. DATOS ANÁLISIS CUANTITATIVO	60
ANEXO III. LÍMITE DE DETECCIÓN	72
ANEXO IV. DATOS DE ESTABILIDAD (ANÁLISIS ESTADÍSTICO)	77
ANEXO V. COSTOS	90

## **ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS**

Esquema 1.	"CLASIFICACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS"	3
Esquema 2.	"MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS"	4
Esquema 3.	"DIVISIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE ACUERDO A LAS FASES EMPLEADAS (MÓVIL – ESTACIONARIA)"	6
Esquema 4.	"ESCALA DE CONSTANTES DE ACIDEZ (pKa)"	22
Figura 1.	"CROMATÓGRAFO DE GASES"	8
Figura 2.	"INTERACCIÓN DEL ANALITO Y LA FASE ESTACIONARIA"	9
Figura 3.	"REACCIONES EN EQUILIBRIO (MUTARROTACIÓN)"	12
Figura 4.	"FORMACIÓN DE LA OXIMA DE $\alpha$ - D – GLUCOSA"	13
Figura 5.	"FORMACIÓN DE ALDONITRILOS"	13
Figura 6.	"CROMATÓGRAFO DE GASES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES"	19
Figura 7.	"EXTRACCIÓN DE LA OXIMA"	24
Figura 8.	"CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESTÁNDAR INTERNO (EI)"	27
Figura 9.	"IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE AZÚCARES POR CORRELACIÓN CON LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN"	37
Figura 10.	"RESULTADOS COMPARATIVOS DE LA FORMACIÓN DE LOS DERIVADOS OXI-TMS EN DOS MUESTRAS DE JUGO"	38

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.	"CARACTERÍSTICAS DE CLAE Y CG EN EL ANÁLISIS DE AZÚCARES Y ÁCIDOS"	10
Tabla 2.	"PRINCIPALES REACTIVOS DE SILILACIÓN EN ORDEN CRECIENTE DE DONACIÓN DEL GRUPO SILIL"	15
Tabla 3.	"CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS MÉTODOS PRUEBA PARA FORMAR LA OXIMA"	20

Tabla 4.	"CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS MÉTODOS PRUEBA PARA LA FORMACIÓN DEL DERIVADO SILILADO"	21
Tabla 5.	"BASES USADAS COMO MEDIO DE REACCIÓN"	22
Tabla 6	"CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA FORMACIÓN DE LA OXIMA MODIFICANDO EL MEDIO DE REACCIÓN"	23
Tabla 7	"CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA FORMACIÓN DEL DERIVADO SILILADO MODIFICANDO EL MEDIO DE REACCIÓN"	25
Tabla 8	"TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE LOS AZÚCARES"	28
Tabla 9	"COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS PRUEBA PARA FORMAR LOS DERIVADOS SILILADOS"	29
Tabla 10	"COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZANDO DIFERENTES BASES COMO MEDIO DE REACCIÓN"	32
Tabla 11	"FACTOR DE RESPUESTA UTILIZANDO DIFERENTES BASES COMO MEDIO DE REACCIÓN"	34
Tabla 12	"COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN AL MODIFICAR LA BASE DEL MEDIO DE REACCIÓN"	35
Tabla 13	"COMPOSICIÓN CALCULADA"	40

### ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	"COMPARACIÓN DE LOS "MÉTODOS PRUEBA" PARA FORMAR LOS DERIVADOS SILILADOS"	29
Gráfico 2	"COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZANDO DIFERENTES BASES COMO MEDIO DE REACCIÓN"	32
Gráfico 3	"FACTOR DE RESPUESTA UTILIZANDO DIFERENTES BASES COMO MEDIO DE REACCIÓN"	34
Gráfico 4	"COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN AL MODIFICAR LA BASE DEL MEDIO DE REACCIÓN"	36

## **INTRODUCCIÓN**

**El análisis de carbohidratos en frutas, conservas y otros alimentos, está orientado hacia el conocimiento de su calidad general, frescura, maduración y estabilidad.**

**Para el análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos se han diseñado diversos métodos, pero no siempre se ha logrado una identificación plena debido a que cada método posee limitantes. Actualmente la determinación de carbohidratos en presencia de otros compuestos, puede realizarse utilizando técnicas de separación como la Cromatografía de Líquidos (CL) y la Cromatografía de Gases (CG), reconocidos en los Métodos Oficiales de la AOAC.**

**El análisis de carbohidratos por CG requiere su conversión a derivados volátiles, debido a la presencia de hidrógenos activos, que pueden interactuar con moléculas similares o con la fase estacionaria causando interferencias. Dentro de estas reacciones las que han tenido mayor aplicación son la formación de derivados sililados cuyos primeros estudios permitieron establecer las condiciones "estándar" de la reacción. El método empleado consiste en la formación previa de la oxima, su transformación a un derivado sililado y su posterior identificación y cuantificación.**

**Para llevar a cabo la formación de la oxima, generalmente se utiliza clorhidrato de hidroxilamina disuelto en piridina, un reactivo tóxico. Es por ello, que la primera inquietud en este trabajo fue buscar otro disolvente para llevar a cabo esta reacción. Con el objetivo de optimizar las reacciones de sililación para carbohidratos, en base al disolvente empleado; se seleccionaron las siguientes bases: Dimetilformamida, trietilamina, anilina y acetato de sodio. Disminuyendo el tiempo de análisis y el número de subproductos formados; el método finalmente**

**seleccionado, utiliza BSTFA como agente sililante, y anilina como disolvente y medio de reacción, estos reactivos favorecen la reacción en un tiempo corto de análisis y la formación del menor número de subproductos.**

**A continuación se describe la separación de mono y disacáridos en disoluciones "modelo" así como las condiciones óptimas para la identificación y cuantificación de estos analitos en extractos de jugo de pera comercial y jugo de pera "natural", con la finalidad de comparar su constitución y mostrar la efectividad del método seleccionado.**

**Para facilitar su revisión la presente tesis está dividida en 3 capítulos. El primero de estos se dedica a la teoría general de los carbohidratos y comprende la clasificación e importancia de los mismos, así como la teoría general de cromatografía y su desarrollo en el análisis de los carbohidratos.**

**Dentro del segundo capítulo se plantea la metodología y las condiciones experimentales para llevar a cabo esta investigación. En el tercer capítulo se muestran los resultados obtenidos al modificar la base utilizada como medio de la reacción, así como la evaluación de la estabilidad de los derivados formados y los resultados obtenidos del análisis cualitativo y cuantitativo de los jugos "comercial" y "natural" . Las conclusiones y la bibliografía se muestran como parte final de este trabajo.**

## **HIPÓTESIS**

La efectividad de la reacción de sililación, que consiste en sustituir los hidrógenos activos presentes en moléculas como los carbohidratos, depende de dos factores: la fuerza de los reactivos utilizados y la formación de un intermediario, *la oxima*.

Si la cantidad de ésta reacción, favorece la formación de un solo producto y se encuentra en función del  $\Delta pK_a$  entre la base seleccionada y el clorhidrato de hidroxilamina utilizado, entonces, la fuerza de la base utilizada favorecerá la formación de la oxima, repercutiendo en el tiempo y la temperatura de la reacción.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

- **Optimizar las condiciones de la reacción en la formación de los derivados sililados de los carbohidratos y su análisis por Cromatografía de Gases.**

### **ESPECÍFICOS**

- **Desarrollar una metodología que permita eliminar el uso de la piridina como reactivo y medio de reacción, debido a su elevada toxicidad.**
- **Establecer las condiciones de reacción adecuadas para obtener un número mínimo de subproductos que interfieran con la identificación y cuantificación de los carbohidratos de interés, en función de la reacción de formación de la oxima.**
- **Evaluar el procedimiento desarrollado en muestras alimenticias, por ejemplo el jugo de pera.**



## **CAPÍTULO I**

### **ANTECEDENTES**

#### **1.1 CARBOHIDRATOS**

El nombre de carbohidratos se aplicó a aquellos compuestos cuya fórmula empírica correspondía a  $C_n(H_2O)_n$ . Actualmente este término se utiliza para designar polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas y sus derivados<sup>3</sup>. Las unidades más sencillas de los carbohidratos son los compuestos clasificados como mono, di, tri y oligosacáridos, que comúnmente se conocen como azúcares, cuyas propiedades ópticas y químicas están dadas por la presencia de grupos aldehído o cetona, así como grupos hidroxilo que confieren a la molécula sus características polares: la capacidad de formar puentes de hidrógeno y las propiedades de higroscopicidad y solvatación.

##### **1.1.1 PRINCIPALES CARBOHIDRATOS Y SU IMPORTANCIA**

Los carbohidratos constituyen alrededor de la tercera parte del mundo biológico y aproximadamente el 80% del aporte calórico en la dieta. Son importantes en los alimentos ya que representan la principal fuente de energía, forman parte de los tejidos de frutos y vegetales; además, de acuerdo a su estructura química participan en las características de sabor, viscosidad, estructura y color.<sup>4</sup>

Aunque en ciertos casos hay que tomar en cuenta otros azúcares, los más importantes para los analistas de los alimentos son dos hexosas: Glucosa y Fructosa, y tres disacáridos: Sacarosa, Lactosa y Maltosa<sup>4</sup>.

**La D-Glucosa es el monosacárido más común, se encuentra libre en la sangre y en otros numerosos fluidos corporales, así como en los jugos de las plantas. Además es el componente principal de muchos oligosacáridos y polisacáridos.**

**El monosacárido isómero D-Fructosa, es el componente principal del jugo de la fruta y de la miel, en los que se encuentra normalmente acompañado de la Glucosa y la Sacarosa.**

**La Sacarosa, el azúcar de mesa común, es un disacárido compuesto por D-Glucosa y D-Fructosa. Se obtiene de la remolacha azucarera y de la caña de azúcar y es uno de los principales productos comerciales de esta industria.**

**La Lactosa, el azúcar de la leche, es un disacárido compuesto por D-Galactosa y D-Glucosa, se obtiene normalmente a partir del suero de la leche y su importancia radica en la capacidad del organismo para digerirla.**

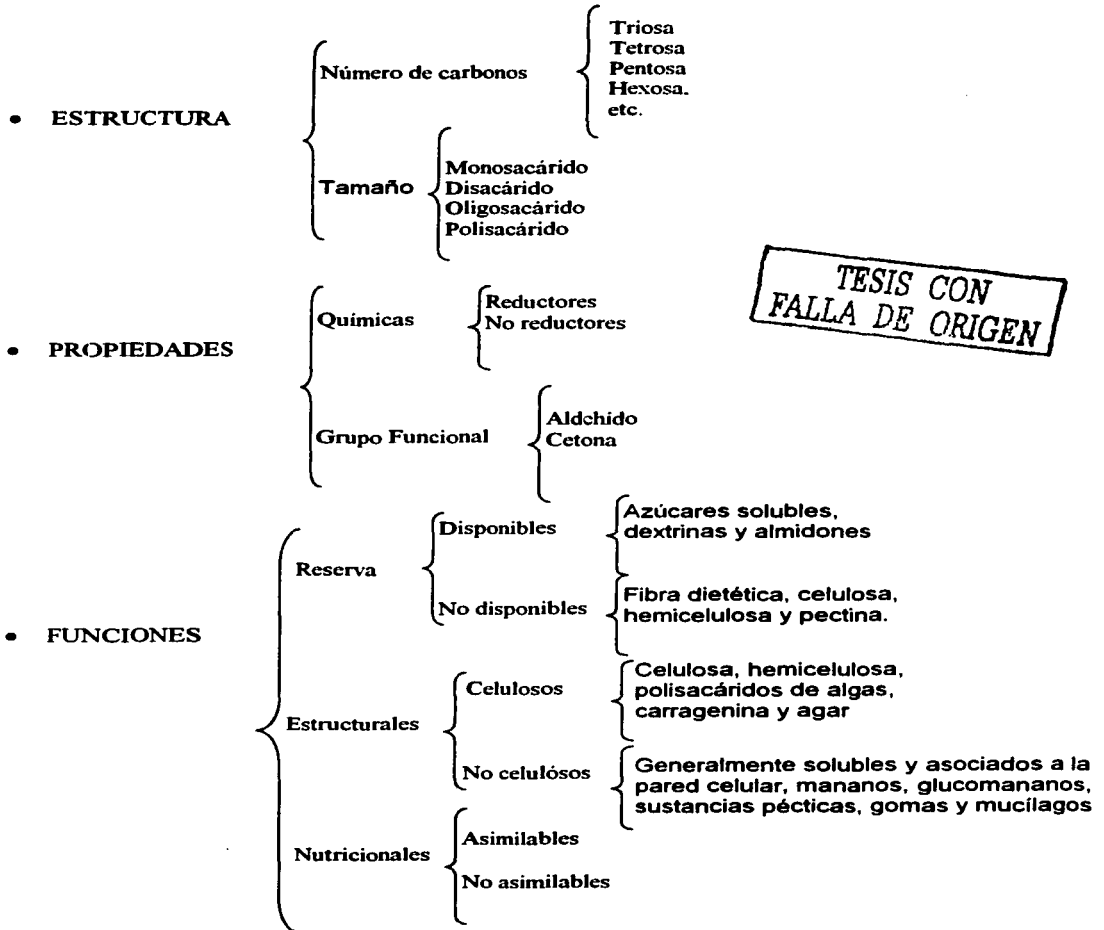
**Cabe mencionar la importancia de algunos polisacáridos como: la celulosa, que es el carbohidrato más abundante en el mundo vegetal; y el almidón cuyas propiedades químicas son ampliamente explotadas en la industria de los alimentos<sup>4</sup>.**

### **I.1.2 CLASIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

**Existen diversas clasificaciones de los carbohidratos, entre las cuales se distinguen: el número de átomos de carbono en la molécula; el número de monosacáridos en su cadena; la orientación de su grupo hidroxilo unido a su carbono asimétrico; sus propiedades químicas: reductor o no reductor; tener un grupo aldehído o cetona en su molécula, etc.**

**Otra clasificación común está basada de acuerdo a sus propiedades o funciones biológicas, tales como: energéticos, estructurales, reguladores o nutricionales (Esquema 1).**

## CLASIFICACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS



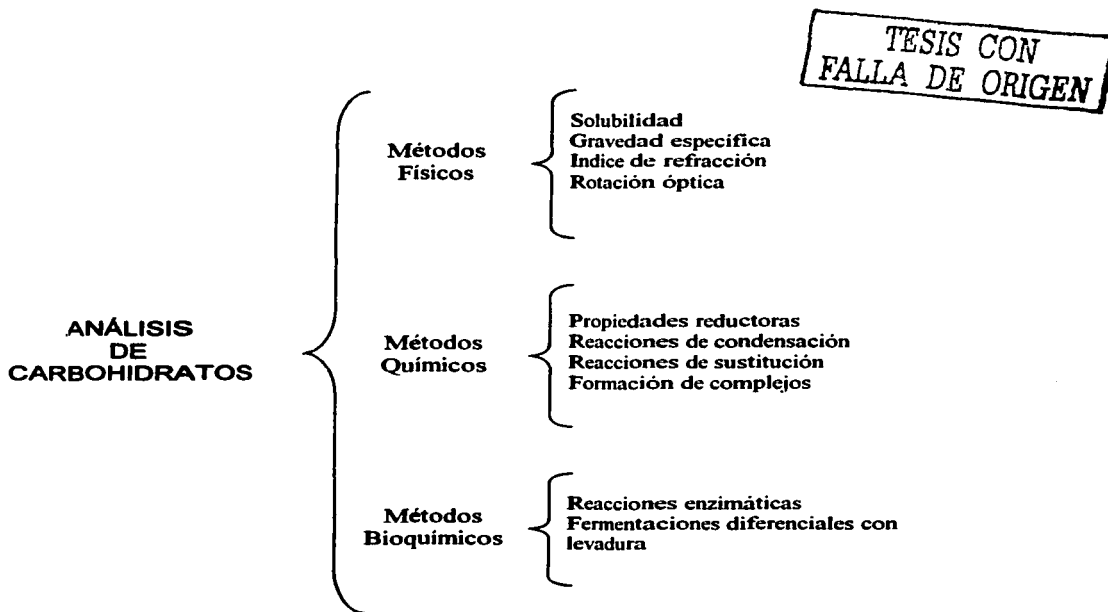
**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**Esquema 1. "Clasificación de los carbohidratos"**

### I.1.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA CARBOHIDRATOS

El interés por el análisis de los carbohidratos no se centra en disoluciones modelo o materiales con un solo componente, sino que los métodos de análisis propuestos deben aplicarse a muestras reales como los alimentos, extractos vegetales y muchos otros productos donde los carbohidratos representan la mayor parte estructural o nutritiva<sup>4,5</sup>.

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de azúcares se han diseñado diversos métodos que permitan alcanzar estos objetivos<sup>6</sup> (Esquema 2).



**Esquema 2. "Métodos de análisis para la identificación y cuantificación de carbohidratos"**

**Los métodos físicos son sencillos y no destructivos. No obstante deben utilizarse para disoluciones puras y clarificadas, son dependientes de la temperatura; aunque poseen la ventaja de ser métodos rápidos, no indican cuales azúcares se detectan.**

**Los métodos químicos pueden ser cualitativos o cuantitativos, son específicos y están basados en las propiedades químicas de la molécula. En medio alcalino los extremos reductores reaccionan con los iones oxidantes, en medios fuertemente ácidos, los monosacáridos se deshidratan y forman derivados coloridos; los grupos hidroxilo presentes, pueden sustituirse por grupos metilo para incrementar la volatilidad de la molécula.**

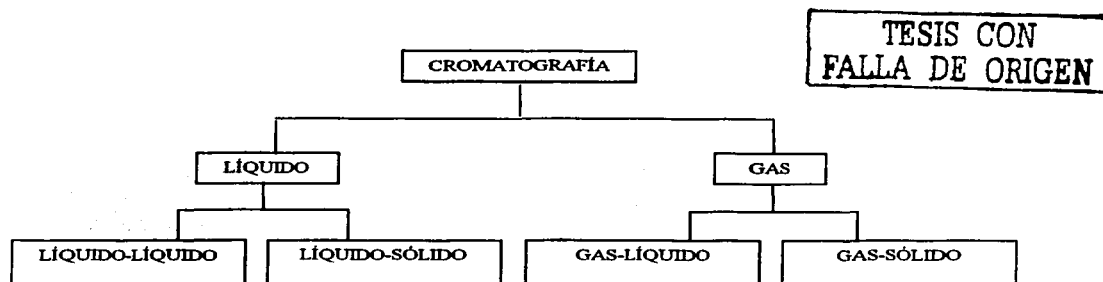
**Los métodos bioquímicos, son métodos indirectos porque los azúcares son determinados con el subproducto de otra reacción. Son métodos específicos, ya que solo se cuantifica el azúcar que reacciona con la enzima. La identificación de mezclas de azúcares utilizando ensayos microbiológicos, no resulta útil cuando se tienen azúcares no fermentables.**

**Algunos de los métodos que se mencionaron anteriormente, presentan algunas desventajas; deben aplicarse más de una vez para lograr la identificación plena, por ejemplo: la reacción con disoluciones reductoras permite conocer la cantidad de azúcares reductores totales, y después de un proceso de hidrólisis, determinar la cantidad de azúcares no reductores. Otros métodos implican que, además del azúcar a determinar, no podrá estar presente ningún otro. Esta condición, por lo general, no siempre se cumple en los alimentos.**

**Actualmente nuevas reacciones y técnicas instrumentales como la Cromatografía de Líquidos y la Cromatografía de Gases, solos o con ayuda de otros sistemas de análisis acoplados<sup>7,8</sup>, permiten que compuestos como los carbohidratos puedan ser identificados y cuantificados con mayor exactitud y precisión en presencia de otros compuestos.**

## I.2 CROMATOGRAFÍA

La Cromatografía se puede definir como la técnica analítica de separación física basada en la diferencia de afinidad del soluto o el analito, entre una fase estacionaria y una fase móvil. Estas diferencias en afinidad implican procesos de adsorción o partición, donde los componentes de una mezcla alcanzan el equilibrio repetidamente entre las dos fases, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido y la fase móvil un líquido o un gas, las combinaciones entre estas fases generan la división o clasificación de la Cromatografía<sup>9</sup> (Esquema 3).



**Esquema 3. "División de la cromatografía de acuerdo a las fases empleadas (móvil - estacionaria)"<sup>9</sup>.**

### I.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

La técnica de Cromatografía de Líquidos, se clasifica de esta manera debido a que utiliza una fase móvil líquida. Dentro de este grupo se consideran la Cromatografía de Partición o Cromatografía Líquido - Líquido, la Cromatografía de Adsorción (Líquido - Sólido), la Cromatografía de Intercambio Iónico, las técnicas de Cromatografía en Papel o Cromatografía en Capa Fina y la Cromatografía de Exclusión, de las cuales se derivan la Cromatografía de Permeación en Gel y la Cromatografía de Filtración en Gel<sup>9</sup>.

El método clásico de Cromatografía Líquida utiliza una columna delgada que sostiene las partículas sólidas, las cuales constituyen la fase estacionaria. El desarrollo de la tecnología ha permitido la producción de partículas menores de 10 micrómetros, las cuales soportan mayores velocidades de flujo y por consiguiente resulta ser un método moderno que implica utilizar un equipo con una mayor tecnología. Para distinguir este nuevo proceso de los métodos clásicos se utiliza el nombre de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) o "High - Performance Liquid Chromatography" (HPLC). Esta técnica produce ventajas como la inyección directa de los analitos, no requiere de altas temperaturas y en algunos casos es una técnica no destructiva<sup>9</sup>.

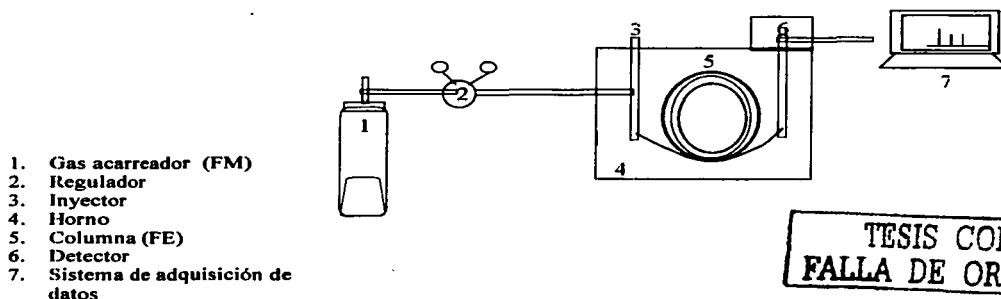
## **I.2.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES**

La Cromatografía de Gases (CG) se ha desarrollado rápidamente desde que fue introducida en 1952 por James y Martín<sup>10</sup>, y actualmente permite que muchos de los componentes de los alimentos sean analizados por esta técnica<sup>11,12,13</sup>.

Por su alta capacidad de separación se prefiere la CG cuando las mezclas son desconocidas y complejas o los analitos se encuentran en baja concentración (trazas). El requisito para ser analizado por esta técnica es que los compuestos sean volátiles o que puedan ser transformados a un derivado volátil; por tal motivo y debido a la complejidad de los alimentos, la CG es generalmente la última etapa de un análisis.

La separación dentro del cromatógrafo se lleva a cabo de la siguiente manera: la muestra es introducida a través de un bloque caliente (Inyector), donde inmediatamente es vaporizada y llevada por una corriente de gas acarreador o Fase Móvil (FM) al interior de la columna o Fase Estacionaria (FE), ahí los constituyentes de la mezcla se distribuyen entre la FM y la FE, esta última puede ser sólida o líquida; al avanzar se forman bandas, que se desplazan a su propia

velocidad a través de la FE. Las moléculas de los compuestos que son más solubles o muestran más afinidad por la fase estacionaria, requieren de un mayor tiempo para eluir que aquellas debidamente orientadas hacia la fase móvil<sup>9</sup>. La medición de la respuesta, se basa en la combustión del material ionizable (Detector de Ionización de Flama), los iones generados producen una caída de voltaje entre los dos electrodos, la cual se registra, amplifica y se envía como señal a un registrador o computadora donde se imprime o registra el cromatograma. A continuación se muestra un cromatógrafo de gases (Figura 1).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 1. "Cromatógrafo de Gases"**

### **I.2.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRFÍA**

Los primeros análisis de carbohidratos por Cromatografía datan de 1958, e implicaban la aplicación de una técnica para formar un derivado, por medio del cual un compuesto puede volverse volátil al hacer un derivado apropiado para el grupo hidroxilo<sup>2</sup>.

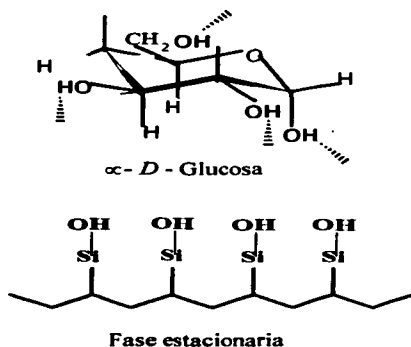
La CG llegó a ser la técnica líder para el análisis de carbohidratos hasta la mitad de 1970 cuando surgieron las primeras aplicaciones de la Cromatografía de



Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), que es una técnica más versátil que permite la inyección directa de la muestra sin previa formación del derivado.

El análisis de carbohidratos por Cromatografía de líquidos (CL) se realiza generalmente con una columna de fase estacionaria de sílice modificada con grupos amino, en donde las fuerzas de unión que se dan en la separación de los mismos son las llamadas bases de "Schiff" entre los grupos amino de la columna y los carbohidratos. El análisis por CLAE presenta ventajas como son: la inmediata separación sin formar previamente un derivado (las formas libres) con una FM adecuada. Sin embargo al compararla con un análisis por CG se observa una baja selectividad y sensibilidad en la separación<sup>7</sup>.

Por su parte el análisis por CG requiere que las sustancias a aislar presenten distinta volatilidad. Como los carbohidratos son esencialmente no volátiles por la presencia de grupos funcionales que contienen átomos de hidrógeno activos (Figura 2), es preciso transformarlos en derivados que lo sean: estos derivados pueden ser éteres de silicio u oximas sililadas<sup>15,16</sup>.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 2." Interacción del analito y la Fase Estacionaria"**

Los grupos OH presentan hidrógenos activos que pueden formar puentes de hidrógeno con la fase estacionaria o reaccionar con otros compuestos

La Cromatografía de Gases es una alternativa atractiva por su capacidad de separación, su simplicidad y su corto tiempo de análisis (Tabla 1).

**TABLA 1**

**CARACTERÍSTICAS DE CLAE Y CG EN EL ANÁLISIS DE AZÚCARES Y ÁCIDOS<sup>7</sup>**

<b>MÉTODO</b>	<b>CLAE</b>		<b>CG</b>	
<b>Característica</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
Muestra	análisis de compuestos iónicos de alto PM		análisis de trazas	técnica preparativa deficiente
Formación del derivado	no necesaria			necesaria
Columna	una/dos		una	
Detector	uno/dos		uno	
Selectividad		baja	excelente	
Resolución		baja	excelente	
Sensibilidad	$10^{-3}$ – $10^{-9}$ gramos		$10^{-3}$ – $10^{-12}$ gramos	
Exactitud	aceptable		aceptable < 1 ppb	
Velocidad		minutos a horas	minutos	

*Las ventajas y desventajas de cada técnica revelan las posibilidades en la resolución de un problema analítico (matriz, número de componentes esperados, la reproducibilidad, los medios disponibles y requeridos, tiempo y costo).*

### 1.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CG

La primera determinación de los carbohidratos por el Método de Cromatografía de Gases con un Detector de Ionización de Flama (CG-DIF), fue hecha en base a la propuesta de Brobst<sup>11</sup>, quien recomendaba la siliilación directa de los azúcares utilizando hexametildisilazano (HMDS) y ácido trifluoroacético (TFA), en un solo paso.

Posteriormente la optimización de las separaciones de los carbohidratos u otros compuestos orgánicos por Cromatografía de Gases aumentó, al utilizar columnas capilares, incrementando el número de azúcares y ácidos determinados en una simple elución, así como la identificación en cantidades a nivel de trazas de ácidos carboxílicos en presencia de azúcares en concentraciones altas<sup>7</sup>, el descubrimiento de las disoluciones sililadas de ácidos y azúcares permitió la cuantificación de estos componentes en concentraciones de un intervalo de 0.001 a 60% (materia seca contenida en las matrices alimenticias)<sup>7</sup>.

### **I.3.1 FORMACIÓN DE DERIVADOS**

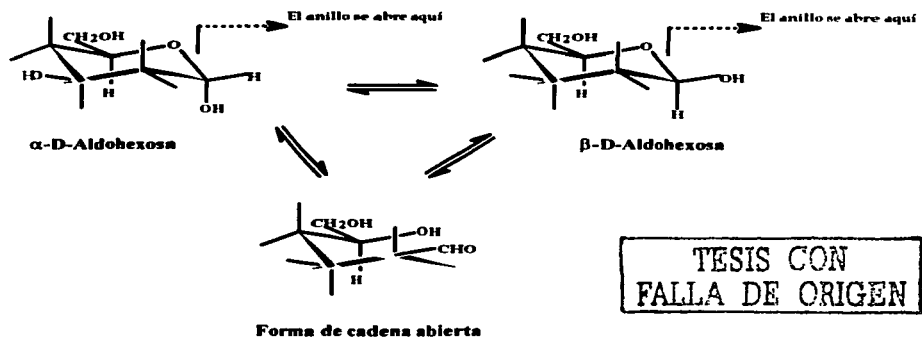
Como se mencionó anteriormente el análisis de carbohidratos por CG requiere su conversión a derivados volátiles, debido a la presencia de hidrógenos activos, que pueden interactuar con moléculas similares o con la fase estacionaria causando interferencias. Dentro de estas reacciones las que han tenido mayor aplicación son la formación de derivados sililados.

La técnica de formación del derivado sililado consiste en sustituir el hidrógeno de los grupos activos, por un grupo trimetilsilil [-Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] formando éteres de trimetilsilicio, conocidos como derivados trimetilsililados (TMS) o sililados; esta sustitución reduce la polaridad del compuesto y la tendencia a formar puentes de hidrógeno; de esta forma el derivado es más volátil que la molécula original. A la vez, la reactividad disminuye y es menor la probabilidad de que reaccionen con otros compuestos.

Las primeras investigaciones para la formación de derivados sililados fueron hechas por Hedgley y Overend<sup>16</sup>, posteriormente Smith y Carlsson estudiaron algunos aspectos analíticos de la reacción, basándose en el análisis de carbohidratos. Años después, en un estudio más profundo de Sweeley y

colaboradores se asentó que los derivados siliados son los más versátiles para el análisis de carbohidratos en Cromatografía de Gas – Líquido (CGL)<sup>1</sup>.

A partir de este estudio se desarrollaron otros trabajos que permitieron mejorar la calidad de este tipo de derivados: para inhibir la anomerización producida por el calentamiento, Bentley y Botlock<sup>17</sup> descubrieron que diluyendo la disolución acuosa del azúcar en N,N-dimetilformamida, disminuía la mutarrotación del azúcar (Figura 3) y entonces la formación del derivado podía ser realizada a bajas temperaturas, mejorando la calidad de los derivados y disminuyendo el tiempo de análisis.



**Figura 3. "Reacciones en equilibrio (Mutarrotación)"**

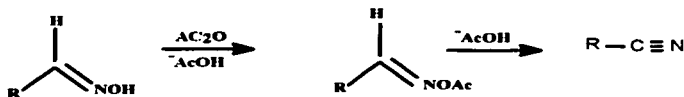
*Los azúcares en disolución se encuentran formando mezclas en equilibrio que constan de una forma predominante de anillo y de una pequeña cantidad con forma de cadena lineal abierta de la molécula.*

El constante interés por formar un solo producto de la reacción, condujo al descubrimiento de otro tipo de derivado: las oximas o metil oximas, obtenidas al eliminar el centro anomérico en el grupo carbonilo (Figura 4).



**Figura 4. "Formación de la oxima de  $\alpha$ -D-glucosa"**

A partir de las oximas se desarrollaron los acetatos de aldonitrilos (Figura 5), pero lamentablemente este grupo no formaba isómeros, no producía compuestos volátiles con las cetosas y la reacción de deshidratación no era cuantitativa para monosacáridos.



**Figura 5. "Formación de aldonitrilos"**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Otros autores como Frank y colaboradores<sup>2</sup> propusieron un método que representó pocas ventajas sobre la reacción directa de la oxima para formar el derivado silylado, ya que requería varias horas para su preparación y las cetosas formaban dos isómeros por azúcar.

Cabe mencionar el constante trabajo de Molnár-Perl y colaboradores<sup>5</sup> quienes descubrieron que era más fácil obtener y separar los trimetilsililderivados de numerosos azúcares y cuyo último trabajo evalúa la formación y estabilidad de los derivados Oxima - trimetilsililados (Oxi-TMS) comparados con los derivados

**Metoxi-TMS derivados,<sup>17,18,19</sup> siendo los derivados Oxi – TMS los mejores en cuanto a rendimiento y estabilidad, limitando el número de productos a los esteroisómeros que actualmente pueden ser separados con el uso de columnas capilares<sup>19</sup>.**

### **I.3.2 TÉCNICA DE FORMACIÓN DE LA OXIMA EN EL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS**

**Las oximas son productos derivados del amoniaco de la forma Y-NH<sub>2</sub>, que por sustitución del oxígeno carboxílico por un átomo de nitrógeno producen compuestos estables tipo imina con aldehídos y cetonas<sup>20</sup>. Son altamente cristalinas por lo que su formación es un método eficiente en la purificación y caracterización de compuestos carbonílicos.**

**En el análisis de carbohidratos la preparación de oximas como intermediarios antes de la formación de los derivados, limita el número de subproductos a dos esteroisómeros.**

**Para la formación de oximas de los carbohidratos se han considerado factores como el tiempo, la temperatura y el disolvente. El método usual para la preparación de oximas involucra un tratamiento de los compuestos carbonílicos con clorhidrato de hidroxilamina en un medio acuoso a pH básico, manteniendo la temperatura entre 60 y 80 ° C por periodos de 30 a 40 minutos. El disolvente generalmente usado es la piridina, un reactivo tóxico y de rápida absorción cutánea.**

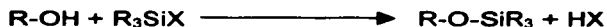
**Los datos publicados en la literatura entre enero de 1990 y diciembre de 1999 involucran avances en la síntesis de estas oximas sin usar disolvente, utilizando técnicas de microondas, llevando a cabo la reacción en cuestión de minutos y con rendimientos del 98%<sup>21</sup>, sin embargo la presencia del disolvente de naturaleza**

básica resulta ser fundamental para disminuir el número de subproductos en este tipo de análisis.

### I.3.3 AGENTES SILILANTES

Los reactivos para la formación de los derivados sililados están constituidos por dos partes: una parte orgánica cuya longitud determina la volatilidad del derivado y una parte reactiva que se une al compuesto.

Los productos de esta reacción son éteres o ésteres de alquilsilil, de acuerdo a la siguiente reacción general:



En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de agentes sililantes

**TABLA 2**  
**PRINCIPALES REACTIVOS DE SILILACIÓN EN ORDEN CRECIENTE DE**  
**DONACIÓN DEL GRUPO SILIL**

REACTIVO	ABREVIATURA
Hexametildisilazano	HMDS
Trimetilclorosilano	TMCS
N-metil-N-trimetilsilil-acetamida	MSA
N-trimetilsilildietilamina	TMSDEA
N-trimetilsilildimetilamina	TMSDMA
N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida	MSTFA
N,O-Bis(trimetilsilil)-acetamida	BSA
N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida	BSTFA
N-trimetilsililimidazol	TMSI

Para formar derivados sililados de azúcares, la mezcla de reactivos que propone Sweeley <sup>23</sup> (HMDS/TMCS), se considera de efectividad regular y apropiada para azúcares en disoluciones anhidras. Otros reactivos más fuertes como la Bis-trimetilsililacetamina (BSA) y Trimetilsililimidazol (TMSI), no requieren utilizarse en mezclas y aseguran una reacción cuantitativa, con la formación de subproductos de mayor volatilidad, minimizando las interferencias en el cromatograma.

Los reactivos fluorados, como el N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA), además de minimizar la acumulación de SiO<sub>2</sub> en el detector de ionización de flama, evitan que aumente la interferencia y que la sensibilidad disminuya. Aunque el reactivo utilizado para llevar a cabo la reacción de sililación es importante, también lo es el tipo de derivado que se desea obtener.

Un estudio anterior a este trabajo<sup>2</sup> muestra los resultados en la formación de los derivados a partir de la oxima del azúcar (oxima-TMS) utilizando el reactivo BSTFA como agente sililante. Este muestra que la formación de los subproductos que interfieren con la reacción es mínima, por lo que es posible identificarlos y cuantificarlos en un "buen" análisis cromatográfico.



## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

La técnica que a continuación se presenta, se basó en un estudio comparativo de la formación de derivados sililados de azúcares, e incluye los siguientes aspectos:

- Selección del método experimental
- Modificación de la base utilizada como medio de reacción
- Optimización del método
- Aplicación del método en un producto comercial

La intención de cada ensayo fue que las reacciones de formación de los derivados sililados fueran rápidas, cuantitativas, de producto final único y estable.

#### **II.1 REACTIVOS Y MATERIALES**

##### **ESTÁNDARES**

- Arabinosa, Xilosa, Fructosa, Glucosa, Sacarosa. Grado analítico (Merck – México, S.A.)
- Salicina (2 – [hidroximetil]fenil  $\beta$ -D-glucopirósido) (Sigma Chemical Co.)

##### **REACTIVOS**

- Clorhidrato de hidroxilamina  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (J.T. Baker S.A. de C.V.)
- Ácido trifluoroacético  $\text{CF}_3\text{-COOH}$  (Pierce Chemical Co.)
- N,O-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (Pierce Chemical Co.)
- Hexametil-disilazano (HMDS) (Pierce Chemical Co.)
- Piridina seca (J.T. Baker S.A. de C.V.)

- **Disolución acuosa de hidroxilamina al 50% (J.T. Baker S.A. de C.V.)**
- **Etanol (J.T. Baker S.A. de C.V.)**
- **Agua destilada**
- **Hidróxido de Potasio KOH (J.T. Baker S.A. de C.V.)**
- **Sulfato de sodio Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J.T. Baker S.A. de C.V.)**
- **Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker S.A. de C.V.)**
- **Nitrógeno cromatográfico 99.998% (INFRA S.A. de C.V.)**

#### **MUESTRAS**

- **Peras (variedad Bartlet) y el jugo comercial marca "Gerber", adquiridos en un supermercado.**

#### **EQUIPO**

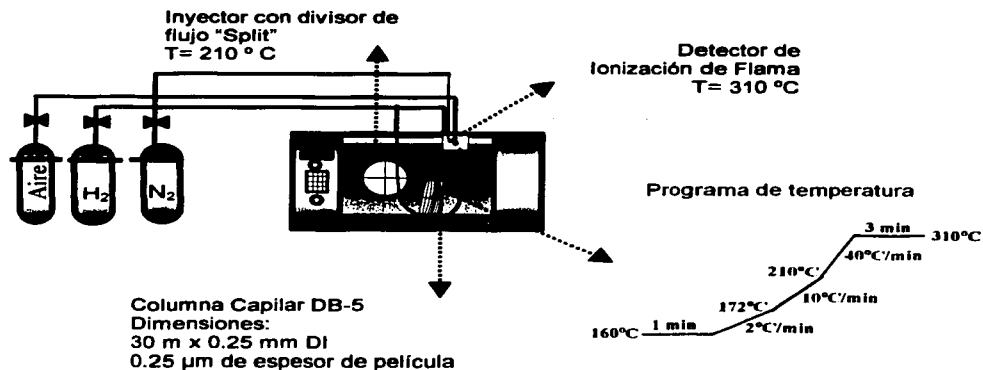
- **Ultrasonido**
- **Cromatógrafo de Gases, marca Hewlett Packard modelo 5890 serie II equipado con un inyector con divisor de flujo "split" y un detector de ionización de flama (FID). La adquisición de los resultados se obtiene en un procesador de datos con el programa apropiado (Figura 6).**

## **II.2 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS EXPERIMENTALES**

Las condiciones experimentales para el cromatógrafo de gases se resumen en la Figura 6.

Gas acarreador	Hidrógeno
Flujo de la columna	2.7 cc/min
Relación "Split"	1:33

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura 6. "Cromatógrafo de gases y condiciones experimentales"**

## II.3 PROCEDIMIENTO

### II.3.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO EXPERIMENTAL

Para establecer la técnica de formación de los derivados sililados se eligieron tres métodos reportados en la bibliografía, considerando los siguientes aspectos:

- El método debe contener la formación previa de la oxima del azúcar y la formación posterior del derivado sililado (Oxi-TMS).
- El tiempo de la reacción para llevar a cabo la formación del derivado sililado debe ser menor a dos horas.

Los Métodos seleccionados se nombraron "Métodos Prueba", cada método se probó con disoluciones de estándares en las condiciones de tiempo y temperatura reportadas originalmente<sup>2,26,28</sup> (Tabla 3 y 4).

## II.3.2 PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS OXIMA -TMS

### II.3.2.1 OBTENCIÓN DE LA OXIMA

En un vial de reacción se pesaron 10 mg de la muestra o estándar, se disolvieron la disolución de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  de la concentración correspondiente al método utilizado, el vial se tapó y se colocó en un baño a la temperatura y tiempo indicados (Tabla 3), posteriormente se enfrió a temperatura ambiente.

**TABLA 3**  
**CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS "MÉTODOS PRUEBA"**  
**PARA FORMAR LA OXIMA**

<b>FORMACIÓN DE LA OXIMA</b>		
<b>MÉTODO*</b>	<b><math>\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}</math> en piridina</b>	<b>T / tiempo</b>
1 <sup>a</sup>	1 mL de disolución de 50 mg/mL	80 °C / 30 min
2 <sup>b</sup>	1.6 mL de disolución de 20 mg/ml	70 °C / 40 min
3 <sup>c</sup>	0.6 ml de disolución de 30 mg/mL	70 °C / 40 min

T= temperatura

\*Tomados de la bibliografía: a) Martínez, 1995; b) Streeter, 1998; c) Adams, 1999.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### II.3.2.2 OBTENCIÓN DEL DERIVADO SILILADO

Para la formación del derivado Oxi-TMS se agregó el reactivo sililante correspondiente a cada método, se tapó el vial, se agitó y se colocó en un baño a calentamiento como indica cada método probado (Tabla 4).

**TABLA 4**  
**CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS MÉTODOS PRUEBA PARA LA FORMACIÓN DEL DERIVADO SILILADO**

MÉTODO*	REACTIVO SILILANTE**	AGITACIÓN	T/ tiempo
1 <sup>a</sup>	0.3 mL BSTFA	Magnética 1 min	80 °C 10 min
2 <sup>b</sup>	0.5 mL de HMDS/TFA (10:1)	Magnética 1 min	T° Ambiente 10 min
3 <sup>c</sup>	0.1 mL de HMDS/TFA (10:1)	Ultrasonido 50 °C / 30 min	100 °C 60 min

T= temperatura

Tomados de la bibliografía: a) Martínez, 1995; b) Streeter, 1998; c) Adams, 1999.

\*\*La tabla reporta el reactivo "original" encontrado en la literatura para la formación del derivado sillado (HMDS/TFA o BSTFA), sin embargo cada método fue ensayado con ambos reactivos.

Al final de la reacción, se tomó un microlitro de la disolución y se inyectó directamente al cromatógrafo de gases. La identificación de los azúcares se hizo por correlación con los tiempos de retención de los estándares de cada uno; para hacer la evaluación cualitativa de los tres "Métodos Prueba" se tomó como base el tiempo y la temperatura de la reacción, así como la limpieza de la misma (número de subproductos formados). El Método seleccionado, en base a las características anteriores se nombró "Método Base".

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### II.3.3 MODIFICACIÓN DE LA BASE (MEDIO DE LA REACCIÓN)

Una vez establecidas y comprobadas las condiciones experimentales, el siguiente paso fue modificar la base del medio de reacción, eliminando el uso de la piridina, debido a que este reactivo está involucrado con altos riesgos en el sistema urinario y renal del analista.

Con ayuda de la bibliografía consultada se eligieron algunos reactivos que pudieran contribuir a este objetivo<sup>31</sup> (Tabla 5).

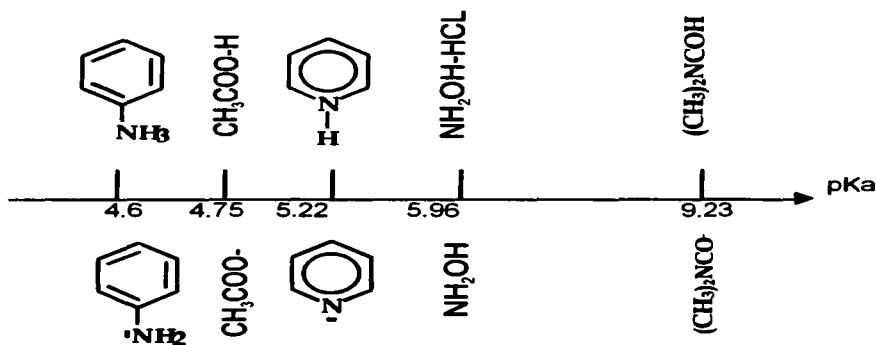
TABLA 5

BASES USADAS COMO MEDIO DE REACCIÓN\*

BASE	pKa
Anilina	4.60
Acetato	4.75
Piridina	5.22
Hidroxilamina	5.96
Dimetilformamida	9.23

\*Valores tomados de Ringbom, 1903.

TESIS CON  
TALLA DE ORIGEN



Esquema 4. "Escala de constantes de acidez (pKa)"

El primer paso fue conocer la solubilidad del clorhidrato de la hidroxilamina en la base a probar, con información reportada en la literatura y en su caso con ensayos experimentales.

Posteriormente se realizó una cinética de reacción, utilizando el "Método Prueba 1", sustituyendo a la piridina por cada base seleccionada, probando temperatura ambiente y de 30 a 80 °C a diferentes tiempos de reacción, de 20 a 60 min. con la finalidad de optimizar estas variables para obtener el menor número de subproductos de cada estándar. Se prepararon las disoluciones necesarias para llevar a cabo la reacción de la formación de la oxima, (Tabla 6).

**TABLA 6**

**CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA FORMACIÓN  
DE LA OXIMA MODIFICANDO EL MEDIO DE REACCIÓN**

<b>BASE PROBADA (NH<sub>2</sub>OH·HCl 50 mg / mL)</b>	<b>T / tiempo °</b>	<b>EXTRACCIÓN</b>
Anilina	25 °C / 10 min	
Acetato de sodio*	60 °C / 30 min	MeCN
Piridina	80 °C / 30 min	
Dimetilformamida	80 °C / 30 min	
Hidroxilamina*	60 °C / 20 min	MeCN

c-Condiciones óptimas de cada método, obtenidas a través de una cinética de reacción.

MeCN - Acetonitrilo

\* Requieren de la extracción previa de la oxima a su siliación, además del uso de N<sub>2</sub> para la evaporación total del disolvente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

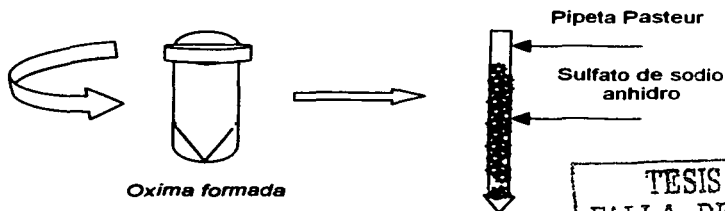
### II.3.3.1 RECUPERACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LA OXIMA FORMADA

La formación del derivado sililado debe realizarse en condiciones anhidras, debido a que el reactivo sililante reacciona primero con el agua presente y disminuye la efectividad de la reacción.

En los casos que es necesario utilizar agua como disolvente, se realiza el siguiente procedimiento (Figura 7):

1. Se pesan 10 mg de muestra y se redisuelven en 1 mL de la disolución de hidroxilamina.
2. Después de terminada la reacción de formación de la oxima, se agregan dos volúmenes de acetato de etilo para extraer la oxima y se agita.
3. Se forman dos fases, la fase orgánica se hace pasar por una pipeta pasteur con sulfato de sodio.
4. La fase eluida se evapora a sequedad con nitrógeno y el residuo se redisuelve en 90  $\mu$ L de acetonitrilo.

Agregar 2 volúmenes  
de Acetato de etilo  
+  
Agitación



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 7." Extracción de la oxima"



Posteriormente para la formación del derivado Oxi-TMS se agregó el reactivo sililante se agitó y se colocó en un baño a calentamiento como indica el método probado (Tabla 7).

**TABLA 7**  
**CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA FORMACIÓN**  
**DEL DERIVADO SILILADO MODIFICANDO EL MEDIO DE REACCIÓN**

<b>BASE PRÓBADA</b>	<b>T / tiempo <sup>c</sup></b>
Anilina	25 °C / 10 min
Acetato de sodio	60 °C / 10 min
Piridina	80 °C / 10 min
Hidroxilamina	60 °C / 10 min
Dimetilformamida	80 °C / 10 min

c - Condiciones óptimas de cada método, obtenidas a través de una cinética de reacción.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El último paso de este trabajo, fue aplicar el procedimiento a un producto alimenticio, para comprobar que el método es reproducible, tanto en muestras de concentración conocida como en muestras comerciales.

#### II.3.4 EXTRACCIÓN DE LOS AZÚCARES DE LA MUESTRA ALIMENTICIA

Para el análisis de azúcares en alimentos por Cromatografía de Gases (CG), se trabajó con un extracto. Para este ensayo la extracción de los azúcares se realizó simultáneamente en muestras de pera tipo "Bartlet" y jugo de pera marca "Gerber". En el caso de la pera se separó el mesorcapio (pulpa) del pericarpio (cáscara) pesando aproximadamente 5 g de pulpa, se cortó finamente con un cuchillo y se

**maceró en un mortero. Se adicionó un volumen de 12.5 mL de agua destilada, para después calentar a punto de ebullición, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con etanol acuoso al 96% (10 mL). Posteriormente se filtró al vacío, y el filtrado se pasó cuantitativamente a un volumen de 25 mL con etanol. Esta disolución se evaporó a sequedad para obtener el extracto.**

**La extracción de azúcares en el jugo comercial se realizó de forma similar. Se tomaron 12.5 mL de jugo y se calentó a ebullición, se filtró y se aforó a 25 mL como se describe anteriormente, para posteriormente obtener el extracto.**

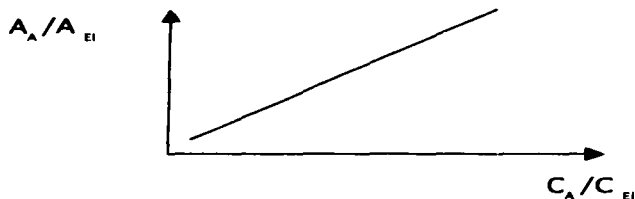
### **II.3.5 ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS AZÚCARES EN PERA**

**A partir del cromatograma, que es un registro gráfico del análisis de la muestra, donde se indica el perfil de los componentes y dos parámetros de información: el tiempo de retención y el área del pico, se identificó el número de componentes de las muestras (jugo "comercial" y jugo "natural"), comparando los tiempos de retención obtenidos para cada estándar de azúcar, estableciendo si existe alguna diferencia entre estas dos muestras.**

**La base del análisis cuantitativo establece que bajo condiciones constantes del análisis cromatográfico, el área bajo la curva del pico, es proporcional a la concentración del componente.**

**El método de estándar interno o calibración relativa, no requiere volúmenes exactos de inyección y permite trabajar con inyectores con división de flujo "split". El estándar interno es un compuesto de estructura química similar a la sustancia que se va a analizar, que no debe estar presente en la muestra y no debe reaccionar con ella. Este soluto produce un pico bien definido y debe eluir cerca del compuesto de interés.**

Para la cuantificación por estándar interno (EI) se construyó una curva de calibración, relacionando el área de cada soluto y la del EI, con la concentración de cada soluto y la del EI (Figura 8).



**Figura 8. "Curva de calibración por Estándar Interno (EI)"**  
 $A_A$  = área del analito;  $A_{EI}$  = área del Estándar Interno;  
 $C_A$  = concentración del analito;  $C_{EI}$  = concentración del EI

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### II.3.5.1 PROCEDIMIENTO

- Preparar disoluciones de diferentes concentraciones de los estándares de los componentes a cuantificar y una concentración constante de EI.
- Separación cromatográfica
- Obtener el área de los picos (respuesta)
- Construir la curva de calibración

Para cuantificar una muestra de concentración desconocida, se preparó una disolución de la muestra a la cual se le agregó una cantidad de estándar interno (EI) igual a la utilizada en la curva de calibración. Se determinó la relación de concentración del analito en función del EI y se interpoló en la curva de calibración.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

Para cada estándar de azúcar se elaboró su derivado Oxi-TMS y se registraron los tiempos de retención obtenidos, que se muestran en la tabla 8.

**TABLA 8**  
**TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE LOS AZÚCARES**

<b>ESTÁNDAR</b>	<b>TIEMPO DE RETENCIÓN</b> <i>tr (min)</i>
<i>Xilosa</i>	5.611
<i>Arabinosa</i>	5.613
<i>Fructosa</i>	9.256 <sup>a</sup> , 9.378 <sup>b</sup>
<i>Glucosa</i>	10.122 <sup>a</sup> , 10.315 <sup>b</sup>
<i>Salicina (EI)*</i>	13.129
<i>Sacarosa</i>	13.516

\*EI= Estándar Interno;  $\alpha$  y  $\beta$  = Isómero alfa y beta  
Condiciones cromatográficas: Columna DB-5, temperatura del inyector y del Detector (250 °C y 320 °C).

Calentamiento de temperatura programada (Temperatura inicial 160 °C, calentando a 2 °C / min hasta 175 °C; segundo incremento de temperatura a 10 °C / min hasta 210 °C; tercer incremento de temperatura a 40 °C / min hasta 310 °C y manteniendo por 3 min.). Se inyectó 1  $\mu$ L de muestra.

#### III.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO

Una vez identificado el tiempo de retención de cada azúcar se experimentó con tres métodos llamados "Métodos Prueba", estos se eligieron de la bibliografía consultada por tener un tiempo de reacción menor a dos horas. (ver anexo 1, cromatogramas 1,2,3). Los resultados obtenidos fueron evaluados en base al número de subproductos formados y al tiempo total necesario para llevar a cabo la reacción (Tabla 9 y Gráfico 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 9**

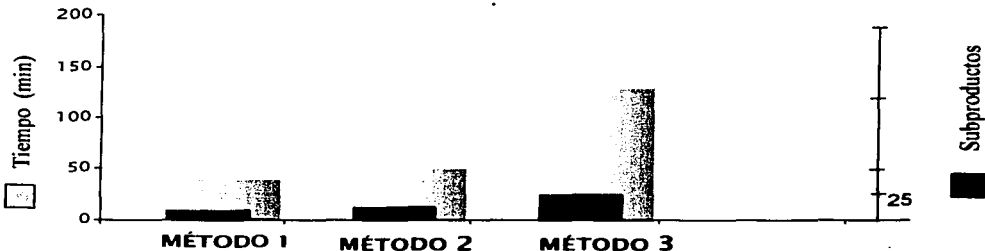
**COMPARACIÓN DE LOS "MÉTODOS PRUEBA" PARA FORMAR  
LOS DERIVADOS SILILADOS**

MÉTODO PRUEBA*	PRODUCTOS FORMADOS						TIEMPO TOTAL DE REACCIÓN (min)
	A y X	F	G	S	EI	T	
1 <sup>a</sup>	2	2	2	1	1	8	40
2 <sup>b</sup>	3	4	4	1	1	13	50
3 <sup>c</sup>	6	2	5	7	4	24	130

\*Tomados de la bibliografía: a) Martínez, 1995; b) Streeter, 1998; c) Adams, 1999  
 A y X = Mezcla de Estándares de Arabinosa y Xilosa; F = Estándar de Fructosa;  
 G = Estándar de Glucosa; S = Estándar de Sacarosa; EI = Estándar Interno (Salicina);  
 T = Número de Productos Totales.

**GRÁFICO 1**

**COMPARACIÓN DE LOS "MÉTODOS PRUEBA" PARA FORMAR  
LOS DERIVADOS SILILADOS**



**Comparativo de los "Métodos Prueba"**

Se comparan los "Métodos prueba" en base al número de subproductos y el tiempo total de la reacción. El "Método de Prueba 1 proporciona las condiciones de reacción óptimas para llevar a cabo la formación de los derivados sililados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cada método sugiere la concentración de hidroxilamina, el reactivo sililante, el tiempo de incubación y la temperatura apropiada. Adicionalmente se trabajó con concentraciones de clorhidrato de hidroxilamina de 20, 30 y 50 mg; resultando ser la concentración 50 mg/mL la mejor, por disminuir el número de subproductos formados.

En el caso del reactivo sililante, algunos métodos utilizan BSTFA y otros utilizan la mezcla HMDS/TFA; se observó que aquellos métodos en los cuales se utilizaba la mezcla HMDS/TFA producían más subproductos, ante estos resultados se modificó la temperatura y el tiempo de reacción utilizados, sin lograr mejorar los resultados (ver Anexo 1, cromatograma 4). Con base a lo anterior se eligió utilizar BSTFA como reactivo sililante, cuya fuerza de donación de grupos silil es alta, lo que aseguraba que la formación de los derivados TMS fuera cuantitativa.

Aunque la formación de los subproductos es importante, también lo es el tiempo de la reacción, debido a que actualmente se necesitan métodos de análisis rápidos y sensibles que permitan tratar más muestras en menor tiempo, lo cual se ve reflejado en el aspecto económico; además en un tratamiento prolongado, como la temperatura y el tiempo aplicados en el "Método Prueba 3", se presentan inconvenientes tales como la hidrólisis de los disacáridos, causando interferencia en un análisis cuantitativo, en este caso se observó la hidrólisis de la sacarosa en sus monosacáridos glucosa y fructosa (ver Anexo 1, cromatograma 5).

En general como se muestra en los cromatogramas 1, 2 y 3 (ver anexo 1), el mejor "Método Prueba" para llevar a cabo las reacciones de sililación es el "Método Prueba 1", porque permite obtener una reacción relativamente "limpia" en un tiempo corto, en comparación de los "Métodos Prueba 2 y 3" que producen un número mayor de subproductos.

### **III.2 MODIFICACIÓN DE LA BASE (MEDIO DE REACCIÓN)**

Una vez encontradas las condiciones “óptimas” para llevar a cabo las reacciones de sililación, el siguiente paso fue sustituir la base utilizada como medio de la reacción, fundamentando este cambio en que la piridina es un reactivo tóxico, de rápida absorción cutánea y en uso constante altera las funciones urinarias y la producción de hormonas masculinas.

A partir del “Método Prueba 1”, el cual requiere de un tiempo de reacción de 40 minutos, se lleva a cabo la formación de la oxima para cada estándar de azúcar, usando: dimetilformamida, anilina y acetato de sodio, para liberar la hidroxilamina de su clorhidrato, así como una disolución de hidroxilamina “libre”.

Cada método se optimiza para que no exista formación de subproductos (Gráfico 2) mediante una cinética de reacción, probando desde temperatura ambiente hasta 80 °C por períodos de 10, 20, 30, 40 y 50 minutos de incubación, manteniendo constante la concentración de la disolución de clorhidrato de hidroxilamina (50 mg / mL), para obtener la respuesta máxima equivalente a la formación de los derivados Oxi-TMS.

Los métodos optimizados se llamaron “Métodos Base”. La evaluación de estos métodos se realiza en función del tiempo total de la reacción, la estabilidad y el costo (Tabla 10 y Gráfico 2).

**TABLA 10**  
**COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZANDO DIFERENTES BASES**  
**COMO MEDIO DE REACCIÓN**

BASE	TIEMPO DE REACCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS	TIEMPO TOTAL	SUBPRODUCTOS FORMADOS
Anilina	10 min	15 min	25 min	**
Acetato de Sodio	50 min	15 min	65 min	**
Piridina	40 min	15 min	55 min	**
Hidroxilamina	40 min	15 min	55 min	**
Dimetilformamida	40 min	15 min	55 min	No hay reacción

\*Requiere de N<sub>2</sub> para evaporar el disolvente en la oxima formada y Acetonitrilo para redisolverta

\*\*No hay formación de subproductos

**GRÁFICO 2**

**COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZANDO DIFERENTES BASES**  
**COMO MEDIO DE REACCIÓN**



TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN



Las bases utilizadas fueron elegidas con respecto a la solubilidad del clorhidrato de hidroxilamina en estas, sin embargo la dimetilformamida que fue el mejor disolvente no dio buenos resultados, debido a que es una base débil y no lleva a cabo la reacción para la formación de la oxima. Esta característica fue fundamental para seleccionar la siguiente base; la anilina, la cual posee una constante de basicidad similar a la piridina (Tabla 5) permite llevar a cabo la reacción de formación de la oxima a temperatura ambiente, reduciendo el tiempo de reacción a 10 minutos en agitación constante, con el agente sililante.

La reacción de sililación con anilina, se lleva a cabo a temperatura de 25 °C. Se observa que al incrementarse la temperatura después de los 60 °C, el área de los pico de los analitos va disminuyendo. Sin embargo este método también presenta un inconveniente, la solubilidad del clorhidrato de hidroxilamina en anilina es deficiente y se debe preparar una disolución por cada análisis a realizar, además la anilina es un reactivo más tóxico que la piridina.

Otra base probada fue el acetato de sodio, la reacción de formación de la oxima se lleva a cabo óptimamente a 60 °C calentando durante 30 minutos. Sin embargo se utiliza agua para su disolución, lo cual implica un gran inconveniente debido a que las reacciones de sililación deben llevarse a cabo en condiciones anhidras. Para eliminar el agua que disuelve la oxima formada se utilizó un flujo de nitrógeno y posteriormente acetonitrilo para su disolución.

Este último ensayo sirvió para encontrar un procedimiento que permitiera utilizar una disolución de hidroxilamina “libre” de su clorhidrato, cuya presentación a la venta es una disolución al 50 % con agua. La reacción para la formación de la oxima se lleva a cabo a una temperatura de 75 °C calentando durante 30 minutos; en esta reacción el disolvente utilizado para la extracción de la oxima es fundamental porque desempeña el mismo papel que la piridina, además de solubilizar la oxima para evitar la mutarrotación del azúcar. El mejor disolvente encontrado fue el acetonitrilo.

### III. 3 FACTOR DE RESPUESTA

Con las condiciones de reacción adecuadas para cada "Método Base", el siguiente paso fue medir el factor de respuesta relativo de cada analito, en función de la base utilizada para llevar a cabo la reacción de formación de los derivados sililados (Tabla 11 y Gráfico 3).

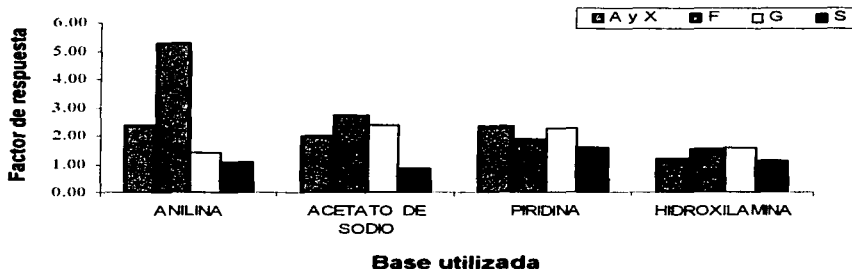
**TABLA 11**  
**FACTOR DE RESPUESTA UTILIZANDO DIFERENTES BASES**  
**COMO MEDIO DE REACCIÓN**

BASE	AA/AEI			
	A y X	FRUCTOSA	GLUCOSA	SACAROSA
ANILINA	2.397	5.265	1.387	1.045
ACETATO DE SODIO	2.009	2.704	2.380	0.835
PIRIDINA	2.322	1.877	2.235	1.591
HIDROXILAMINA	1.204	1.523	1.587	1.108

AA = Área del Analito; AEI = Área del estándar interno; AyX = Mezcla de Arabinosa y Xilosa

**GRAFICO 3**

**FACTOR DE RESPUESTA UTILIZANDO DIFERENTES BASES**  
**COMO MEDIO DE REACCIÓN**



**"Factor de respuesta de los estándares de los azúcares"**

Se muestran los factores de respuesta correspondientes a los estándares de los azúcares utilizados para llevar a cabo las reacciones de formación de los derivados Oxi-TMS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III.4 ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS OXI-TMS

En el análisis cuantitativo es importante la estabilidad de los analitos porque permiten la reproducibilidad de los resultados y disminuyen en una pequeña parte el costo, debido a que pueden conservarse los derivados de los estándares y utilizarse para más de un análisis.

Los derivados fueron preparados con piridina, anilina, acetato de sodio, e Hidroxilamina "Libre" de su clorhidrato, cuyos pKa van de menor a mayor valor, anilina -4.60 y dimetilformamida -5.96 (ver Tabla 5).

La estabilidad de los derivados se midió a través de la respuesta (área) con respecto al tiempo, comparando muestras que permanecieron a temperatura de refrigeración (4 °C) contra muestras que permanecieron a temperatura ambiente (25 °C).

Con respecto a los resultados obtenidos (Tabla 12 y Gráfico 4) se observa que la fuerza de la base permite una mayor estabilidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

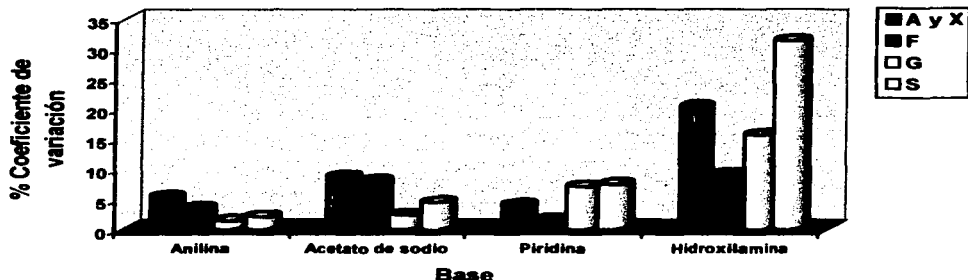
**TABLA 12**  
**COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN AL MODIFICAR**  
**LA BASE DEL MEDIO DE REACCIÓN**

BASE UTILIZADA	COEFICIENTE DE VARIACIÓN			
	A Y X	F	G	S
ANILINA	5.4	3.5	1.4	2.1
ACETATO DE SODIO	8.7	8.0	2.4	4.5
PIRIDINA	4.1	1.6	7.1	7.5
HIDROXILAMINA	20.4	9.1	15.7	31.3

\* Ver Anexo IV, Estabilidad de los derivados Oxi-TMS

**GRAFICO 4**

**COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN  
AL MODIFICAR LA BASE DEL MEDIO DE LA REACCIÓN**



En el caso de las muestras preparadas con anilina se observó que los coeficientes de variación (CV) de las áreas de las muestras que permanecieron a temperatura ambiente, son menores al 5%, al igual que las muestras que permanecieron en refrigeración.

En las muestras preparadas con acetato de sodio se observó que el coeficiente de variación de la mezcla Arabinosa y Xilosa, fue mayor al 5% aún en las muestras refrigeradas.

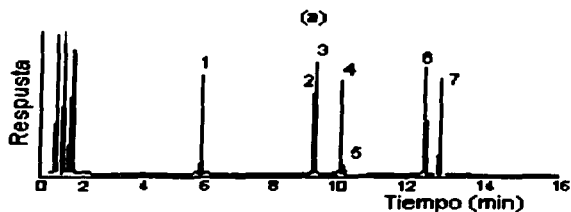
Para las muestras en las que se utilizó piridina como disolvente, las áreas correspondientes a los estándares de Glucosa y Sacarosa tienen un % CV mayor al 7%. Por último, las muestras preparadas con hidroxilamina fueron estables sólo en refrigeración.

Adicionalmente se aplicó una prueba estadística sobre la media de cada conjunto de datos y también sobre la variación estándar, lo que permite concluir que los derivados más estables son aquellos en los que se utilizó anilina como disolvente (ver Anexo IV).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

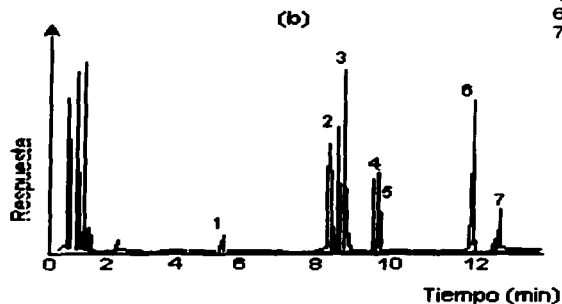
### III.5 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

A partir de los cromatogramas y con ayuda del estándar interno adicionado, comparando los tiempos de retención obtenidos para cada estándar de azúcar, con la finalidad de identificar los componentes presentes en las muestras de jugo como se muestra en la Figura 9.



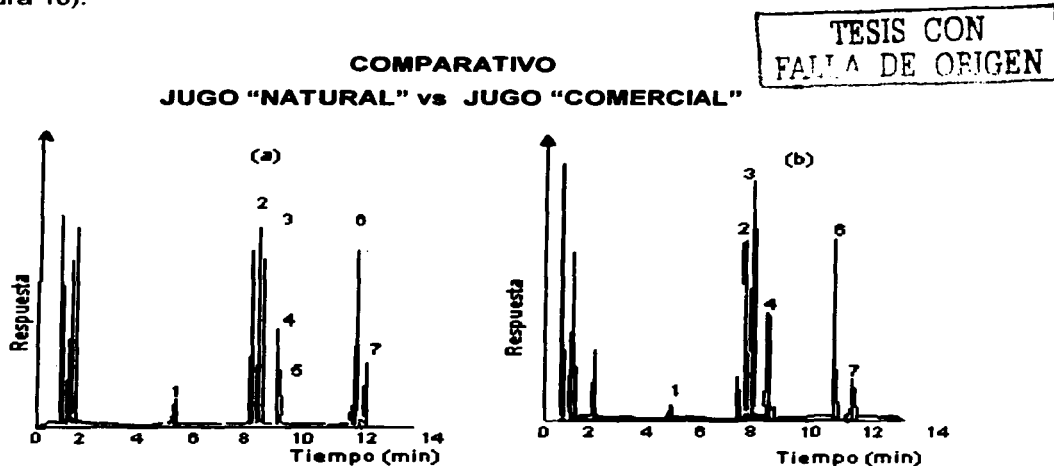
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1. Mezcla Arabinosa y Xilosa
- 2 y 3. Isómeros de Fructosa
- 4 y 5. Isómeros de Glucosa
6. Salicina (El)
7. Sacarosa



**Figura 9. "Identificación de los azúcares por correlación de los tiempos de retención de sus estándares"**  
En la figura 9(a) se presenta el análisis cromatográfico de una mezcla de estándares de azúcares, para determinar el tiempo de retención de cada analito y correlacionar e identificar estos azúcares en una muestra de jugo, figura 9(b).

Para poder utilizar la correlación de los tiempos de retención de los estándares con los tiempos de retención de las muestras fue necesario mantener constantes las condiciones del análisis cromatográfico (que se utilizaron al inyectar las disoluciones estándar y las muestras de jugo). Para verificar la identidad de cada analito, se enriqueció la muestra con su estándar y se analizó por Cromatografía de Gases. El aumento de respuesta en cada caso, dió resultado positivo en la identificación; además de esto se modificaron algunos de los parámetros cromatográficos como el flujo y la fase estacionaria, verificando de nuevo la identidad. De acuerdo a lo anterior, los resultados mostraron una gran similitud en la constitución de un jugo preparado en el laboratorio y la muestra comercial (Figura 10).



**Figura 10. "Resultados comparativos de la formación y separación de los derivados Oxi-TMS de las muestra de jugo "Natural" (a) y Jugo "Comercial" (b)**

**La identificación de azúcares para el jugo natural fue la siguiente: 1)Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2 y 3) Isómeros de Fructosa, 4)Isómeros de Glucosa, 5) El y 6) Sacarosa. Para el jugo marca "Gerber", se identificaron los siguientes azúcares: 1)Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2 y 3) Isómeros de Fructosa, 4)Isómeros de Glucosa, 5 ) El y 6)Sacarosa.**

**En las muestras de jugo se observó un pico adicional al los obtenidos cuando se trabajó con la mezcla de estándares y se recurrió a adiciones patrón del estándar de fructosa para su identificación, este analito no fue identificado como un subproducto de la fructosa, consideramos necesario la aplicación de otros sistemas de análisis para su identificación, como por ejemplo el sistema acoplado CG-EM.**

**Con respecto al programa de elución cromatográfica, éste no permite una adecuada resolución de los azúcares Xilosa y Arabinosa, debido a que tienen una mínima diferencia en sus tiempos de retención (tr), los cuales, como se observa en la figura 18 (cromatograma 8a y 8b) su resolución es menor a 1, para resolver este inconveniente se probaron diferentes programas de temperatura y diferentes polaridades de la fase estacionaria, sin lograr una mayor resolución de estos solutos, por lo que se decidió reportar la cantidad como la mezcla de estos analitos..**

**Con respecto al análisis cuantitativo, se compararon los datos obtenidos experimentalmente con datos publicados en la bibliografía (tabla 13)**

**La concentración mínima detectable con el método seleccionado para Arabinosa y Xilosa fue de 0.076 mg / mL; para Fructosa fue 0.21 mg / mL; para Glucosa fue 0.13 mg / mL y para Sacarosa 0.25 mg / mL.**

**TABLA 13****COMPOSICIÓN CALCULADA**

COMPONENTE	% GRAMOS JN		% GRAMOS JG	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
<i>Glucosa</i>	10.89	11.39	13.19	12.69
<i>Fructosa</i>	56.40	59.20	58.7	56.26
<i>Sacarosa</i>	1.63	1.70	0.70	0.60
<i>Otros (Xilosa y Arabinosa)</i>	1.90	1.96	0.70	0.66

*Se analizaron dos muestras por triplicado. JN = Jugo natural preparado en el laboratorio; JG = Jugo comercial marca "Gerber". ° Brix Jugo Natural = 13; ° Brix Jugo "Gerber" = 12.5.*

Se observó que el porcentaje de cada uno de los carbohidratos presentes en la pera, es muy variable (Ver anexo 4), éstos dependen de factores como: la variedad del fruto, la zona de cultivo, la temporada, la maduración, la recolección, etc.

El perfil de carbohidratos encontrados en las muestras de jugo "natural" y jugo marca "comercial" es muy similar, en ellos destaca el alto porcentaje de Fructosa en relación con el porcentaje de Sacarosa, es decir, el porcentaje de Fructosa se encuentran en un intervalo del 55 al 57%, mientras que el porcentaje de Sacarosa van de 0.6 al 1.7%, siendo las concentraciones de sacarosa en el jugo "comercial" más bajas que, las encontradas en el jugo natural. Otro azúcar mayoritario es la Glucosa, la cual se encuentra en un intervalo de 10 al 13%, y su concentración en ambos jugos es muy similar. Cabe mencionar que el método permite identificar otros azúcares minoritarios como son la Arabinosa y la xilosa, cuyo porcentaje determinado fue alrededor de 2 % en el jugo natural y 0.7% en el jugo de marca "comercial".

Todo lo anterior es indicativo de la constitución prácticamente igual a la determinada en el jugo "natural" cuyo azúcar predominante también fue la Fructosa.



## **CONCLUSIONES**

- Los derivados Oxi- TMS son ampliamente utilizados en la determinación de un gran número de sustratos analizados por CG. En esta reacción se forma la oxima correspondiente antes de efectuar la reacción de sililación, con el objetivo de obtener menos subproductos. En esta reacción es importante controlar: (1) la base utilizada para liberar la  $\text{NH}_2\text{OH}$  de su clorhidrato y formar la oxima, (2) los reactivos sililantes.
- Los diferentes reactivos utilizados para estas reacciones son: 1) bases: Piridina, Anilina, Acetato de Sodio y Dimetilformamida; 2) agentes sililantes: HMDS, TMCS, HMDS-TFA y BSTFA. Siendo la piridina y el BSTFA los más utilizados por su efectividad en la cuantitividad de la reacción.
- La piridina es un reactivo tóxico, pero su uso en este tipo de reacciones es preferible al de otras bases debido a que el procedimiento empleado no es laborioso, el tiempo de reacción es relativamente corto (55 min) y los derivados son muy estables por periodos hasta de una semana. Su uso lleva implícito todas las precauciones necesarias.
- El uso de acetato de sodio como base y medio de reacción podría ser considerado como una alternativa porque es un reactivo relativamente económico y menos tóxico, la optimización de esta reacción da por resultado la formación de un menor número de subproductos. Sin embargo su uso

**involucra un tiempo de análisis mayor (65 min), debido a que se requiere de la extracción previa de la oxima, a la reacción de sililación.**

- **Con respecto al uso de la disolución de Hidroxilamina “Libre” de su clorhidrato se pensaría que es el mejor método debido a que no es necesaria la base para llevar a cabo la reacción de formación de la oxima, y por lo tanto la toxicidad de la reacción disminuiría, sin embargo la presencia de la base es fundamental para la estabilidad de los derivados, este método también involucra un tiempo de análisis mayor (65 min), además de que el costo se incrementa por el uso de Nitrógeno (seco). Para esta reacción es importante disminuir la mutarrotación de los azúcares y mantener la oxima soluble lo cual implica la importancia del disolvente.**
- **El mejor método para llevar a cabo la formación de los derivados sililados fue el que utiliza anilina como base (medio de reacción) y se seleccionó de acuerdo a la finalidad del trabajo, la cual se encuentra en función de un tiempo de reacción corto y la formación de un mínimo número de subproductos. La reacción con anilina se lleva a cabo a temperatura ambiente y el tiempo total de análisis es aproximadamente la mitad del tiempo requerido al utilizar piridina como medio de reacción (25 min); los derivados sililados son estables y el costo de esta reacción resulta ser el más económico; sin embargo, la toxicidad de la anilina es mayor a la de la piridina.**

**Debido a la alta toxicidad de la anilina, este método propuesto como el "óptimo" deja de serlo, por lo que se propone buscar nuevas alternativas en la optimización del análisis de carbohidratos por Cromatografía de Gases.**

- **Todos los métodos mencionados anteriormente permiten llevar a cabo un análisis cromatográfico "limpio", es decir, el menor número de subproductos formados por cada analito.**
- **El método seleccionado permite ser aplicado a frutos de características similares y productos relacionados como jugos y concentrados de frutas, para establecer su autenticidad con base al perfil de azúcares.**
- **La concentración mínima detectable con el método seleccionado para Arabinosa y Xilosa fue de 0.076 mg / mL; para Fructosa fue 0.21 mg / mL; para Glucosa fue 0.13 mg / mL y para Sacarosa 0.25 mg / mL.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup>. 1995.
- 2) Martínez, P.J. Estudio comparativo de la formación de derivados siliados de azúcares. Tesis licenciatura, UNAM, México, D.F., 1995.
- 3) Pine, S.H. Química Orgánica. 2ª ed. Mc-Graw Hill México, (1991) p 508
- 4) Baduí, S. Química de los alimentos. 2ª ed. Alhambra Mexicana, México (1990). p 46.
- 5) Molnár-Perl, I. & Morvai, M. Quantitative analysis of carbohydrates. Food Addit. and Contam. 9, 505-510 (1992).
- 6) Pearson, D. Laboratory techniques in food analysis. Edit. John Wiley & Sons, New York (1973) p56.
- 7) Molnár-Perl, I. Simultaneous quantitation of acids and sugars by chromatography: gas or high – performance liquid chromatography? J. Chromat. A , 845 181-195 (1999).
- 8) Shen, X. Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry . J. Cromat. A, 811 [1/2] 47-59 (1998).
- 9) Harris, C. Análisis químico cuantitativo. Cap. 23 "Métodos Cromatográficos". 3ª ed. Grupo Editorial Iberoamericana, México (1992). p 637-692.
- 10) James, A.T. & Martin, E. Gas-liquid partition chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acids. J.Biochem. 50, 679-681 (1952).
- 11) Brobst, K.M. & Lott, C.E. Determination of components carbohydrates on tubercule. Cereal Chem. 43, 35-40 (1966).
- 12) Boldizsár, I. & Horváth, K. Simultaneous gc-ms quantitation of acids and sugars in the hydrolyzates of inmunostimulant, water-soluble polysaccharides of basidiomycetes. Chromat. 47 [7/8], (1998).

- 13) Hama, Y., Nakagawa, H., Kurosawa, M. & Sumi, T. A Gas Chromatographic method for the sugar analysis of 3,6-anhydrogalactose-containing algal galactans. *Anal. Biochem.* 265, 42-48 (1998).
- 14) Molnar-Perl, I. & Morvai, M. Simultaneous determination of organic acids in apples by gas-liquid chromatography. *J. Chromat.* 520 201-207 (1990).
- 15) Greene, T.W. & Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1991, p.214.
- 16) Hedgley, E.J. & Overend, W.G. Trimethylsilyl derivatives of carbohydrates. *Chem. & Ind. London U.K.* 378-380, (1960).
- 17) Bentley, M. & Botlock, N. A gas chromatography method for analysis of anomeric carbohydrates and for determination of mutarotation coefficients. *Anal. Biochem.* 20 312-320 (1967).
- 18) Schaffer, K.J. & Morel Du Boil, P.G. Quantitative gas chromatographic analysis of sucrose in the presence of sugar oximes using a buffered oximation reagent and glass capillary columns. *J. Chromatogr.* 207, 213-220, (1981).
- 19) Molnár-Perl, I. & Horváth, K. Simultaneous quantitation of mono, di and trisaccharides as their TMS ether oxime derivatives by CG-MS: I. In model solutions. *Chromat.* 45, 321-327 (1997).
- 20) Molnár-Perl, I. & Horváth, K. Simultaneous quantitation of mono, di and trisaccharides as their TMS ether oxime derivatives: II. In honey. *Chromat.* 45, 328-335 (1997).
- 21) Hajépour, A.R., Shadpour E. & Gholamhasan I. A rapid and convenient synthesis of oximes in dry media under microwave irradiation. *J. Chem. Research.* (S), 228 - 229 (1999).
- 22) Reus, W.H. *An Introduction to organic chemistry*. Holden-Day, US. 375-376 (1977).
- 23) Horváth, K. & Molnár-Perl, I. Simultaneous GC-MS quantitation of o-phosphoric, aliphatic and aromatic carboxylic acids, and sugars as their TMS derivatives: in honeys. *Chromat.* 48 [1/2], 75-80 (1998).

- 24) Katona, Zs., Sass, P. & Molnár-Perl, I. Simultaneous determination of sugars, sugars alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromat. A*, **847** 91-102 (1999).
- 25) Landers, J.P. *Handbook of Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1994.
- 26) Adams, M.A., Chen, Z., Landam, P., & Colmer T.D., Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Anal. Biochem.* **266**, 77-84 (1999).
- 27) Sweeley, C.C. & Bentley, B. J. Gas-Liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Amer. Chem. Soc.* **85** 2497 (1963).
- 28) Streeter, J.G. & Strimbu, C.E. Simultaneous extraction and derivatization of carbohydrates from green plant tissues for analysis by gas-liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **259**, 253-257 (1998).
- 29) Tisza, S., Sass, P. & Molnár-Perl, I. Optimization of the simultaneous determination of acids and sugars as their trimethylsilyl (oxime) derivatives by gas chromatography-mass spectrometry and determination of the composition of six apple varieties *J. Chrom. A*, **676**, 461-468 (1994).
- 30) Horváth, K. & Molnár-Perl I. Simultaneous GC-MS Quantitation of o-phosphoric, aliphatic and aromatic carboxylic acids, proline, hydroxymethylfurfural and sugars as their TMS derivatives: in honeys. *Chromat.* **48** [1/2], 95-101 (1998).
- 31) Ringbom, A. *J. Chemical Analysis*, vol. 6, (1903)
- 32) Courtin, C. M., Van den Broeck, H. & Delcour, J. A. Determination of reducing end sugars residues in oligo- and polysaccharides by gas-liquid chromatography. *J. Chrom. A*, **866** 97 –104 (2000).
- 33) Puciová, E. & Toma, S., Synthesis of oximes in the microwave oven. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **57**, (1992).
- 34) Molnár-Perl, I. Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. *J. Chrom. A*, **891** 1-32 (2000).

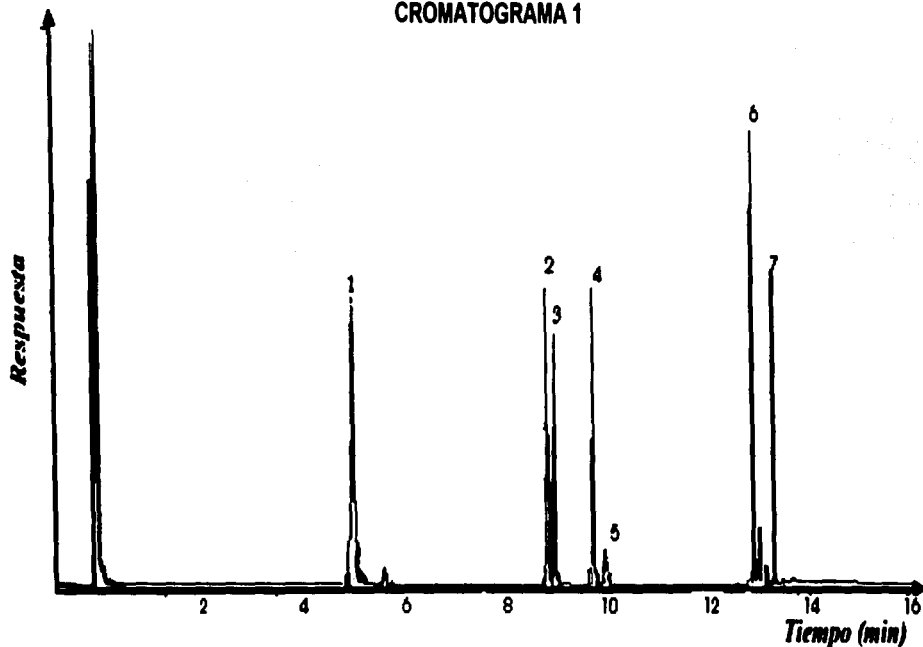
- 35) Hajjipour, A.R., Mohammadpoor-baltork, I., Nikbaghat, K., Imanzadeh, G. Solid-phase synthesis of oximas. *Synth. Commun.* **29**(10), 1697-1701 (1999).
- 36) Chapman, G.W. & Horvat, R.J. Determination of nonvolatile acids and sugar from fruits and sweet potato extracts by capillary GLC and GLC/MS. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 947-950 (1998).
- 37) Abele E. & Luckevics E., Recent advances in the chemistry of oximes. *Organic preparations and procedures int.*, **32**(3), 235-264 (2000).

**ANEXOS**



**ANEXO I**  
**CROMATOGRAMAS**

## CROMATOGRAMA 1



**Figura 11. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCARES UTILIZANDO EL "MÉTODO DE PRUEBA" 1**

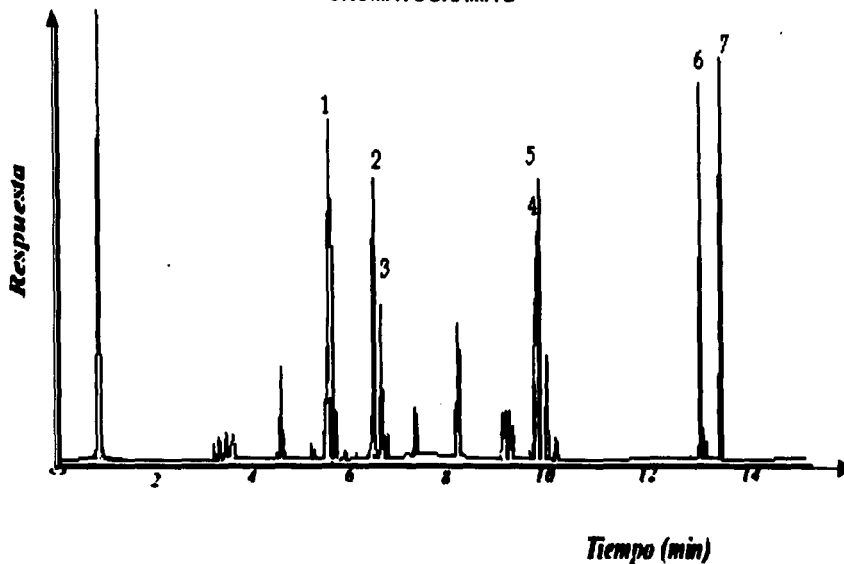
Separación de derivados Oxi-TMS de una mezcla de estándares de azúcares por CG utilizando una columna capilar DB-5. Analitos identificados: 1) Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2, 3) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Fructosa, 4 y 5) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Glucosa, 6) Salicina (EI) y 7) Sacarosa.

La formación de los derivados se realizó con el "Método de Prueba 1", el cual utiliza una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina (50 mg/mL) para la formación de la oxima y BSTFA como agente sililante. Condiciones cromatográficas: Inyector 250 °C, detector 310 °C; se utilizó un gradiente de temperatura para el calentamiento de la columna.

T° inicial 160 °C; Primera rampa de calentamiento, incremento de 2 °C por min hasta 172 °C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10 °C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50 °C por min hasta 310 °C manteniendo esta temperatura por 3 minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CROMATOGRAMA 2



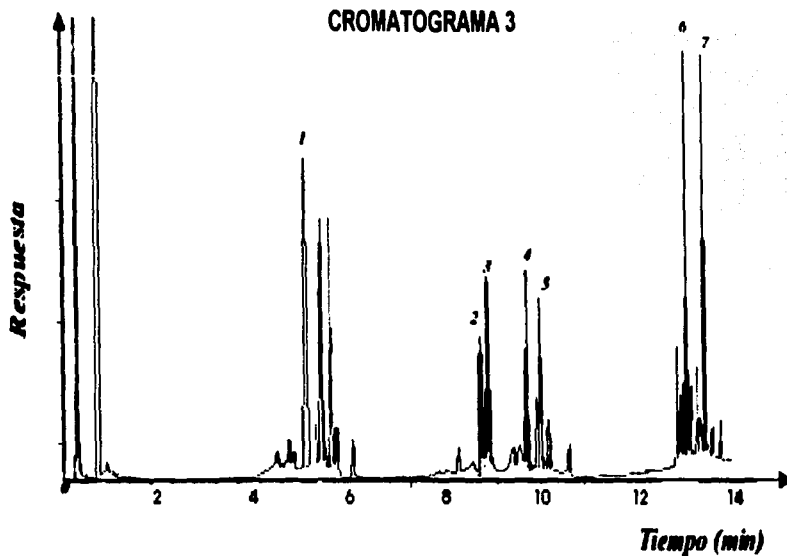
**Figura 12. SEPARACIÓN CROMATOGRAFICA PARA UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCARES UTILIZANDO EL "MÉTODO DE PRUEBA" 2**

Separación de derivados Oxi-TMS de una mezcla de estándares de azúcares por CG utilizando una columna capilar DB-5. Analitos identificados: 1)Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2 y 3)Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Fructosa, 4 y 5) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Glucosa, 6)Salicina (EI) y 7)Sacarosa. Los picos de menor altura no identificados corresponden a subproductos formados por la reacción, lo cual indica que la reacción por este método no es completa.

La formación de derivados se realizó con el "Método de Prueba 2", el cual utiliza una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina (20 mg/mL) para la formación de la oxima y mezcla de HMDS-TFA como agente silante. Condiciones cromatográficas: Inyector 250 °C, detector 310 °C; se utilizó un gradiente de temperatura para el calentamiento de la columna.

T° inicial 160 °C; Primera rampa de calentamiento, incremento de 2° C por min hasta 172 °C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10 °C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50 °C por min hasta 310 °C manteniendo esta temperatura por 3 minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



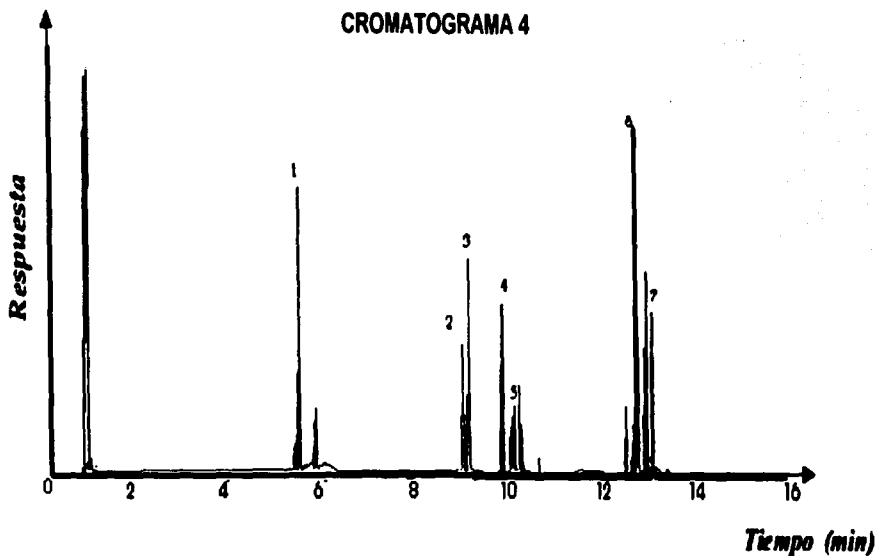
**Figura 13. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCARES UTILIZANDO EL "MÉTODO DE PRUEBA" 3**

Separación de derivados Oxi -TMS de una mezcla de estándares de azúcares por CG utilizando una columna capilar DB-5. Analitos identificados: 1)Arabinosa y Xilosa, 2 y 3)Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Fructosa, 4 y 5)Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Glucosa, 6)Salicina (EI) y 7)Sacarosa. Los picos no identificados son subproductos formados por la poca efectividad del método utilizado.

La formación de derivados se realizó con el "Método de Prueba 3", el cual utiliza una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina (30 mg/mL) para la formación de la oxima y la mezcla HMDS/TFA como agente siliante.

Condiciones cromatográficas: Inyector 250 °C, detector 310 °C; se utilizó un gradiente de temperatura para el calentamiento de la columna. T° inicial 160° C; Primera rampa de calentamiento, incremento de 2° C por min hasta 172° C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10° C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50° C por min hasta 310° C manteniendo esta temperatura por 3 minutos.

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN



**Figura 14. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCARES UTILIZANDO EL "MÉTODO DE PRUEBA" 2**

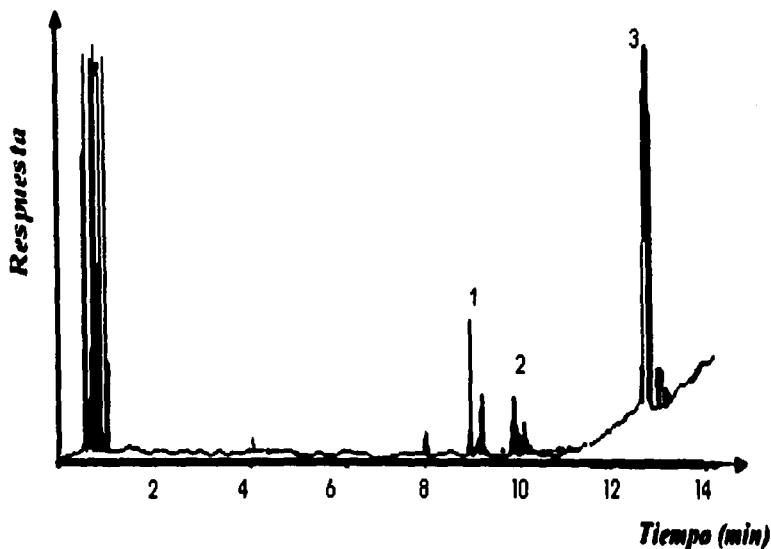
Separación de derivados Oxi-TMS de una mezcla de estándares de azúcares por CG utilizando una columna capilar DB-5. Analitos identificados: 1)Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2 y 3)Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Fructosa, 4 y 5) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Glucosa, 6)Salicina (EI) y 7)Sacarosa. Los picos de menor altura no identificados corresponden a subproductos formados por la reacción, lo cual indica que la reacción por este método no es completa.

La formación de derivados se realizó con el "Método de Prueba 2", el cual utiliza una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina para la formación de la oxima BSTFA como agente sililante. Condiciones cromatográficas: inyector 250 °C, detector 310 °C; se utilizó un gradiente de temperatura para el calentamiento de la columna.

T° inicial 160 °C; Primera rampa de calentamiento, incremento de 2 °C por min hasta 172 °C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10 °C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50 °C por min hasta 310 °C manteniendo esta temperatura por 3 minutos.

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

## CROMATOGRAMA 5



**Figura 15. HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA**

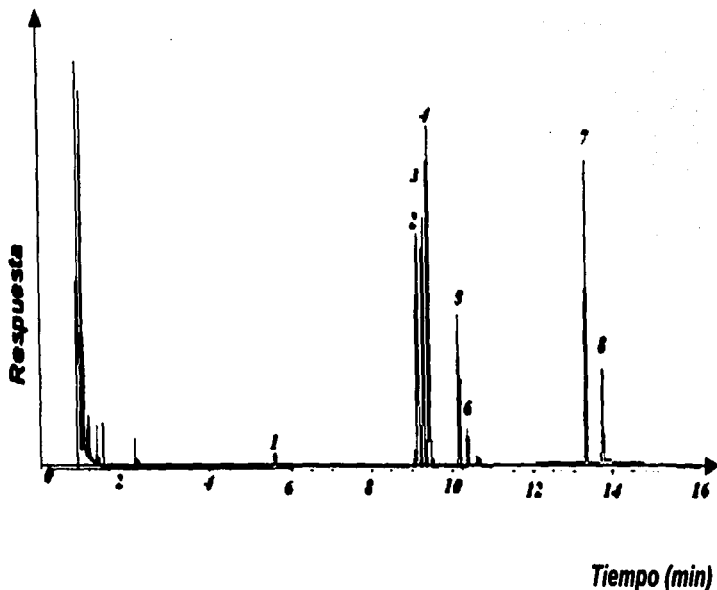
Las condiciones de tiempo y temperatura a las cuales se lleva a cabo el proceso de formación de los derivados siliados pueden ser drásticas, de tal forma que se lleve a cabo la hidrólisis de uno de los analitos.

El presente cromatograma muestra la hidrólisis de la Sacarosa (3), en sus respectivos monosacáridos: Fructosa (1) y Glucosa (2), utilizando el "Método de Prueba 3" para llevar a cabo la formación de los derivados siliados.

Condiciones cromatográficas: Temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 320 °C, se aplicó un programa de calentamiento a la columna de temperatura inicial: 160 °C incrementando la temperatura a 2° por min. hasta 175 °C; después con la segunda rampa se calentó a 10 °C por min. hasta 210° C; la tercera rampa se calentó a 40 °C por min. hasta 310 °C, manteniendo esta temperatura por 3 minutos.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CROMATOGRAMA 6



**Figura 16. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN UNA MUESTRA DE JUGO "NATURAL"**

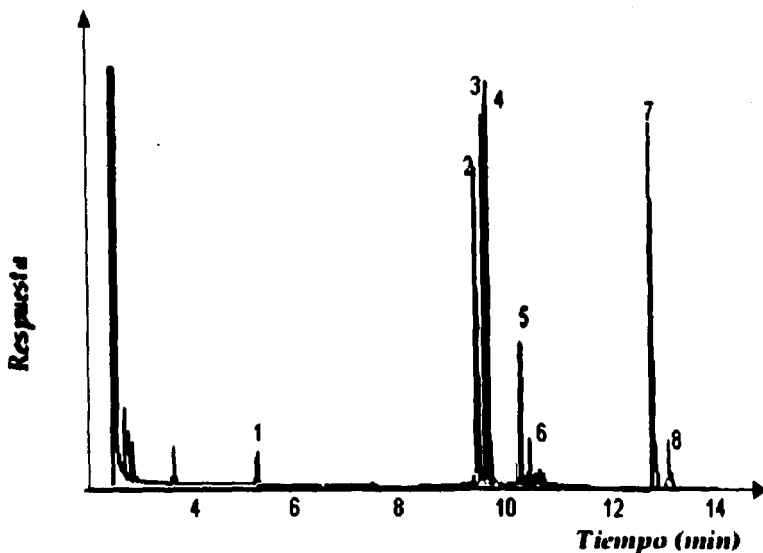
Separación de los derivados Oxi-TMS de una muestra de jugo "Natural" utilizando una columna capilar DB-5. Azúcares identificados: 1)Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 3y4) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Fructosa, 5y6) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Glucosa, 7) Salicina (EI) y 8) Sacarosa. El analito clasificado con el número 2, no fue identificado.

La formación de derivados se realizó con modificación de la base al Método de Prueba 1, utilizando una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en anilina para la formación de la oxima y BSTFA como agente silitante.

Condiciones cromatográficas: Inyector 250 °C, Detector 310 °C; se utilizó un Gradiente de Temperatura para el calentamiento de la columna. T° inicial 160 °C; Primera rampa de calentamiento, incremento de 2 °C por min hasta 172 °C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10 °C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50 °C por min hasta 310 °C manteniendo esta temperatura por 3 min.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CROMATOGRAMA 7



**Figura 17. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN UNA MUESTRA DE JUGO "COMERCIAL"**

Separación de los derivados Oxi-TMS de una muestra de jugo "Gerber" utilizando una columna capilar DB-5. Azúcares identificados: 1) Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 3y4) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Fructosa, 5y6) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Glucosa, 7) Salicina (E1) y 8) Sacarosa. El analito clasificado con el número 2, no fue identificado.

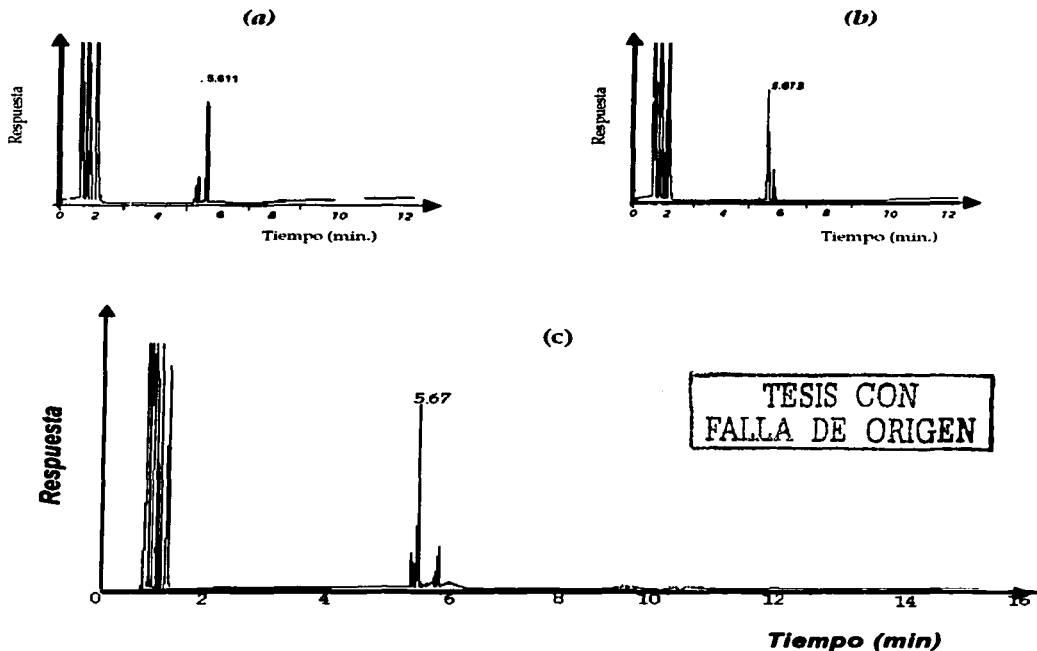
La formación de derivados se realizó con modificación de la base al Método de Prueba 1, utilizando una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en anilina para la formación de la oxima y BSTFA como agente sililante.

Condiciones cromatográficas: Inyector 250 °C, detector 310 °C; se utilizó un gradiente de temperatura para el calentamiento de la columna. T° inicial 160 °C; Primera rampa de calentamiento, incremento de 2 °C por min hasta 172 °C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10 °C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50 °C por min hasta 310 °C manteniendo esta temperatura por 3 min.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## CROMATOGRAMA 8

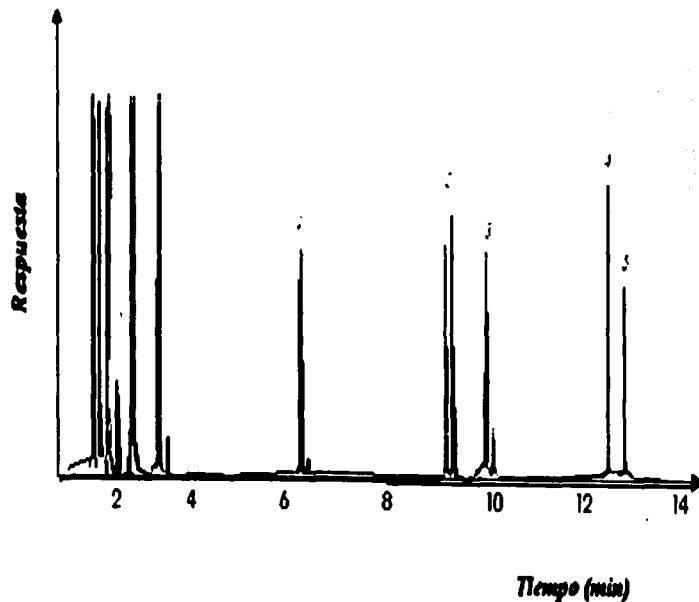


**Figura 18. ARABINOSA Y XILOSA**

Se observa la elución conjunta de los analitos Arabinosa y Xilosa, los cuales poseen tiempos de retención muy cercanos (8a) y (8b)..

El programa de elución cromatográfica no fue eficiente para poder separar estos analitos (8c). Temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 320 °C, se aplicó un programa de calentamiento a la columna de temperatura inicial: 160 °C incrementando la temperatura a 2 °C por min. hasta 175 °C; con la segunda rampa se calentó a 10 °C por min. hasta 210 °C y la tercera rampa se calentó a 40 °C por min. hasta 310 °C, manteniéndose por 3 minutos.

## CROMATOGRAMA 9



**Figura 19. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCAR UTILIZANDO EL "MÉTODO BASE ANILINA"**

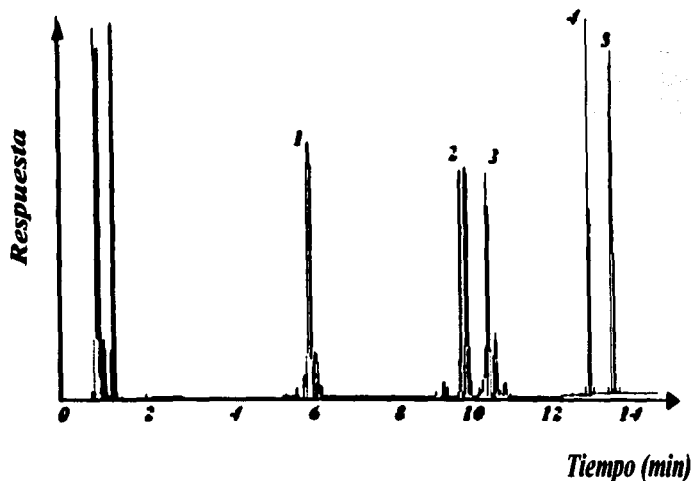
Separación de derivados Oxi-TMS de una mezcla de estándares de azúcar por CG utilizando una columna capilar DB-5. Analitos identificados: 1) Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Fructosa, 3) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Glucosa, 4) Salicina (E) y 5) Sacarosa.

La formación de los derivados se realizó con modificación de la base al Método de Prueba 1, utilizando una disolución de clorhidrato de hidroxilamina en anilina (50 mg/mL) para la formación de la oxima y BSTFA como agente sililante.

Condiciones cromatográficas: Inyector 250 °C, Detector 310 °C; se utilizó un Gradiente de Temperatura para el calentamiento de la columna. T° inicial 160 °C; primera rampa de calentamiento, incremento de 2 °C por min hasta 172 °C; Segunda rampa de calentamiento, incremento de 10 °C por min hasta 210 °C; Tercera rampa de calentamiento, incremento de 50 °C por min hasta 310 °C manteniendo esta temperatura por 3 minutos.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CROMATOGRAMA 10



**Figura 20. SEPARACIÓN DE LOS DERIVADOS OXI-TMS DE UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCAR UTILIZANDO EL "MÉTODO BASE HIDROXILAMINA"**

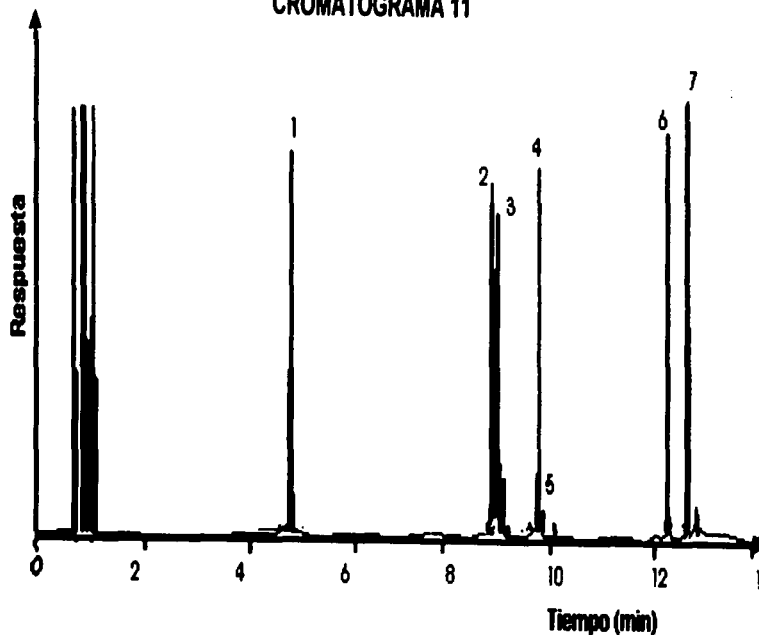
Separación de derivados Oxi-TMS de una mezcla de estándares de azúcar por CG utilizando una columna capilar DB-5. Analitos identificados: 1) Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Fructosa, 3) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  Glucosa, 4) Salicina (EI) y 5) Sacarosa.

La formación de derivados se realizó con modificación de la base al Método de Prueba 1, utilizando una disolución de hidroxilamina al 50 % en agua, para la formación de la oxima y BSTFA como agente siliante.

Condiciones cromatográficas: Temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 320 °C, se aplicó un programa de calentamiento a la columna de temperatura inicial: 160 °C incrementando la temperatura a 2 °C por min. hasta 175 °C; la segunda rampa se calentó a 10 °C por min. hasta 210 °C, la tercera rampa se calentó a 40 °C por min. hasta 310 °C, manteniéndose por 3 minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CROMATOGRAMA 11



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Figura 21. SEPARACIÓN DE DERIVADOS OXI-TMS DE UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE AZÚCAR UTILIZANDO EL "MÉTODO BASE ACETATO DE SODIO"**

Separación de derivados Oxi-TMS de una mezcla de estándares de azúcar por CG utilizando una columna capilar DB-5. Picos identificados: 1) Mezcla de Arabinosa y Xilosa, 2) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Fructosa, 3) Isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de Glucosa, 4) Salicina (EI) y 5) Sacarosa.

La formación de derivados se realizó con modificación de la base al Método de Prueba 1, el cual utiliza una disolución de clorhidrato de hidroxilamina y acetato de sodio para la formación de la oxima y BSTFA como agente sililante. Condiciones cromatográficas: Temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 320 °C, se aplicó un programa de calentamiento a la columna de temperatura inicial: 160 °C incrementa utilizando la temperatura a 2° por min. hasta 175 °C; después con una segunda rampa se calentó a 10 ° por min. hasta 210° C y por último, en una tercera rampa se calentó a 40° por min. hasta 310 °C, manteniéndose por 3 minutos.

**ANEXO II**  
**DATOS ANÁLISIS**  
**CUANTITATIVO**

## TÉCNICA DE ANÁLISIS CUANTITATIVO DE AZÚCARES COMO DERIVADOS OXI-TMS POR CG

Metodología aplicada para la cuantificación de azúcares en jugo de pera.

I. Se prepararon las siguientes disoluciones:

1. Disolución de clorhidrato de hidroxilamina en anilina (50 mg/ mL)
2. Disolución de salicina (5 mg/ mL en disolución 1)
3. Disolución stock de estándares de azúcares preparada con la disolución 1

**TABLA 14**

### DISOLUCIÓN "STOCK"

AZÚCAR	mg/mL*
Arabinosa	1.0
Xilosa	22.5
Fructosa	8.0
Glucosa	1.0
Sacarosa	5.0

\*En la disolución de clorhidrato de hidroxilamina (50 mg/mL).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para obtener la curva de calibración, en matraces aforados de 5 mL se agregaron 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mL de la disolución "stock", (Tabla 14) y 1 ml de la disolución de Estándar Interno (EI); posteriormente se aforaron con la disolución de clorhidrato de hidroxilamina en anilina.

TABLA 15

## CURVA PATRÓN

Azúcar	Concentración (mg/mL)					
Arabinosa y Xilosa	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Fructosa	0.22	0.45	0.9	1.35	1.80	2.25
Glucosa	0.08	0.16	0.32	0.48	0.64	0.8
Sacarosa	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	1

Para formar los derivados de la disolución correspondiente, en un vial de reacción se agregó 1 mL, agitando constantemente durante 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 0.3 mL del reactivo sililante BSTFA, agitando nuevamente durante 10 min.

Se observó la formación de un precipitado blanco, correspondiente al cloruro de amonio formado durante la reacción, así como la formación de dos fases.

Para el análisis cromatográfico, se inyectó 1 microlitro de la fase superior. La curva de calibración para cada azúcar se construyó con la relación AA/AEI en función de CA/CEI.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 16

**DATOS EXPERIMENTALES DE LA CURVA PATRÓN  
DE LA MEZCLA ARABINOSA Y XILOSA**

Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)	Alicuota (mL)	Co. Final (mg/mL)
5.1	5	1.02	0.02	0.010
5.1	5	1.02	0.04	0.020
5.1	5	1.02	0.08	0.040
5.1	5	1.02	0.12	0.061
5.1	5	1.02	0.16	0.081

Co. Final = Concentración final

Concentración (mg/mL)	Área <sub>1</sub>	Área <sub>2</sub>	Área <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> /AEI <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /AEI <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> /AEI <sub>2</sub>
0.010	164	169	167	0.016	0.014	0.015
0.020	1557	1565	1675	0.045	0.048	0.046
0.040	2975	3102	2973	0.084	0.088	0.086
0.061	9129	8147	8320	0.124	0.132	0.128
0.081	3935	6621	6713	0.155	0.155	0.155

La determinación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

EI = Estándar Interno; A<sub>n</sub>/AEI = Área del analito n / área del Estándar Interno.

TABLA 17

**DATOS EXPERIMENTALES DE LA CURVA PATRÓN  
DE FRUCTOSA**

Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)	Alicuota (mL)	Co. Final (mg/mL)
116.20	5	23.24	0.02	0.232
116.20	5	23.24	0.04	0.464
116.20	5	23.24	0.08	0.929
116.20	5	23.24	0.12	1.394
116.20	5	23.24	0.16	1.859

Co. Final = Concentración final

Concentración (mg/mL)	Área <sub>1</sub>	Área <sub>2</sub>	Área <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> /AEI <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /AEI <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> /AEI <sub>2</sub>
0.232	3266	4793	3980	0.322	0.401	0.362
0.464	42671	44902	47024	1.238	1.373	1.305
0.929	80121	81153	81986	2.270	2.314	2.292
1.394	218698	215201	204694	2.983	3.481	3.232
1.859	125725	202198	80520	4.950	4.737	4.844

La determinación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

EI = Estándar Interno; A<sub>n</sub>/AEI = Área del analito n / área del Estándar Interno.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TABLA 18

**DATOS EXPERIMENTALES DE LA CURVA PATRÓN  
DE GLUCOSA**

Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)	Alicuota (mL)	Co. Final (mg/mL)
40.70	5	8.14	0.02	0.081
40.70	5	8.14	0.04	0.162
40.70	5	8.14	0.08	0.325
40.70	5	8.14	0.12	0.488
40.70	5	8.14	0.16	0.651

Co. Final = Concentración final

Concentración (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	A <sub>1</sub> /AEI <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /AEI <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> /AEI <sub>2</sub>
0.081	5958	6551	5240	0.588	0.365	0.477
0.162	35285	28026	30873	1.023	0.857	0.940
0.325	58663	49056	132775	1.662	1.483	1.573
0.488	167612	129255	142055	2.286	2.091	2.188
0.651	68322	114655	116427	2.690	2.686	2.688

La determinación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

EI = Estándar Interno; A<sub>n</sub>/AEI = Área del analito n / área del Estándar Interno.

TABLA 19

**DATOS EXPERIMENTALES DE LA CURVA PATRÓN  
DE SACAROSA**

Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)	Alicuota (mL)	Co. Final (mg/mL)
5.20	5	1.04	0.02	0.010
5.20	5	1.04	0.04	0.020
5.20	5	1.04	0.08	0.041
5.20	5	1.04	0.12	0.062
5.20	5	1.04	0.16	0.083

Co. Final = Concentración final

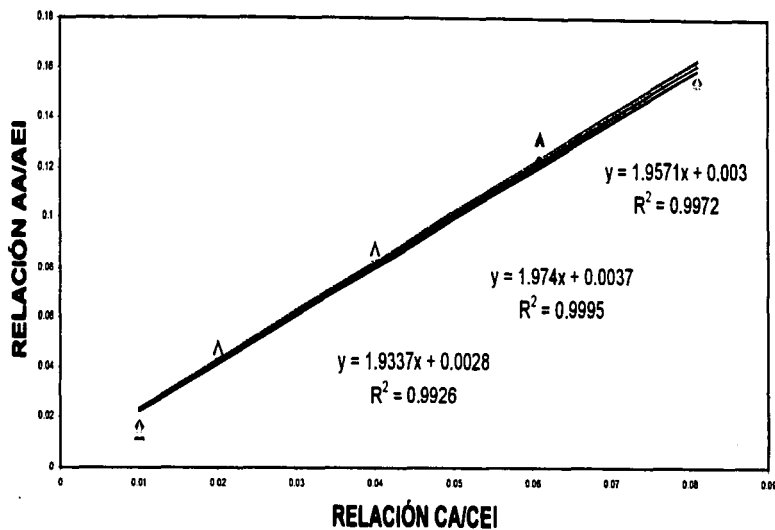
Concentración (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	A <sub>1</sub> /AEI <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /AEI <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> /AEI <sub>2</sub>
0.010	154	1088	214	0.015	0.023	0.019
0.020	1445	1290	849	0.240	0.022	0.023
0.041	858	804	34355	0.041	0.039	0.040
0.062	7269	6858	5296	0.071	0.076	0.074
0.083	1827	3245	4482	0.099	0.107	0.103

La determinación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

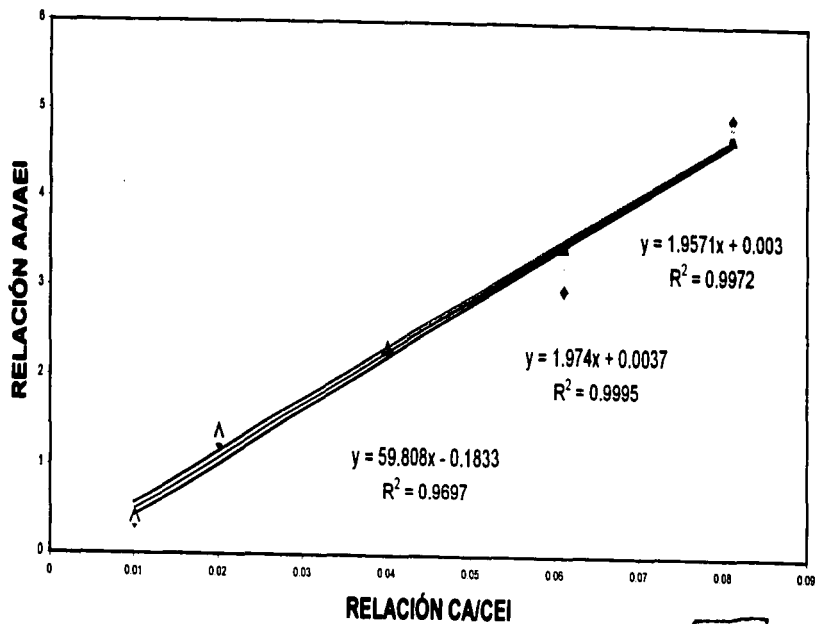
EI = Estándar Interno; A<sub>n</sub>/AEI = Área del analito n / área del Estándar Interno.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CURVA PATRÓN DE LA MEZCLA DE ARABINOSA Y XILOSA

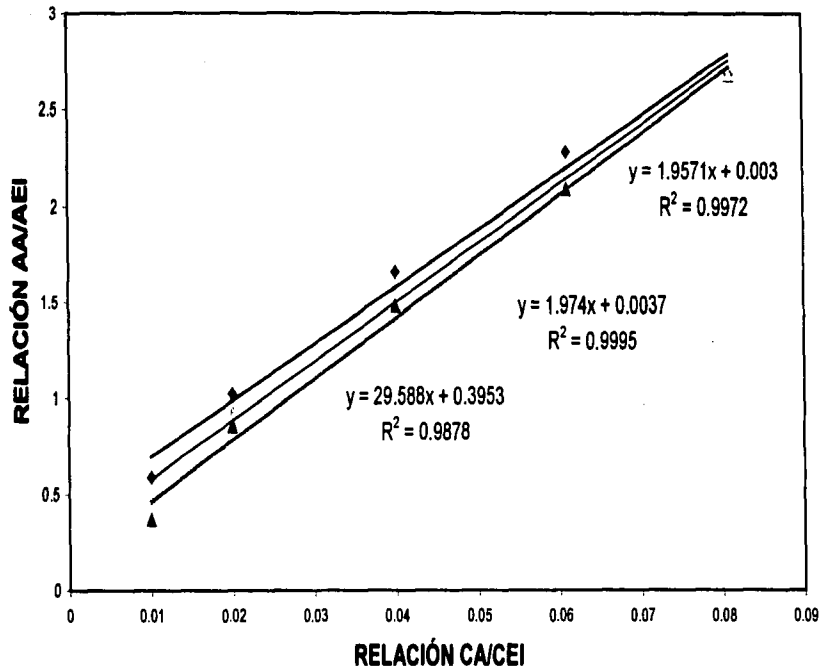
TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CURVA PATRÓN DE FRUCTOSA

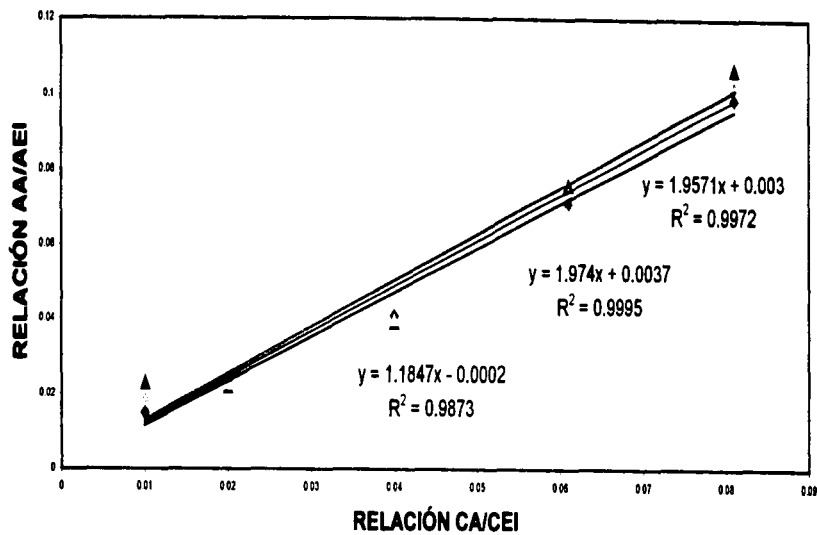


TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CURVA PATRÓN DE GLUCOSA

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CURVA PATRÓN DE SACAROSA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**DATOS DEL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE AZÚCARES  
EN EL JUGO DE PERA "NATURAL"**

Azúcar	Área <sub>1</sub>	Área <sub>2</sub>	Área <sub>3</sub>	Área EI <sub>1</sub>	Área EI <sub>2</sub>	Área EI <sub>3</sub>
A y X	2190	3570	5763	43257	45123	44192.6
F	177572	289524	467099	43257	45123	44192.6
G	40063	65325	105391	43257	45123	44192.6
S	2152	3304	5459	43257	45123	44192.6

A y X = Arabinosa y Xilosa, F = Fructosa, G = Glucosa, S = Sacarosa, EI = Estándar interno;  
A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> = Áreas obtenidas al inyectar tres muestras del extracto.

**Cálculo de la concentración de cada componente del Jugo "Natural"**

Muestra 1	CA/CEI=((AA/AEI)-b)/m			CEI (mg/mL)	CA <sub>1</sub> (mg/mL)	CA <sub>2</sub> (mg/mL)	CA <sub>3</sub> (mg/mL)
A y X	0.471	0.479	0.466	1.000	0.471	0.479	0.466
F	13.673	13.893	14.134	1.000	13.673	13.893	14.134
G	2.650	2.693	2.739	1.000	2.650	2.693	2.739
S	0.408	0.416	0.421	1.000	0.408	0.416	0.421

Muestra 1	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Muestra (mg)	%	%	%
A y X	0.471	0.479	0.466	24.600	1.913	1.948	1.976
F	13.673	13.893	14.134	24.600	55.563	56.476	57.456
G	2.650	2.693	2.739	24.600	10.771	10.948	11.132
S	0.408	0.416	0.421	24.600	1.656	1.690	1.713

CA<sub>1</sub> = concentración<sub>1</sub> del azúcar, CA<sub>2</sub> = concentración<sub>2</sub> del azúcar, CA<sub>3</sub> = concentración<sub>3</sub> del azúcar,  
CEI = concentración del estándar interno, Conc. cal = concentración calculada.

Muestra 2	CA/CEI=((AA/AEI)-b)/m			CEI (mg/mL)	CA <sub>1</sub> (mg/mL)	CA <sub>2</sub> (mg/mL)	CA <sub>3</sub> (mg/mL)
A y X	0.448	0.456	0.462	1.000	0.448	0.456	0.462
F	13.118	13.329	13.560	1.000	13.118	13.329	13.560
G	2.542	2.584	2.627	1.000	2.542	2.584	2.627
S	0.390	0.397	0.402	1.000	0.390	0.397	0.402

Muestra 2	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Muestra (mg)	%	%	%
A y X	0.448	0.456	0.462	22.500	1.990	2.027	2.055
F	13.118	13.329	13.560	22.500	58.301	59.238	60.266
G	2.542	2.584	2.627	22.500	11.297	11.483	11.677
S	0.390	0.397	0.402	22.500	1.732	1.765	1.769

CA<sub>1</sub> = concentración<sub>1</sub> del azúcar, CA<sub>2</sub> = concentración<sub>2</sub> del azúcar, CA<sub>3</sub> = concentración<sub>3</sub> del azúcar,  
CEI = concentración del estándar interno, Conc. cal = concentración calculada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### DATOS DEL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE AZÚCARES EN EL JUGO DE PERA COMERCIAL

Azúcar	Área <sub>1</sub>	Área <sub>2</sub>	Área <sub>3</sub>	Área EI <sub>1</sub>	Área EI <sub>2</sub>	Área EI <sub>3</sub>
A y X	2190	3570	5763	43257	45123	44192.6
F	177572	289524	467099	43257	45123	44192.6
G	40063	65325	105391	43257	45123	44192.6
S	2152	3304	5459	43257	45123	44192.6

A y X = Arabinosa y Xilosa, F = Fructosa, G = Glucosa, S = Sacarosa, AA<sub>1</sub> = Área<sub>1</sub> del azúcar, AA<sub>2</sub> = Área<sub>2</sub> del azúcar

Cálculo de la concentración de los azúcares en el Jugo "comercial"

Muestra 1	CA/CEI = ((AA/AEI)-b)/m			CEI (mg/mL)	CA <sub>1</sub> (mg/mL)	CA <sub>2</sub> (mg/mL)	CA <sub>3</sub> (mg/mL)
A y X	0.100	0.103	0.103	1.000	0.100	0.103	0.103
F	7.976	8.104	8.244	1.000	7.976	8.104	8.244
G	1.801	1.831	1.861	1.000	1.801	1.831	1.861
S	0.098	0.101	0.101	1.000	0.098	0.101	0.101

Muestra 1	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Muestra (mg)	%	%	%
A y X	0.100	0.103	0.103	13.800	0.725	0.745	0.747
F	7.976	8.104	8.244	13.800	57.796	58.728	59.743
G	1.801	1.831	1.861	13.800	13.049	13.267	13.487
S	0.098	0.101	0.101	13.800	0.713	0.733	0.734

CA<sub>1</sub> = concentración<sub>1</sub> del azúcar, CA<sub>2</sub> = concentración<sub>2</sub> del azúcar, CA<sub>3</sub> = concentración<sub>3</sub> del azúcar, CEI = concentración del estándar interno, Conc. cal = concentración calculada.

Muestra 2	CA/CEI = ((AA/AEI)-b)/m			CEI (mg/mL)	CA <sub>1</sub> (mg/mL)	CA <sub>2</sub> (mg/mL)	CA <sub>3</sub> (mg/mL)
A y X	0.155	0.159	0.160	1.000	0.155	0.159	0.160
F	12.465	12.666	12.866	1.000	12.465	12.666	12.866
G	2.814	2.860	2.908	1.000	2.814	2.860	2.908
S	0.144	0.147	0.148	1.000	0.144	0.147	0.148

Muestra 2	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Conc. cal (mg/mL)	Muestra (mg)	%	%	%
A y X	0.155	0.159	0.160	22.500	0.691	0.707	0.712
F	12.465	12.666	12.866	22.500	55.402	56.293	57.269
G	2.814	2.860	2.908	22.500	12.506	12.712	12.926
S	0.144	0.147	0.148	22.500	0.640	0.655	0.660

CA<sub>1</sub> = concentración<sub>1</sub> del azúcar, CA<sub>2</sub> = concentración<sub>2</sub> del azúcar, CA<sub>3</sub> = concentración<sub>3</sub> del azúcar, CEI = concentración del estándar interno, Conc. cal = concentración calculada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 20**

**COMPOSICIÓN DE LA PARTE COMESTIBLE DE LA PERA<sup>31</sup>**

Componente	% (g)
Agua	78 - 90
Azúcares	6 - 14
Proteínas	0.2 - 0.7
Grasa	0.1 - .05
Acidez	1.0 - 2.2
Pectina	0.1 - 0.9
Cenizas	0.2 - .04
Fibra	0.9 - 2.9

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 21**

**COMPOSICIÓN TEÓRICA DE LOS AZÚCARES EN PERA REPORTADOS EN LA LITERATURA**

COMPONENTE	% gramos			
	a	b	c	d
Glucosa	24	23 - 32	11, 17	23
Fructosa	60 - 65	33 - 61.5	47.5	65
Sacarosa	9.8	1.7 - 5.4	2.5	18
Otros (Xilosa, Galactosa y Manosa)	-	-	-	-

a = Química Agrícola III. Editorial Alhambra. Reimpresión de la segunda edición, 1982. Pp 240 -247

b = W. Chapman (1989)

c = Lee y col. (1984)

d = Tomado de Wroldstad y col. (1981)

**TABLA 22**

**COMPOSICIÓN CALCULADA**

COMPONENTE	% GRAMOS JN						% GRAMOS JG					
	M <sub>1</sub>			M <sub>2</sub>			M <sub>1</sub>			M <sub>2</sub>		
Glucosa	10.7	10.9	11.1	11.2	11.4	11.6	13.0	13.2	13.4	12.5	12.7	12.9
Fructosa	55.5	56.4	57.4	58.3	59.2	60.2	57.7	58.7	59.7	55.4	56.2	57.2
Sacarosa	1.6	1.6	1.7	1.7	1.7	1.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6
Otros (Xilosa, Arabinosa)	1.9	1.9	1.9	1.9	2.0	2.0	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7

Se analizaron dos muestras (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>) por triplicado. JN = Jugo natural preparado en el laboratorio; JG = Jugo comercial marca "Gerber". ° Brix Jugo Natural = 13; ° Brix Jugo "Gerber" = 12.5.



**ANEXO III**  
**LIMITE DE DETECCIÓN**

## LÍMITE DE DETECCIÓN

x	y=respuesta
C (mg/ml)	Area
2.0000	385831
2.0000	378050
2.0000	364290
1.0000	202823
1.0000	185898
1.0000	172424
0.5000	93762
0.5000	95805
0.5000	91461
0.2500	37259
0.2500	52643
0.2500	44835
0.1250	22436
0.1250	10075
0.1250	25614
0.0625	7424
0.0625	10075
0.0625	5814
0.0312	3567
0.0312	3091
0.0312	4825
0.0156	853
0.0156	850
0.0156	952

Análisis de regresión lineal  
ARABINOSA Y XILOSA

Riesgo =	5%
Nº de datos =	24
Ordenada =	-2746.627795
Pendiente =	189591.9875
Coef corr =	0.998616437
Riesgo de que no sea recta =	4.48656E-36 %
Límite de detección :	
CMD (estimado en mg/mL) =	0.07595903

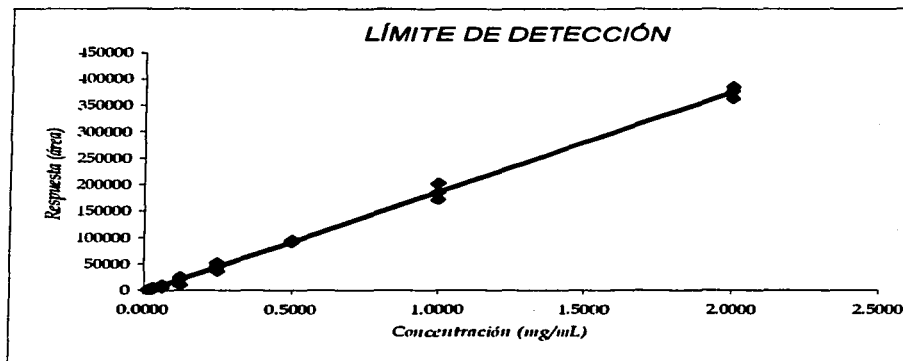
Grados de lib = 22

t student = 2.073875294

media x = 0.4980375

media y = 91677.29167

pend =	189591.987	Ordenada =	-2746.62779
se pend =	2128.50255	se ord =	1737.90116
r <sup>2</sup> =	0.99723479	sey =	6746.63182
F =	7933.98925	G.libertad =	22
ssreg =	3.6113E+11	ss residual =	1001374900



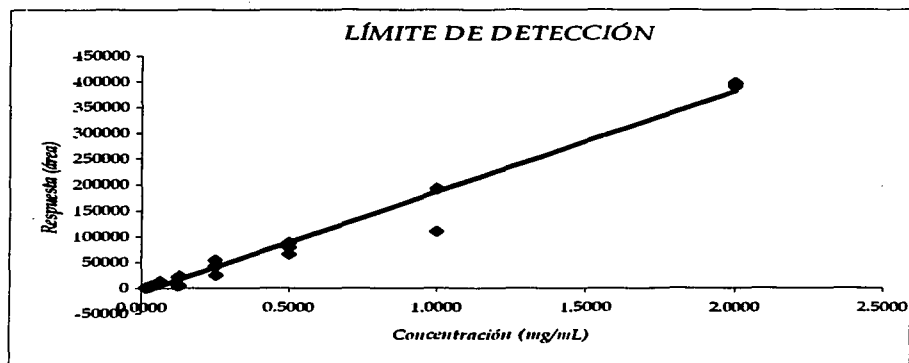
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Análisis de regresión lineal FRUCTOSA

x	y=respuesta
C (mg/ml)	Area
2.0000	394950
2.0000	390750
2.0000	398415
1.0000	192016
1.0000	191608
1.0000	110252
0.5000	79301
0.5000	68527
0.5000	88895
0.2500	43597
0.2500	25825
0.2500	54818
0.1250	4631
0.1250	21023
0.1250	22734
0.0625	12176
0.0625	11340
0.0625	13290
0.0312	3587
0.0312	5091
0.0312	3698
0.0156	966
0.0156	1305
0.0156	1233

Riesgo= 5%  
 N° de datos= 24  
 Ordenada= -7816.000685  
 Pendiente= 194546.2621  
 Coef corr= 0.999894701  
 Riesgo de que no sea recta= 2.54783E-26 %  
 Límite de detección :  
 CMD (estimado en mg/mL) = 0.2100584t

Grados de lib = 22  
 t student= 2.07387529  
 media x= 0.4980375  
 media y= 89075.3333  
 pend= 194546.262      ord= -7816.00069  
 se pend= 6067.21308      se ord= 4953.81911  
 $r^2$ = 0.97905112      sey= 19231.0094  
 F= 1028.17559      G.libertad = 22  
 ssregr= 3.8025E+11      ss residual = 8136297938



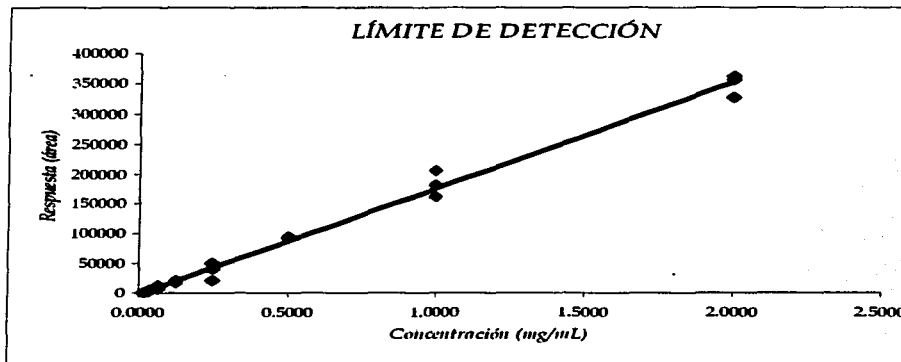
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

x	y=respuesta
C (mg/ml)	Area
2.0000	362894
2.0000	327088
2.0000	356790
1.0000	206204
1.0000	182687
1.0000	181872
0.5000	95530
0.5000	93228
0.5000	92749
0.2500	40749
0.2500	21731
0.2500	50340
0.1250	21420
0.1250	21295
0.1250	17850
0.0625	10000
0.0625	12950
0.0625	7650
0.0312	3178
0.0312	4278
0.0312	3725
0.0156	530
0.0156	562
0.0156	524

### Análisis de regresión lineal GLUCOSA

riesgo= 5%
Nº de datos= 24
ordenada= -890.6545628
pendiente= 177111.8063
coef corr= 0.999592437
Riesgo de que no sea recta= 6.76485E-31 %
Límite de detección :
CMD (estimado en mg/mL) = 0.1303702:

Grados de lib 22	
t student= 2.073875294	
media x= 0.4980375	
media y= 87317.66667	
pend= 177111.806	ord = -890.654563
se pend= 3419.63079	se ord = 2792.09452
r²= 0.99186535	sey = 10839.0708
F= 2682.48059	g.libertad = 22
ssreg= 3.1515E+11	ss residual= 2584680030



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

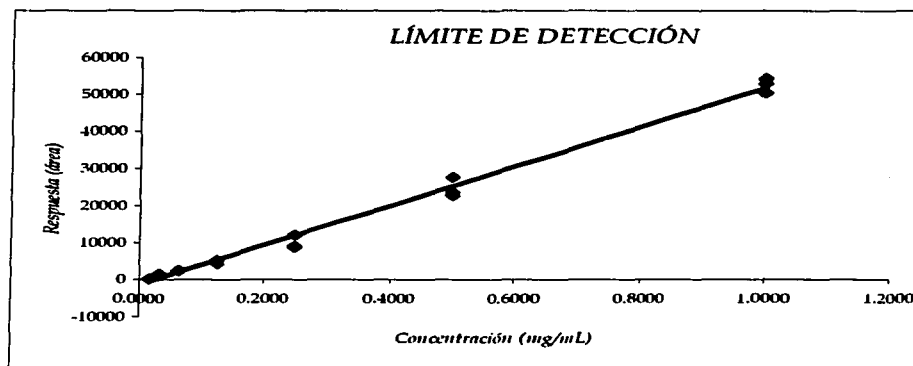
x	y=respuesta
<b>C (mg/ml)</b>	<b>Area</b>
2.0000	92631
2.0000	75645
2.0000	87997
1.0000	54321
1.0000	52972
1.0000	50377
0.5000	22766
0.5000	27598
0.5000	23843
0.2500	9082
0.2500	8840
0.2500	12088
0.125	5138
0.125	4367
0.125	5275
0.0625	2350
0.0625	2367
0.0625	2275
0.0312	1230
0.0312	1534
0.0312	1356
0.0156	239
0.0156	224
0.0156	236

### Análisis de regresión lineal SACAROSA

Riesgo= 5%  
 N° de datos= 24  
 ordenada= 247.8661291  
 pendiente= 43387.14562  
 coef corr= 0.984766145  
 Riesgo de que no sea recta= 1.58765E-24 %  
 Límite de detección :  
 CMD (estimado en mg/mL) = 0.2532878:

Grados de lib = 22  
 t student= 2.073875294  
 media x= 0.4980375  
 media y= 21856.29167

Pend= 43387.14562	Ord = 247.8661291
se pend= 1633.338531	se ord = 1333.604664
r <sup>2</sup> = 0.969764361	sey = 5177.129664
F= 705.6181514	g.libertad = 22
ssreg= 18912451559	ss residual = 589658774.3



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**ANEXO IV**  
**ESTABILIDAD**

## ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS OXI-TMS

En este ensayo, se observa el efecto de la base utilizada como disolvente sobre la estabilidad de los derivados formados.

Para ello se realiza un tratamiento estadístico para comparar la media obtenida de las áreas de las muestras inyectadas a temperatura ambiente y las muestras que permanecieron en refrigeración (4° C)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

BASE UTILIZADA COMO MEDIO DE REACCIÓN: PIRIDINA

## ARABINOSA Y XILOSA

Muestra Control	Nº de Inyección	Muestra Control	Muestra T° Amb
1	1	2.809	2.408
	2		2.646
	3		2.680
2	1	2.760	2.442
	2		2.634
	3		2.687
3	1	2.619	2.527
	2		2.638
	3		2.696
		$\bar{x}$ =	2.760
		s =	0.099
		%cv =	3.574
		s <sup>2</sup> =	0.010
			2.638
			0.109
			4.138
			0.012

## FRUCTOSA

Muestra Control	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra T° Amb
1	1	1.4900	1.460
	2		1.490
	3		1.531
2	1	1.4600	1.520
	2		1.470
	3		1.510
3	1	1.4700	1.470
	2		1.480
	3		1.490
		$\bar{x}$ =	1.470
		s =	0.015
		%cv =	1.039
		s <sup>2</sup> =	0.00023
			1.490
			0.024
			1.638
			0.001

## GLUCOSA

Muestra Control	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	2.7000	2.5700
	2		2.5500
	3		2.2800
2	1	2.7800	2.7300
	2		2.4480
	3		2.3800
3	1	2.7300	2.4900
	2		2.1200
	3		2.4700
		$\bar{x}$ =	2.730
		s =	0.040
		%cv =	1.480
		s <sup>2</sup> =	0.002
			2.470
			0.176
			7.121
			0.031

## SACAROSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	0.9603	0.9018
	2		0.9409
	3		1.0775
2	1	0.9975	0.9833
	2		1.0444
	3		1.0239
3	1	1.0120	1.0020
	2		0.9342
	3		0.8435
		$\bar{x}$ =	0.997
		s =	0.027
		%cv =	2.673
		s <sup>2</sup> =	0.001
			0.983
			0.074
			7.536
			0.005

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



## BASE UTILIZADA COMO MEDIO DE REACCIÓN: ANILINA

## ARABINOSA Y XILOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra Control	Muestra Tº Amb
1	1	2.7744	2.7041
	2		2.6421
	3		2.5499
2	1	2.5962	2.6268
	2		2.6508
	3		2.5263
3	1	2.6713	2.3793
	2		2.3829
	3		2.3231
		$\bar{x}$ =	2.671
		s =	0.089
		%cv =	8.706
		s <sup>2</sup> =	0.008
			2.550
			0.139
			5.448
			0.019

## FRUCTOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	5.8462	5.5520
	2		5.4905
	3		5.5605
2	1	5.3498	5.5431
	2		5.5398
	3		5.4343
3	1	5.2504	5.6541
	2		5.9168
	3		5.1634
		$\bar{x}$ =	5.350
		s =	0.319
		%cv =	5.966
		s <sup>2</sup> =	0.102
			5.543
			0.197
			3.557
			0.039

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## GLUCOSA

Muestra	N° de Inyección	Muestra control	Muestra T° Amb
1	1	1.3622	1.3810
	2		1.3475
	3		1.3629
2	1	1.3651	1.3634
	2		1.3724
	3		1.3344
3	1	1.3161	1.3954
	2		1.3792
	3		1.3856
		$\bar{x} =$	1.362
		$s =$	0.027
		$\%cv =$	2.016
		$s^2 =$	0.001
			1.372
			0.019
			1.401
			0.000

## SACAROSA

Muestra	N° de Inyección	Muestra control	Muestra T° Amb
1	1	1.4288	1.4192
	2		1.3749
	3		1.3923
2	1	1.3711	1.3742
	2		1.3962
	3		1.3701
3	1	1.3718	1.4287
	2		1.3711
	3		1.3318
		$\bar{x} =$	1.372
		$s =$	0.033
		$\%cv =$	2.415
		$s^2 =$	0.001
			1.375
			0.029
			2.109
			0.001

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BASE UTILIZADA COMO MEDIO DE REACCIÓN: ACETATO DE SODIO

## ARABINOSA Y XILOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra Control	Muestra Tº Amb
1	1	1.2023	0.8433
	2		1.0121
	3		1.0894
2	1	1.2524	0.8807
	2		1.0485
	3		0.9144
3	1	1.1703	1.0710
	2		0.9287
	3		1.0058
		$\bar{y} =$	1.202
		$s =$	0.041
		$\%cv =$	8.706
		$s^2 =$	0.002
			1.006
			0.088
			8.755
			0.008

## FRUCTOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	2.7863	2.5240
	2		2.4978
	3		2.4114
2	1	2.7624	2.9115
	2		2.3623
	3		2.7182
3	1	2.8254	2.8837
	2		2.5404
	3		2.7864
		$\bar{y} =$	2.786
		$s =$	0.032
		$\%cv =$	1.141
		$s^2 =$	0.001
			2.540
			0.204
			8.014
			0.041

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## GLUCOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	2.3938	2.3691
	2		2.4166
	3		2.3976
2	1	2.4302	2.4031
	2		2.5563
	3		2.3636
3	1	2.4387	2.3951
	2		2.3939
	3		2.4387
		$\bar{x}$ =	2.430
		s =	0.024
		%cv =	0.981
		s <sup>2</sup> =	0.001
			2.398
			0.058
			2.404
			0.003

## SACAROSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	0.8021	0.8081
	2		0.8086
	3		0.8107
2	1	0.8186	0.8812
	2		0.8832
	3		0.8812
3	1	0.8084	0.8021
	2		0.8097
	3		0.8119
		$\bar{x}$ =	0.808
		s =	0.008
		%cv =	1.033
		s <sup>2</sup> =	0.000
			0.811
			0.037
			4.537
			0.001

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BASE UTILIZADA COMO MEDIO DE REACCIÓN: HIDROXILAMINA

## ARABINOSA Y XILOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra Control	Muestra Tº Amb
1	1	1.2048	1.1770
	2		1.1664
	3		1.1550
2	1	1.1954	1.1627
	2		1.6805
	3		1.6354
3	1	1.1995	1.2937
	2		1.8362
	3		1.3231
		$\bar{x} =$	1.200
		$s =$	0.005
		$\%cv =$	8.706
		$s^2 =$	0.000
			1.294
			0.264
			20.433
			0.070

## FRUCTOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	1.5240	1.2524
	2		1.5409
	3		1.3927
2	1	1.5498	1.3654
	2		1.6856
	3		1.3743
3	1	1.5524	1.4965
	2		1.3896
	3		1.3471
		$\bar{x} =$	1.550
		$s =$	0.016
		$\%cv =$	1.013
		$s^2 =$	0.000
			1.390
			0.128
			9.198
			0.016

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## GLUCOSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	1.5877	1.1935
	2		1.9563
	3		1.6258
2	1	1.6257	1.6349
	2		1.7328
	3		1.3477
3	1	1.6372	1.4952
	2		1.3276
	3		1.8592
		$\bar{X} =$	1.626
		$s =$	0.026
		$\%cv =$	1.592
		$s^2 =$	0.001
			0.065

## SACAROSA

Muestra	Nº de Inyección	Muestra control	Muestra Tº Amb
1	1	1.1081	1.5810
	2		1.0987
	3		1.1009
2	1	1.1523	0.9598
	2		0.9782
	3		0.9956
3	1	1.0948	1.1457
	2		1.7498
	3		1.8127
		$\bar{X} =$	1.108
		$s =$	0.030
		$\%cv =$	2.717
		$s^2 =$	0.001
			0.119

TESIS  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comprobar que los derivados Oxi-TMS son estables se comparan los resultados obtenidos entre las muestras refrigeradas a 4° C y las muestras que permanecieron a temperatura ambiente (25° C), antes de ser analizadas.

## PRUEBAS DE HIPÓTESIS SOBRE LA VARIANZA:

$$H_0: \delta_1^2 = \delta_2^2$$

$$H_1: \delta_1^2 \neq \delta_2^2$$

$$\text{El estadístico de prueba es: } F = \frac{S_M^2}{S_m^2} = \frac{\delta_1^2}{\delta_2^2}$$

Grados de libertad para la varianza mayor:  $n_M^2 - 1$

Grados de libertad para la varianza menor:  $n_m^2 - 1$

Para aceptar  $H_0$ :

$$F < F_{\alpha/2} = F < F_{0.025}$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ejemplo de cálculo:

Utilizando los datos de  $\delta_1^2 = 0.010$  y  $\delta_2^2 = 0.008$  obtenidos para Arabinosa y Xilosa utilizando piridina como disolvente.

$$F = \frac{S_M^2}{S_m^2} = \frac{\delta_1^2}{\delta_2^2} = \frac{0.012}{0.010} = 1.200$$

Azúcar	$F_{\text{calculada}}$	$F_{\text{tablas}}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	1.200	19.37	$F_{\text{calculada}} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Fructosa	4.348	19.37	$F_{\text{calculada}} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Glucosa	15.500	19.37	$F_{\text{calculada}} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Sacarosa	5.000	19.37	$F_{\text{calculada}} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$

## PRUEBA DE HIPÓTESIS SOBRE LA MEDIA

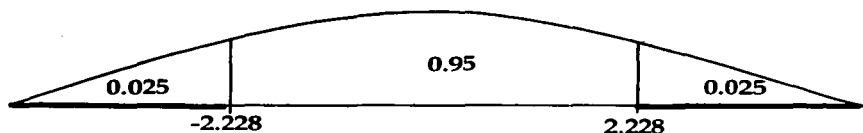
$$H_0: \mu_1^2 - \mu_2^2 = 0$$

$$H_1: \mu_1^2 - \mu_2^2 \neq 0$$

El estadístico de prueba es:  $t = [x - x] / S^p \sqrt{(1/N_1 + 1/N_2)} \cdot [N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2 / N_1 + N_2 - 2]$

Grados de libertad  $N_1 + N_2 - 2$

Para aceptar  $H_0$ :  $-t_{\alpha/2} < t_{\text{calculada}} > t_{\alpha/2}$ ;  $F = -t_{0.025} < t_{\text{calculada}} > t_{0.025}$



AZÚCAR	$S_p$	$t_{calculada}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	0.112	1.632	Se acepta $H_0$
Fructosa	0.0386	0.389	Se acepta $H_0$
Glucosa	0.1594	2.450	Se rechaza $H_0$
Sacarosa	0.0656	0.321	Se acepta $H_0$

A continuación se muestran los resultados obtenidos, del análisis estadístico de la varianza y media, para cada conjunto de datos:

### PRUEBAS DE HIPÓTESIS SOBRE LA MEDIA Y LA VARIANZA UTILIZANDO PIRIDINA COMO DISOLVENTE

Azúcar	$F_{calculada}$	$F_{tablas}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	1.200	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Fructosa	4.348	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Glucosa	15.500	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Sacarosa	5.000	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$

AZÚCAR	$S_p$	$t_{calculada}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	0.112	1.632	Se acepta $H_0$
Fructosa	0.0386	0.389	Se acepta $H_0$
Glucosa	0.1594	2.450	Se rechaza $H_0$
Sacarosa	0.0656	0.321	Se acepta $H_0$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**PRUEBAS DE HIPÓTESIS SOBRE LA MEDIA Y LA VARIANZA UTILIZANDO  
ANILINA COMO DISOLVENTE**

Azúcar	$F_{calculada}$	$F_{tablas}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	2.375	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Fructosa	2.615	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Glucosa	2.770	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Sacarosa	1.295	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$

Azúcar	$S_p$	$t_{calculada}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	0.133	1.369	Se acepta $H_0$
Fructosa	0.249	-1.166	Se acepta $H_0$
Glucosa	0.024	-0.186	Se acepta $H_0$
Sacarosa	0.033	-0.136	Se acepta $H_0$

**PRUEBAS DE HIPÓTESIS SOBRE LA MEDIA Y LA VARIANZA UTILIZANDO  
ACETATO DE SODIO COMO DISOLVENTE**

Azúcar	$F_{calculada}$	$F_{tablas}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	4.000	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Fructosa	6.375	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Glucosa	3.000	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$
Sacarosa	15.625	19.37	$F_{calculada} < F_{0.025}$ se acepta $H_0$

Azúcar	$S_p$	$t_{calculada}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	0.084	3.517	Se rechaza $H_0$
Fructosa	0.182	2.030	Se acepta $H_0$
Glucosa	0.052	0.925	Se acepta $H_0$
Sacarosa	0.179	-0.025	Se acepta $H_0$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**PRUEBAS DE HIPÓTESIS SOBRE LA MEDIA Y LA VARIANZA UTILIZANDO  
HIDROXILAMINA COMO DISOLVENTE**

Azúcar	$F_{calculada}$	$F_{tablas}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	70.000	19.37	$F_{calculada} > F_{0.025}$ , se rechaza $H_0$
Fructosa	64.000	19.37	$F_{calculada} > F_{0.025}$ , se rechaza $H_0$
Glucosa	81.000	19.37	$F_{calculada} > F_{0.025}$ , se rechaza $H_0$
Sacarosa	119.000	19.37	$F_{calculada} > F_{0.025}$ , se rechaza $H_0$

Azúcar	$S_p$	$t_{calculada}$	Conclusión
Arabinosa y Xilosa	0.237	-0.595	Se acepta $H_0$
Fructosa	0.030	8.122	Se rechaza $H_0$
Glucosa	0.255	-0.053	Se acepta $H_0$
Sacarosa	0.309	0.034	Se acepta $H_0$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ANEXO V**  
**COSTOS**

## COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS CON RESPECTO AL COSTO

Como se explicó anteriormente, si no existen diferencias significativas por el tiempo total de reacción o la estabilidad de los derivados entre los métodos, una herramienta útil para poder tomar una decisión en cuanto a qué método utilizar es el costo.

A continuación se presenta, una relación de costos de los reactivos que involucra cada uno de los métodos propuestos para el análisis de carbohidratos, como derivados trimetilsililados por cromatografía de gases.

### MÉTODO CON PIRIDINA

REACTIVOS	PRESENTACIÓN Y COSTO* USD	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO* USD	
Estándares de azúcar	11 carbohidratos pureza 98-99% para CG o HPLC (5 g de cada uno)	97.20	10 mg	0.017
NH <sub>2</sub> OH·HCL	5 g 99.99% de pureza	24.40	500 mg	2.240
Piridina	100 mL 99% de pureza	34.20	10 mL	3.420
BSTFA	5 mL 99% grado de derivatización	22.10	0.3 mL	1.326
		177.90	Total	7.003

### MÉTODO CON ANILINA

REACTIVOS	PRESENTACIÓN Y COSTO* USD	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO* USD	
Estándares de azúcar	11 carbohidratos pureza 98-99% para CG o HPLC (5 g de cada uno)	97.20	10 mg	0.017
NH <sub>2</sub> OH·HCL	5 g 99.99% de pureza	24.40	500 mg	2.240
Anilina	100 g 99.5 % de pureza	11.50	10 mL	1.175
BSTFA	5 mL 99% grado de derivatización	22.10	0.3 mL	1.326
		155.2	Total	4.758

\* Referencia: Sigma - Aldrich. Manual de Productos Químicos Finos y Equipo de Laboratorio. México. 2002-2003

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## MÉTODO CON ACETATO DE SODIO

REACTIVOS	PRESENTACIÓN Y COSTO* USD	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO* USD	
Estándares de azúcar	11 carbohidratos pureza 98-99% para CG o HPLC (5 g de cada uno)	97.20	10 mg	0.017
NH <sub>2</sub> OH·HCL	5 g 99.99% de pureza	24.40	500 mg	2.240
Acetato de sodio	100 mL 99% de pureza	34.20	10 mL	3.420
Sulfato de sodio	100 g reactivo analítico	19.00	600 mg	0.114
Acetonitrilo	1 L (99.93%) Grado HPLC	42.60	2 mL	0.085
BSTFA	5 mL 99% grado de derivatización	22.10	0.3 mL	1.326
		239.5	Total	7.202

## MÉTODO HIDROXILAMINA LIBRE

REACTIVOS	PRESENTACIÓN Y COSTO* USD	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO* USD	
Estándares de azúcar	11 carbohidratos pureza 98-99% para CG o HPLC (5 g de cada uno)	97.20	10 mg	0.017
Hidroxilamina 50% <sup>al</sup>	50 mL disolución acuosa	54.30	10 mL	10.86
Sulfato de sodio	100 g reactivo analítico	19.00	600 mg	0.114
Acetonitrilo	1 L (99.93%) Grado HPLC	42.60	2 mL	0.085
BSTFA	5 mL 99% grado de derivatización	22.10	0.3 mL	1.326
		235.2	Total	12.402

\* Referencia: Sigma - Aldrich. Manual de Productos Químicos Finos y Equipo de Laboratorio. México. 2002-2003.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN