



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO SOBRE LA CARACTERIZACIÓN DE SACÁRIDOS EN  
MIELES INCRISTALIZABLES DE INGENIOS AZUCAREROS DE  
CAÑA DE AZÚCAR :**

**VALIDACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN UN  
POLARÍMETRO Y UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE  
ALTA RESOLUCIÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A I  
HEBER CASTILLO GUAJARDO**

MÉXICO D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**JURADO ASIGNADO :**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>ERNESTINA CERVERA FLORES</b>
<b>VOCAL</b>	<b>MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMINGUEZ DE BAZÚA</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>LANDY IRENE RAMÍREZ BURGOS</b>
<b>1<sup>ER</sup> SUPLENTE</b>	<b>JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ</b>
<b>2<sup>DO</sup> SUPLENTE</b>	<b>AGUSTÍN REYO HERRERA</b>

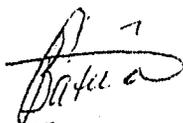
**LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :**

**PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y QUÍMICA AMBIENTAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**ASESOR**

**Q.F.B. LANDY IRENE RAMÍREZ BURGOS**



**SUPERVISOR  
TÉCNICO**

**DRA. CARMEN DURÁN DE BAZÚA**



**SUSTENTANTE**

**HEBER CASTILLO GUAJARDO**

---

## AGRADECIMIENTOS

### *A Dios...*

*Por haberme puesto donde ahora estoy, por prestarme vida y entendimiento para descubrir la grandeza de este mundo y de la gente que me rodea, por guiarme día tras día.*

### *A mis padres...*

*De verdad gracias por haber dedicado tantos años en domesticarme y enseñarme que no todo en la vida es comer y dormir, por demostrarme con su ejemplo que solo con el trabajo honrado, la dedicación y perseverancia es posible enfrentar y vencer los retos de esta vida.*

### *A mis hermanos...*

*Por aguantar a este fatoso y entenderlo... aunque de vez en cuando nos peleemos.*

### *Gracias Princesa...*

*por estar y compartir los momentos más importantes conmigo y porque siempre puedo encontrar en ti una palabra de aliento, un destello de alegría y una luz que me orienta en los momentos difíciles... las palabras me son insuficientes.*

---

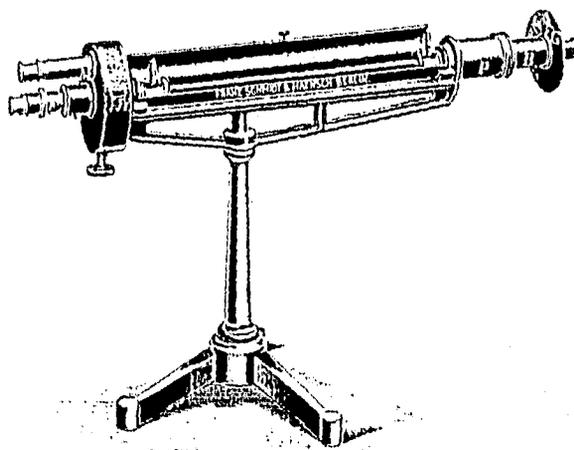
*A mi facultad querida, y con orgullo a mi Universidad que me ha dado lo necesario para crecer como persona y como profesional, por brindarnos a tantas gentes la oportunidad de ser mejores.*

*A mis amigos...*

*porque aguantándolos a Uds. olvidaba lo difícil que a veces resultaba el camino, por brindarme de manera desinteresada su amistad y apoyo que en buena parte contribuyó a lograr esta meta.*

*A todos los que no he nombrado pero que mi mente no olvida, a todos gracias.*

A la Dra. Carmen Durán de Bazúa, a la Q.F.B. Landy Ramírez Burgos por su apoyo incondicional durante la elaboración de esta tesis y a todos los integrantes del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental.



En especial a las compañías Mel de México S.A. y Schmidt and Haensch.

Por permitirnos el uso de los polarímetros y, en general, por las facilidades brindadas durante la realización del presente estudio.

## CAPITULO 1.0. GENERALIDADES

La intención que lleva esta tesis es presentar una comparación de dos de los métodos más recientes en la determinación de la sacarosa: la polarimetría en la zona del infrarrojo y la cromatografía de líquidos de alta resolución, con objeto de presentar al lector algunos argumentos en la selección de estas técnicas.

Del mismo modo se pretende resaltar que el surgimiento de la polarimetría en la zona del infrarrojo ha sido el resultado de un esfuerzo por mantener limpio el ambiente al modificar las metodologías y evitar el uso del plomo como reactivo en esta determinación. De acuerdo con lo anterior, se presentan los siguientes

### 1.1 OBJETIVOS

#### • OBJETIVO GENERAL

Realizar una comparación entre un polarímetro convencional (UNV) con  $\lambda = 589.44\text{nm}$  y un polarímetro infrarrojo (NIR) con  $\lambda = 882.6\text{ nm}$ , haciendo énfasis en lo que respecta a exactitud de lecturas en soluciones coloridas.

#### • OBJETIVOS PARTICULARES

Comparar los resultados de las lecturas obtenidas en los polarímetros con aquellas obtenidas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) como una de las técnicas más confiables.

Aplicar diferentes agentes clarificantes para determinar su eficiencia en la eliminación de dextranas, y que presente las mejores características de filtración y coloración de la solución filtrada.

## 1.2 Ingenios azucareros de caña de azúcar.

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es la materia prima más utilizada en la elaboración del azúcar comercial; la caña tuvo su origen en el sur-este de Asia, lugar de donde se diseminó hacia la India hacia el año 600. De aquí, pasaría a España y África del norte. En el siglo XVI, Cristóbal Colón y los conquistadores trajeron consigo la caña de azúcar a América Central, donde fue extensamente cultivada a tal grado que, posteriormente se pensaría que esta procedía de ahí. En la primera década del siglo XIX, Napoleón promovió la industria del azúcar de remolacha en Europa, con objeto de contrarrestar el bloqueo de la flota inglesa que prácticamente impedía el arribo de los buques con azúcar procedentes de América.<sup>[1-2]</sup>

Así, la industria azucarera es una de las primeras establecidas en el nuevo mundo, en el siglo XVI, y en el caso de México, ha crecido hasta contar con una producción actual de más de 40 millones de toneladas anuales de caña de azúcar, casi 13 millones de toneladas de bagazo, 15 millones de toneladas de mieles finales o mieles incristalizables y como producto de su fermentación se obtienen 250 millones de litros de alcohol etílico.<sup>[3]</sup>

La producción de caña de azúcar en el mundo, para 1990 era de poco más de 100 millones de toneladas anuales. De ese volumen total el 60% aproximadamente se obtiene de la caña de azúcar en 110 países de todos los continentes, situados en su mayoría entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, es decir, en las zonas tropicales y ecuatorial.

Desafortunadamente, la agroindustria azucarera mexicana padece severos problemas originados principalmente por el retraso tecnológico y la deficiencia de los procesos empleados, lo cual se refleja en grandes pérdidas y gastos excesivos de producción, aunado a esto el hecho de que el azúcar se ha caracterizado en el mercado internacional por una alta inestabilidad de los precios, mientras que los costos de producción para todos los productores se mantienen por encima del precio real, lo cual obliga a los gobiernos a aplicar diferentes políticas proteccionistas.

Esta última situación es la que ha influido para que el ritmo de crecimiento de la producción azucarera, que hasta los años 50 alcanzaba un índice del 5% anual, declinara y hoy se mantenga alrededor del 2% anual, mientras el consumo per capita se mantiene a nivel estático desde los años '70 en 20 Kg.<sup>[4]</sup>

Esta situación puede llevar a pensar que la industria azucarera dejará de tener una importancia económica para muchos países. Sin embargo, con una revolución tecnológica adecuada en la explotación de la caña de azúcar a partir de una reconversión de la actual industria y con nuevos conceptos energéticos y de utilización de los subproductos, se puede transformar lo que antes fue una industria limitada a la producción de un producto principal en productora de una amplia variedad de productos de gran demanda en la economía de cualquier país y en los mercados de exportación.

La producción actual de los ingenios incluye azúcar blanca granulada (refinada), azúcar morena u obscura (incluyendo azúcar moscabado) como productos principales y piloncillo, bagazo, alcohol y melazas como parte final del proceso, todos como subproductos.

Aunque el proceso de elaboración se puede describir a grandes rasgos como una concentración por medio de evaporación del jugo de la caña de azúcar y la separación de los cristales formados por centrifugación, es en realidad un poco más complejo. Éste se inicia con la recepción de la caña de azúcar, que en algunos casos es lavada antes de entrar a los molinos, que se encargan de extraer la mayor cantidad de jugo de caña. Una vez separado el bagazo del jugo, se dispone el primero para la generación de vapor usado más adelante y el jugo de caña o guarapo se envía a tanques de sedimentación y clarificación. Los productos intermedios son jugo sulfitado, jugo alcalinizado y, finalmente, jugo clarificado. Una vez que se obtiene un jugo lo suficientemente limpio, se envía a evaporadores para retirar el agua y provocar la cristalización de la sacarosa presente.

Como resultado de la evaporación, se obtiene un jarabe llamado magma que es enviado a cristalizadores y centrifugas, para separar los cristales formados obteniéndose como producto final azúcar granulada tipo estándar y las melazas o mieles incristalizables.<sup>(1)(4)</sup>

### 1.2.1. La caña y sus características como materia prima.

La caña de azúcar es considerada la planta comercial con mayores rendimientos por sus características relevantes en energía, materia verde y fibra. En condiciones culturales medias puede producir 100 t de materia verde/ha, las cuales expresadas en términos energéticos significan 1000 t de petróleo, o 75000 Mcal/kg de energía metabolizable por su gran capacidad de fijación de la energía a través de la fotosíntesis y su posibilidad de crecer en condiciones de clima y suelo donde otras plantas no crecerían.

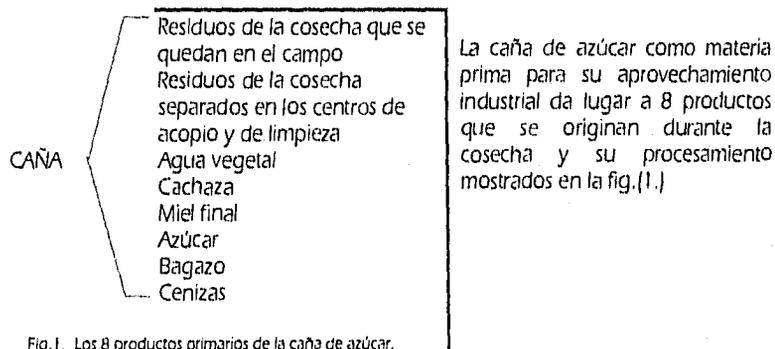


Fig.1. Los 8 productos primarios de la caña de azúcar.

## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Propiedades químicas de sacáridos y monosacáridos presentes en la caña de azúcar

**A**ntes de iniciar con la composición y origen de las mieles incristalizables, es necesario conocer esto mismo en la materia prima, la caña de azúcar, puesto que las sustancias que la componen son en esencia las mismas.

El principal carbohidrato encontrado en el jugo de caña es la sacarosa, dímero resultante de la unión de dos moléculas : una de glucosa y otra de fructosa. Se hallan también presentes en pequeñas cantidades glucosa y fructosa como monosacáridos, oligosacáridos como la rafinosa y otros.<sup>[41]</sup> Puesto que la sacarosa es el principal objeto de este estudio, se centrará la atención sobre algunas propiedades de esta molécula.

#### Rotación óptica

La luz ordinaria puede concebirse como si rayos de diferentes longitudes de onda vibraran en todos los planos posibles perpendicularmente a la dirección de su propagación. Cuando la luz blanca pasa a través de un filtro adecuado se obtiene luz monocromática (longitudes de onda uniforme).

Esta clase de luz puede aún vibrar en todos los planos posibles. Si un haz de luz pasa a través de una sustancia que permita que solamente un componente, por ejemplo, el vertical, pase por ella, el rayo de luz resultante contiene ondas de luz que vibran en un solo plano; a tal rayo de luz se le llama polarizado en el plano.

La sacarosa, como muchos otros compuestos orgánicos posee cierta actividad óptica, lo cual quiere decir que tiene la capacidad de rotar un haz de luz polarizado sobre un plano al pasar éste a través de una solución. Esta es una propiedad óptica muy importante, empleada comúnmente en estudios analíticos, puesto que los grados de rotación del haz de luz son proporcionales a la cantidad del material ópticamente activo en la solución.<sup>[5-7]</sup>

La rotación óptica al igual que otras propiedades, como el índice de refracción, son dependientes de la temperatura ( $t$ ) y de la longitud de onda ( $\lambda$ ). Es también dependiente de la distancia de contacto del haz de luz con la sustancia (longitud de la celda), pero una vez manteniendo constantes estas variables, es posible realizar lecturas de sacarosa en soluciones puras, entendiéndose por ello que no contienen sustancias que afecten la rotación óptica.

La propiedad llamada 'rotación óptica' se define normalmente como  $\alpha$  y por convención, si se tiene una celda de 100 mm de longitud, una temperatura de 20°C y se usa una  $\lambda$  correspondiente a la línea D del sodio (589 nm), la rotación específica de la sacarosa se muestra en la figura 2.

$$\text{Sacarosa } [\alpha]_D^{20} = +66.53^\circ \text{ C}$$

Figura 2. Rotación óptica de la sacarosa.

El signo '+' indica que la rotación del plano de luz polarizada será hacia la derecha, o dextrorrotatoria. Cuando la sacarosa es separada en sus dos componentes, fructosa y glucosa, la solución resultante rotará la luz polarizada hacia la izquierda o será levorrotatoria. Esta inversión de dextro a

levorrotación ha dado el nombre de azúcar invertido a la mezcla de glucosa-fructosa resultante de la hidrólisis de la sacarosa. También, puesto que la glucosa rota la luz polarizada hacia la derecha recibe el nombre de dextrosa y de manera análoga, la fructosa recibe el nombre de levulosa.

La explicación del cambio de rotación hacia la derecha de la sacarosa a rotación a la izquierda de la hidrólisis de esta, se entiende porque la fructosa tiene una rotación específica negativa más grande que la rotación específica positiva de la glucosa, como se muestra en la siguiente figura :

$$\text{Glucosa } [\alpha]_D^{20} = +57.2^\circ \quad \text{Fructosa } [\alpha]_D^{20} = -92.4$$

Figura 3. Rotación óptica de la glucosa y fructosa

Todos los azúcares son reactivos, sin embargo, con la sacarosa, los principales sitios reactivos de la glucosa y la fructosa están unidos unos a otros. Los dos monosacáridos son entonces, más reactivos que la sacarosa, y son conocidos como azúcares reductores por su habilidad de actuar como agentes reductores.

La sacarosa seca, cristalina es normalmente estable arriba de su punto de fusión. La sacarosa fundida se puede descomponer rápidamente en glucosa y fructosano. Si es calentada hasta cerca de 200°C se producen una serie de descomposiciones muy complejas. El resultado es una mezcla café oscura, no dulce y soluble en agua llamada caramelo.

Los azúcares reductores formados de la sacarosa pueden reaccionar con aminoácidos y proteínas para dar origen a pigmentos café oscuros conocidos como melanoidinas. Esta reacción conocida como "reacción de Maillard" produce también compuestos volátiles con fuertes notas de olor y sabor.<sup>[Bil9]</sup>

## 2.2. Melazas o mieles incristalizables

Las melazas o mieles incristalizables son el resultado de las operaciones de evaporación y cristalización, es decir, el producto final del proceso de refinación. Otra forma de definir las es como el producto que resulta de separar los cristales de sacarosa por centrifugación de la última masa cocida que se obtiene en la fabricación de la azúcar y contiene la mayoría de los no-azúcares presentes en la caña.

La composición promedio de las melazas se muestra con detalle en el anexo 1. De esta miel no es posible recuperar más cristales de sacarosa aunque sea llevada a una elevada concentración, lo que se debe al alto porcentaje de sales y de glucosa que contiene.<sup>[1][10][13]</sup>

Si se quiere definir estrictamente el concepto de melazas es necesario establecer una distinción entre melazas teóricas y melazas prácticas. La melaza teórica es una mezcla de agua, azúcar y otros compuestos, tal que ya no puede cristalizar más la sacarosa residual, aún en las mejores condiciones físicas y técnicas. Una melaza práctica es aquella masa cocida de la que ya no puede recuperarse una cantidad significativa de sacarosa.<sup>[2][13]</sup>

Existen definiciones basadas en la formación de las melazas o mieles incristalizables, las cuales coinciden en señalar que se trata de una combinación hidratada de consistencia líquido-siruposa de sacarosa, fructosa y sales orgánicas e inorgánicas en diferentes proporciones.<sup>[11]</sup> Se trata pues de líquidos muy viscosos y altamente coloreados cuyo uso principal es la producción de alcohol por fermentación, suplemento animal, sustrato para la industria biotecnológica de fermentaciones y en algunos casos se utilizan como saborizantes.<sup>[4][13]</sup>

Como sustrato en la industria de las fermentaciones, las melazas tienen gran importancia siendo base en la producción de alcohol etílico (como en México y Brasil), ácido cítrico, láctico, acético, málico, glucónico y furfural, entre otros. Existe la posibilidad de recuperar CO<sub>2</sub> de algunas de estas fermentaciones como un subproducto más.<sup>[2][13]</sup>

En general, su composición varía con la eficiencia del proceso, condición inicial de la materia prima y agentes externos como ataque bacteriano a la caña de azúcar. Aunque existe una completa clasificación de las melazas de acuerdo a su composición (contenido de azúcar principalmente) en este trabajo se considera solo un tipo de melaza puesto que el objetivo es probar nuevas tecnologías en la medición de sacáridos.

Aproximadamente 40-60% de las melazas es sacarosa y azúcares invertidos, también contienen una alta concentración de no-azúcares y otros materiales del proceso de refinación, es decir, contienen todas las impurezas que trae el jugo y que no fueron eliminadas por la defecación y aquellas que se formaron en el proceso por la adición de reactivos y calentamientos prolongados.

En el siguiente cuadro, se muestra la composición promedio de las mieles incristalizables

<b>COMPOSICIÓN MEDIA DE LAS MELAZAS</b>	
CONSTITUYENTES	PORCENTAJE
AGUA	20
CONSTITUYENTES ORGÁNICOS :	
SACAROSA	32
GLUCOSA	14
FRUCTOSA	16
RAFINOSA	> 0.1
NO AZÚCARES : MATERIALES NITROGENADOS, ÁCIDOS LIBRES Y COMBINADOS, GOMAS SOLUBLES	10
CONSTITUYENTES INORGÁNICOS :	
SiO <sub>2</sub>	0.5
K <sub>2</sub> O	3.5
CaO	1.5
MgO	0.1
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.2
Na <sub>2</sub> O	0.2
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.001-0.005
Residuos sulfatados	1.6
Cloruros	0.4

Tabla 1. Composición media de las melazas

### 2.2.1. Teorías de formación de las melazas

Existe una teoría química descrita por Calles y López Negrete basada en la solubilidad de la sacarosa y del aumento de ésta en presencia de ciertas sales, las que reciben el nombre de cuerpos melacígenos, cuerpos que poseen la propiedad de aumentar la solubilidad de la sacarosa. "Todas las sales, tanto orgánicas como inorgánicas, se combinan con la sacarosa para formar cuerpos hidratados, teniendo cada uno de estos cuerpos su propia solubilidad" <sup>[11-12]</sup>

Se han realizado pruebas en las que se demostró que el potasio es una de las sales que originan combinaciones no cristalizables, deduciendo de ahí la formación de sacarato de potasio. También se ha demostrado que, como regla general, la solubilidad del azúcar en la melaza es mayor en solución alcalina.

En un estudio realizado por Geerligts se elaboró una melaza artificial usando mezclas de azúcar, miel pura y diversas sales como acetatos de potasio, carbonatos de sodio y calcio, sales inorgánicas como cloruros, sulfatos y otras sales. De esta experiencia se dedujo que la formación de las melazas se debe al hecho de que tanto el azúcar como la glucosa y aquellos productos de descomposición de la última, tienden a combinarse con las bases de las sales, actuando, hasta cierto punto como ácidos. <sup>[11]</sup>

Causas que favorecen la formación de las melazas:

- a) La presencia de no-azúcares
- b) La formación de compuestos moleculares entre el azúcar y las sales orgánicas
- c) Inversión de la sacarosa por la acción de ácidos
- d) Un exceso de cal que actúa sobre la glucosa presente
- e) Alta viscosidad de los jarabes resultantes
- f) Una cristalización defectuosa

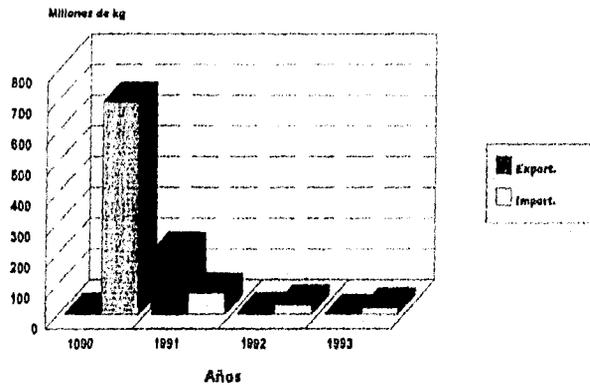
### 2.2.2. Producción mercado mundial

Las mieles que se comercializan internacionalmente provienen en su mayoría de mieles de caña de azúcar producidas en países de escaso desarrollo, mientras que las mieles de remolacha producidas en países de mayor desarrollo se autoconsumen.

Las mieles que comúnmente se comercializan son las mieles finales, sin embargo, durante los últimos años se han desarrollado producciones de mieles ricas para fines industriales. La producción mundial se ha mostrado una tendencia a la alza, principalmente desde 1980.

### Importación-exportación de azúcar

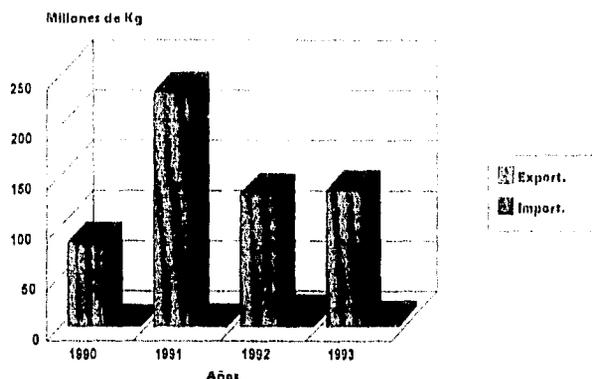
Incluye azúcar refinada y mascabado.



Fuente: Anuario estadístico de los EUM.  
Fracciones decimales 17 01 11 03 y 17 01 12 01

Gráfica 1. Importación exportación de azúcar 1990-1993. Fuentes [14-17]

### Importación-exportación de melazas.



Fuente: Anuario estadístico de los E. U. M.  
Fracciones arancelarias 17.03.10.01 y 17.03.10.02

Gráfica 2. Importación exportación de mieles incristalizables 1990-1993. Fuentes [14-17]

### 2.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE SACÁRIDOS

A lo largo del tiempo, se han desarrollado diversos métodos para cuantificar la cantidad de azúcares presentes en los alimentos, mismos que van desde las determinaciones de azúcares reductores totales y directos por métodos volumétricos, hasta métodos sofisticados que emplean columnas cromatográficas y detectores automatizados.

Esta necesidad ha sido principalmente alentada por la importancia económica que representa la determinación de estos, aunque el interés científico también ha jugado un papel decisivo. Por ejemplo, se determina el pago de la caña de azúcar en función de la cantidad de sacarosa, el azúcar refinado debe de tener una cantidad mínima de sacarosa, según normas, las melazas son clasificadas y vendidas en diferentes precios de acuerdo a la concentración de azúcares, etc.

La industria azucarera ha adoptado, desde hace tiempo, la polarimetría como medida oficial para la determinación de sacarosa. Pero este procedimiento, a pesar de ser muy rápido y práctico tiene algunos inconvenientes, así, se están buscando métodos más exactos para la cuantificación de la sacarosa dado que una lectura incorrecta de ésta representa pérdidas económicas cuantiosas.

Entre estas nuevas tecnologías se encuentra la polarimetría en la zona del infrarrojo y la cromatografía de líquidos en diversas modalidades; CLAR (Cromatografía de líquidos de alta resolución o HPLC por sus siglas en inglés), CGL (cromatografía gas-líquido), CIAR o CIAAR (Cromatografía iónica de intercambio aniónico de alta resolución HPIC o HPAEC por sus siglas en inglés), IC/IR (cromatografía de intercambio catiónico/índice de refracción, CE/RI, por sus siglas en inglés), y la CIMDIPA (Cromatografía de intercambio iónico/detección integrada por pulsos amperométricos, IC/IPAD, por sus siglas en inglés), de las cuales se discutirán, en capítulos posteriores la polarimetría y la CLAR.

#### 2.4. IMPACTO AMBIENTAL

"En el siglo XIX cuando se dibujaba una fábrica echando humo era sinónimo de progreso, tecnología y un futuro promisorio. Hoy día es sabido que la revolución industrial ha traído consigo aparte de éxito y progreso contaminación y destrucción ambiental. En el Final del siglo XX se tiene la conciencia de que el 100% de los procesos industriales tienen un impacto sobre el ambiente y con ese conocimiento se ha luchado por la modificación de la tecnología hacia procesos con un mínimo de impacto."<sup>[18]</sup>

Lo anterior es un punto importante en la búsqueda de nuevos métodos de cuantificación de sacarosa, ya que la determinación convencional por polarimetría involucra, de manera oficial, el uso de subacetato de plomo en la determinación de este carbohidrato en todas las etapas del proceso, desde la obtención del jugo de caña hasta el control de calidad del producto final en la compra-venta de azúcar.

Otros métodos emplean en mayor o menor concentración, diferentes reactivos que tienen un fuerte impacto ambiental si no son tratados de forma adecuada, en adición a los costos más elevados, ya sea por equipo requerido o por el tiempo que representa su realización.

Se tiene conocimiento de que el uso de acetato de plomo causa pérdidas de sacarosa durante el procedimiento analítico, pero lo que ahora concierne es que estas sales luego de ser usadas son desechadas a ríos, campos y áreas circundantes y el plomo es un metal tóxico a la salud humana y animal, de alta residualidad y letalidad en dosis bajas.<sup>[18][19]</sup>

En respuesta, se están haciendo estudios con otros productos defecantes como el cloruro de bismuto, sales de aluminio, sales de zinc, sales estanosas, resinas iónicas y agentes comerciales flocculantes. En este rubro la búsqueda continúa todavía, buscando el mejor flocculante, más barato, más rápido y con menos impacto al ambiente.

También, como se ha mencionado, existe la filosofía de evitar el uso de clarificantes durante los análisis, para lo cual se ha propuesto el uso de la cromatografía de gases, la de líquidos en diferentes modalidades y la tecnología de alta longitud de onda por polarimetría infrarroja.

## 2.5. EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

En el renglón de la industria azucarera, es bien sabido que por más de un siglo - desde 1842- se ha confiado en los métodos polarimétricos para conocer el contenido de sacarosa de la caña. Sin embargo, el desarrollo de los métodos cromatográficos a través de 30 años y especialmente en los últimos 10, han brindado un camino para distinguir entre múltiples componentes en las muestras.<sup>[21-22]</sup>

La palabra cromatografía se deriva de los vocablos "khromatos", que significa color y "graphos" que significa escritura. La cromatografía fué descubierta por el botánico Tswett (1903) al separar por primera vez los pigmentos de plantas utilizando una columna de vidrio empacada con un material adsorbente. Desde entonces han sido desarrolladas diversas técnicas cromatográficas basadas en el principio de adsorción o partición.<sup>[23]</sup>

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria que presenta una gran superficie de contacto y una fase móvil que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.<sup>[23][24]</sup>

Los sistemas cromatográficos incluyen sistemas de separación e identificación al mismo tiempo y hacen posible la medición de sacarosa y otros compuestos encontrados en las muestras, cualquiera que ésta sea (jugo de caña, melaza, vinazas, azúcar etc.).

Dentro de la cromatografía existen algunas subdivisiones dependiendo básicamente del sistema utilizado para analizar y separar la muestra, es decir, de qué modo se tiene que preparar la muestra para su análisis. De este modo, se tiene la cromatografía de gases con sus diferentes sistemas de detección, la cromatografía de líquidos con sus variantes, la cromatografía en capa fina, de intercambio iónico y de filtración en gel entre otras.

La cromatografía en papel y en capa fina están consideradas como técnicas inferiores en el análisis de azúcares debido a su pobre eficacia en la separación, tiempos largos de análisis y dificultades en la cuantificación. La cromatografía de intercambio iónico (CII) ha conseguido excelentes separaciones, pero con tiempos largos de análisis y temperaturas muy altas. La cromatografía de filtración en gel es particularmente útil en la separación de polisacáridos de alto peso molecular sin necesidad de hidrolizarios, pero la resolución es limitada y los tiempos de análisis largos.<sup>[22]</sup>

A continuación se describen las generalidades y diferencias de la cromatografía de gases y de líquidos como las técnicas más ampliamente utilizadas para el análisis de azúcares.

### 2.5.1. LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica analítica usada para la separación, identificación y medida de los componentes de una mezcla. Como se ha mencionado, se basa en la diferencia de velocidades de migración de los componentes de una mezcla, al ser arrastrados por un gas inerte a través de un tubo relleno de un material adecuado.

Los métodos de identificación y cuantificación de carbohidratos por cromatografía de gases se han desarrollado continuamente, principalmente para su uso analítico en laboratorio; siendo la razón principal, que es necesaria una reacción química para la preparación de la muestra. Aún así, la CG ha tenido aplicación en la industria; ejemplo de ello es que en Sudáfrica se ha autorizado como método oficial de análisis de caña de azúcar y mieles finales.<sup>[21]</sup>

El fundamento de la CG es la separación de los componentes por medio de su afinidad a un medio o fase estacionaria principalmente por su polaridad. La fase móvil es un gas, y la estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Cuando la fase estacionaria es un líquido, el sistema se llama cromatografía gas-líquido; y el mecanismo de separación es por partición. Cuando la fase estacionaria es un sólido el sistema es llamado cromatografía gas-sólido y el mecanismo de separación es por adsorción.<sup>[26-27]</sup>

En cuanto a la muestra a separar, ésta debe cumplir con ciertos requisitos, a saber :

- Deben ser gases, o en su defecto
- Deben ser volátiles
- Su temperatura de vaporización debe ser menor a la de su descomposición.<sup>[28]</sup>

El método de cromatografía de gases fué iniciado por los científicos ingleses A. T. James y A. J. P. Martin en 1941. Comenzó a utilizarse en laboratorios a partir de 1950 y la construcción de equipos comerciales se inició en 1955.

El primer reporte de análisis de carbohidratos por cromatografía de gases (CG) aparece en la literatura en 1958 pero fue hasta la aplicación de la técnica de la formación de trimetil-silil derivados en los carbohidratos por Sweeley y colaboradores (1963) cuando se inició el rápido desarrollo en esta área.<sup>[25]</sup>

Puesto que los carbohidratos no son volátiles se debe recurrir a una técnica alternativa para poder ser analizados por esta técnica. Es así que se forman derivados químicos volátiles en los que han sido intercambiados los grupos hidroxilo (OH) por grupos éster o éter.

Los derivados más comúnmente utilizados son los éteres trimetilsilanos (TMS), conocidos comúnmente como trimetilsilil derivados, aunque se emplean también los derivados de acetatos, las oximas, diferentes metil-derivados, acetatos de aldital, etc.<sup>[25]</sup>

### Partes de un cromatógrafo de gases

Como partes esenciales de un cromatógrafo de gases se cuentan

- a) **El gas de arrastre**, encargado de hacer circular la muestra por el sistema cromatográfico y que generalmente se trata de N<sub>2</sub>, Ar, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> o mezclas como Ar/5% metano. Debe cumplir con varios requisitos, entre los cuales tenemos: Alta pureza (cualquier impureza equivale a la presencia de una muestra adicional); Sensibilidad (Dado que el gas de arrastre fluye constantemente por el sistema, producirá una señal de fondo la cual influirá sobre la sensibilidad del detector usado); Velocidad (La velocidad del análisis dependerá de la velocidad de difusión de los componentes de la mezcla en el gas de arrastre). Como condición adicional, éste debe ser inerte a la muestra en estudio ya que está en contacto constante con la muestra durante todo el análisis.
- b) **Sistema de muestreo**, que nos permite introducir la muestra al sistema en forma adecuada evitando pérdidas.
- c) **Columna cromatográfica**, que puede ser de acero, aluminio, vidrio o algún polímero sintético y por su diámetro puede ser empacada o capilar. Su función es contener la fase estacionaria que efectúa la separación misma de la muestra.
- d) **Fase estacionaria**, también conocida como fase líquida, es la encargada de hacer la separación de los componentes. Puede ser muy variada, desde los poliésteres a las gomas de silicón, pasando por los derivados de silicones polares. Las mejores separaciones de monosacáridos se obtienen con fases polares; sin embargo, no pueden aplicarse a disacáridos por la limitación de la temperatura, en cuyo caso la fase estacionaria más usada es la de silicón polar OV-17. El soporte de la fase cromatográfica puede ser muy variado, pero se emplean Chromosorb G y W.
- e) **Detector**, encargado de registrar los fenómenos ocurridos en la columna. Existe una gran variedad de detectores como el de conductividad térmica o universal, ionización de flama y captura de electrones por mencionar algunos
- f) **Graficador**, tiene la función de dar una señal gráfica proporcional a la respuesta del detector. Actualmente los graphicadores han sido sustituidos por modernos sistemas computarizados de mayor rapidez, exactitud y que almacenan la información al mismo tiempo.

La señal gráfica del detector es muy similar en todos los equipos de cromatografía, y la información que brinda se explica a continuación :

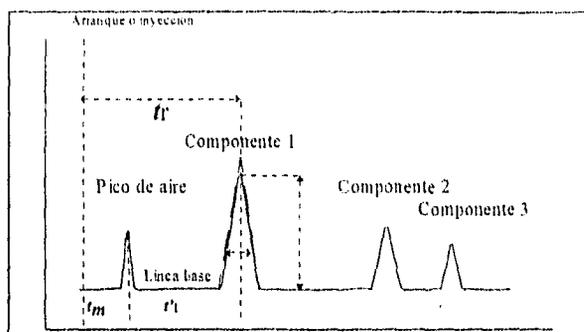


Figura 4. Señal gráfica de un análisis cromatográfico.

- Línea base** - La línea dibujada por el registrador en ausencia de muestra
- $t_m$**  - Tiempo muerto, es el tiempo de elución o retención del aire a temperatura y flujo constante. Se usa para calcular el tiempo de retención corregido.
- $t_r$**  - Tiempo de retención, es el tiempo que tarda en eluir un componente a flujo y presión constantes, desde el punto de inyección hasta el pico de la señal.
- $V_m$**  - Volumen del gas de arrastre necesario para arrastrar el aire en la línea, es igual al volumen de aire desde el punto de inyección hasta el máximo de la señal.
- $t_r'$**  - Tiempo de retención corregido, es la distancia entre  $t_r$  del aire y  $t_r$  del componente.
- $W_b$**  - Ancho de la base, es la distancia entre las intersecciones de las tangentes a los puntos de inflexión con la línea base.
- $h$**  - Altura del pico, la distancia perpendicular desde la línea base y la máxima inflexión del pico.

### 2.5.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica desarrollada recientemente, pero su aplicación en la industria azucarera fue aceptada hasta 1979 para determinación de sacarosa.<sup>[29]</sup> Esta técnica evolucionó de la cromatografía de líquidos que requería tiempos de análisis muy largos, hasta lograr, a mediados de los sesentas, separaciones comparadas a las logradas en cromatógrafos de gases.

Las últimas características de los sistemas de CLAR incluyen bombas de alta presión capaces de proveer solvente (fase móvil o eluyente) de un contenedor externo a una columna separadora [que contiene la fase estacionaria], antes de la cual se ubica un inyector que introduce la muestra en la corriente.

Su fundamento, al igual que la CG, es la separación debido a interacciones específicas entre las moléculas de la fase estacionaria y el eluyente, es decir, se realiza la partición de cada uno de los componentes de una mezcla entre las dos fases. Si los componentes de una mezcla presentan diferencias en sus coeficientes de

partición, cada uno de ellos se distribuirá y desplazará con velocidades distintas a lo largo de la columna, lo cual permitirá su separación.<sup>[30-31]</sup>

Una de las grandes ventajas de esta técnica es que las muestras requieren de una mínima preparación antes de ser analizadas, a pesar de que, mientras más compleja sea la muestra más complejo será el tratamiento. De existir, proteínas y grasas deben ser retiradas de la muestra para evitar daños en la columna. Para remover estas impurezas menos polares es común el uso de minicolumnas como las Waters Sep-Pak C<sub>18</sub> o equivalente, en las que lípidos y proteínas son retenidas, en tanto que los azúcares pasan libremente.<sup>[33]</sup>

Partes de un cromatografo de líquidos

Las partes que integran un CLAR son muy similares a aquellas en CG:

- a) **Fase móvil o eluyente**, que depende en general del tipo de análisis, para el caso de azúcares se utilizan mezclas de acetonitrilo/agua aumentando la proporción de agua a medida que es mayor el peso molecular de los azúcares.
- b) **Columnas cromatográficas**, cuyo desarrollo en el caso de el análisis de azúcares ha sido espectacular. En el período anterior a 1970 se utilizaban columnas Sephadex, con baja resolución y grandes tiempos, luego de la introducción de las columnas de filtración sobre gel se acortaron los tiempos y se mejoró la resolución. Con columnas de intercambio iónico se separaron mezclas de monosacáridos entre 1-4 h. A estas siguieron las hoy utilizadas columnas de sílice con 5 y 10 mm con fases polares ligadas como grupos amino.
- c) **Detector**, puesto que los carbohidratos no poseen grupos cromóforos o fluoróforos no se facilita la detección por U.V-Vis o por fluorescencia. La mayoría de los carbohidratos absorben en la región del U.V. cercano, 180-220 nm, pero a estas longitudes de onda se tienen interferencias de muchos otros componentes, por lo que se requiere de solventes de una pureza muy alta, siendo así, descartado como método de rutina.  
El detector por índice de refracción con mucho el más utilizado en el análisis de alimentos, es inespecífico, sensible a la temperatura y afectado por la composición del solvente, debido a lo cual no se pueden realizar análisis con gradientes.
- d) **Graficadores**, comúnmente sustituidos por software en computadoras, registran y cuantifican las señales arrojadas por los detectores.

El desarrollo en la química de las columnas y en la tecnología de los detectores promete grandes avances; actualmente, la tecnología de punta en el análisis de carbohidratos incluye columnas de intercambio aniónico y detectores por pulsos amperométricos, con lo cual la CLAR es más cercana a la CG.

### 2.5.3. C.L.A.R. Vs C.G.

Como sucede muy comúnmente, no existe técnica que sea la "ideal" o perfecta, siempre existe algún factor que interviene haciéndola más o menos adecuada. Dado lo anterior, se enlistan a continuación una serie de razones por la cual se considera mejor una u otra técnica para la determinación de sacarosa :

La CLAR es particularmente útil y rápida cuando se trata de muestras con matrices simples, y resulta de gran utilidad en grandes volúmenes de análisis, el pretratamiento de la muestra es mínimo y señales sencillas son obtenidas para cada carbohidrato <sup>[21-22][32]</sup>; en contraparte la CG requiere pretratamientos para la muestra que, en particular en el caso de los carbohidratos son más complejos (recordar la derivatización simplemente) y, a causa de ello, los costos de análisis son más elevados, a pesar de que algunos autores demuestran que en algunos casos es posible evitar algunos pasos <sup>[18][32]</sup>.

La sensibilidad de los detectores empleados en la CG es muy superior, la resolución es mayor comparado con la CLAR, que presenta el inconveniente de sobreestimar el contenido de fructosa por cerca del 10% debido a que ciertos componentes eluyen al mismo tiempo. Otro punto a señalar son los tiempos de análisis, que en la CG son más largos, por las temperaturas usadas algunas muestras se ven afectadas, estos aspectos son mejorados en la CLAR. <sup>[21-22][25][32-33]</sup>

### 2.6. ANÁLISIS POLARIMÉTRICO

Con el inicio de la producción industrial de azúcar, inmediatamente surgieron las primeras investigaciones en instrumentación para la medición de la calidad del azúcar, la efectividad de cada uno de los pasos del proceso y la evaluación del azúcar final por propósitos de pago.

En los inicios, el contenido de azúcar era determinado por la medición de la densidad física con la ayuda de un hidrómetro. La primera escala de azúcar usada para la polarimetría data de esta época. Una solución de azúcar con una densidad de 1.100 g/cm<sup>3</sup> correspondía a una cantidad pesada de 26 g de sacarosa pura en 100 mL de agua, y fue declarada en ese entonces como 100 grados de azúcar (S°).

El primer polarímetro práctico fue construido aproximadamente en 1870 por los fundadores de la casa comercial Schmidt & Haensch. Tiempo después, cuando se descubrió que el cuarzo y el azúcar comparten las mismas propiedades ópticas, se construyó un polarímetro visual con cuña de cuarzo. <sup>[34]</sup>

Es así que por más de una centuria, la industria manufacturera y refinadora del azúcar ha usado la polarimetría como técnica oficial en la determinación de sacarosa.

La polarimetría es rápida, con una alta repetibilidad y, como se ha mencionado, es una medida indirecta: 'el cambio en la rotación de la luz correlacionado con la cantidad de sustancia óptica en la muestra', en otras palabras, la lectura del polarímetro (POL) representa la rotación neta de la luz que pasa por la muestra y es la suma algebraica de las rotaciones de todos los compuestos presentes. [21]

Es bien conocida la situación en la que otros compuestos presentes en la solución posean también actividad óptica (como la glucosa, fructosa, etanol, ácido láctico) dado lo cual la lectura de sacarosa es errónea, en mayor grado mientras más impura sea la muestra. La reproducibilidad y rapidez de la polarimetría provocó que la exactitud pasara como término secundario, lo cual provocó la "pérdida" de medición real de millones de toneladas de azúcar.

Teniendo en mente lo anterior, se han desarrollado diferentes técnicas para determinar la cantidad de sacarosa presente, de la forma más confiable y representativa. En los productos impuros que contienen otras sustancias polarizantes como rafinosa, fructosa, aminoácidos etc., la determinación de sacarosa utilizando sólo un polarímetro requiere de métodos de múltiple polarización, entre los que el método de Clerget es un ejemplo particular.<sup>[35]</sup>

En el caso de que el producto no contenga rafinosa, se hacen dos polarizaciones: una directa y la otra después de una hidrólisis. El contenido de sacarosa se deduce del cambio de polarización debido a la hidrólisis, dando por hecho que las impurezas polarizantes no son afectadas por los reactivos hidrolizantes y que se comportan de manera idéntica en ambas mediciones.

En cualquiera de los casos, el riesgo de error siempre está presente ya que en el caso de la hidrólisis muchos compuestos diferentes a la sacarosa pueden ser hidrolizados y debido a que a la lectura contribuyen todos los compuestos ópticamente activos, las correcciones por cambios en la temperatura son necesariamente inciertas, recomendándose que, si es posible, todas las polarizaciones se efectúen a 20°C para evitar correcciones.<sup>[36]</sup>

### 2.6.1. POLARIMETRÍA CONVENCIONAL Y EN INFRARROJO CERCANO

#### Polarimetría

El fundamento de la polarimetría es la cuantificación de una sustancia determinada que posea actividad óptica. Como se ha mencionado, existen ciertas sustancias que tienen la capacidad de rotar un haz de luz polarizada en un plano, y esta propiedad es proporcional a la cantidad de la sustancia presente, es decir, a mayor cantidad de sustancia mayor será la rotación del haz de luz inicial.

Un polarímetro mide la rotación de una muestra en grados angulares y está constituido por las siguientes partes:

**Fuente de luz**, que generalmente es una lámpara de halógeno que emite una longitud de onda de 589.44 nm (línea amarilla del sodio) y para el polarímetro infrarrojo a una longitud de onda de 882.60 nm (infrarrojo cercano)

**Prisma polarizador**, el cual polariza el haz de luz proveniente de la fuente en un solo plano, que se dice es determinado por el vector eléctrico

**Tubo de polarización**, que contiene en solución la muestra bajo estudio.

**Prisma analizador**, gracias al cual se determina los grados que ha rotado el haz de luz original

El principio básico de funcionamiento es como sigue: Se enciende una fuente de luz, misma que atraviesa un prisma polarizador que origina un haz de luz polarizado en un plano, el cual atraviesa un tubo de muestra, para finalmente llegar a otro prisma de la misma naturaleza que el prisma analizador.

Si los ejes de los prismas son paralelos, se observa el campo de luz totalmente iluminado, y si no son paralelos se observa el campo totalmente oscuro. Normalmente se busca que el campo de luz sea totalmente oscuro. Si ahora se introduce una sustancia ópticamente activa se altera el plano de polarización de la luz y algo de luz pasará a través del prisma analizador. Rotando el prisma analizador unos grados a la izquierda o a la derecha se tendrá nuevamente el campo totalmente oscuro.

El ángulo descrito ( $\alpha$ ) para lograr esto es igual a los grados que la sustancia ópticamente activa ha rotado la luz polarizada. Este ángulo a es llamado rotación observada.

Existen ahora dos tipos de polarímetros cuya diferencia radica en la longitud de onda empleada para realizar la lectura, a saber: El polarímetro tradicional (polarímetro universal o UNV) que trabaja a  $\lambda=589.44$  nm, y el reciente polarímetro infrarrojo (polarímetro infrarrojo cercano o NIR) que trabaja a  $\lambda=882.60$  nm. Este último fue creado como una alternativa para evitar el uso de clarificantes como el subacetato de plomo en los análisis.

Dado que este último está en su fase inicial de venta a los consumidores potenciales (laboratorios analíticos de los ingenios azucareros), en este estudio se comparará su operatividad con respecto al tradicional y a un cromatógrafo de líquidos. En el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida para lograr esta comparación.

Antes de iniciar con la metodología, se considera necesario mencionar lo siguiente:

Cuando el polarímetro es utilizado como sacarímetro y es calibrado con cuarzos certificados, el valor mostrado por los equipos es válido para tubos de polarización de 200 mm mientras no se especifique otra convención para el equipo.

Las unidades más comunes en la medición de sacarosa por polarimetría son los grados S o °S, que son las unidades internacionales de la escala de medición de azúcar (por sus siglas en inglés "ISS") y corresponden a una proporción específica de por ciento en peso de sacarosa en una cantidad determinada de muestra.

Por convención<sup>1</sup>, 100°S equivalen a una solución 26% de sacarosa (26gr/100 mL agua destilada). En la sesión de 1986 del comité internacional para la unificación de métodos de análisis de azúcar (por sus siglas en inglés "ICUMSA") se decidió adoptar una nueva escala internacional para medición de azúcar, puesta en marcha a partir del 1° de julio de 1988 y que adopta la denominación de °Z para distinguirla de la escala antigua.

Este cambio fue necesario para realizar experimentos en una solución normal de sacarosa en el Physikalisch-Technische Bundesanstalt (Alemania) y en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (por sus siglas en inglés "NIST"), donde se llevaron a cabo mediciones de rotación óptica con los equipos más avanzados obteniéndose una rotación de 40.777° para una solución normal de sacarosa usando, al vacío, la línea verde del mercurio <sup>198</sup>Hg ( $\lambda=546.2271$  nm) medida a 20.000°C en una celda de polarización de 200 mm, en lugar del valor anterior de 40.765°

De este modo y con esta redefinición, toda la información generada en °S debe ser cambiada a °Z, para tal motivo, cualquier valor obtenido con la escala anterior debe ser multiplicado por un factor de 0.99971 o, disminuido en 0.029% para cumplir con la nueva disposición.

---

<sup>1</sup> Al principio, la concentración de azúcar se determinaba midiendo la densidad física con ayuda de un hidrómetro o densímetro. La primera escala introducida en la polarimetría por Ventzke data de esa época. A una solución de azúcar con una densidad de 1.100  $\frac{g}{cm^3}$  corresponde a una cantidad de 26 g de sacarosa pura en 100 mL de agua, y fueron declarados como 100 °S

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Origen de las muestras :

Los azúcares utilizados se obtuvieron de tiendas de autoservicio de la Cd. de México. Las melazas usadas fueron obtenidas del ingenio El Carmen, Veracruz, siendo conservadas durante el estudio a una temperatura de 4°C.

De un punto de vista general, el desarrollo del estudio se puede explicar como sigue:

- Verificación de la linealidad de los polarímetros y calibración de las celdas.
- Calibración del cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR).
- Comparación entre los métodos de clarificación y capacidad de los polarímetros para leer soluciones coloridas. (polarímetros).
- Análisis de las melazas : Polarimétrico, cromatográfico y por espectroscopia de absorción atómica.

A continuación se describe cada una de las etapas mencionadas anteriormente :

### 3.2 Calibración de los instrumentos

- **Verificación de la linealidad de los polarímetros. Calibración de las celdas.**

#### Material y equipo

Polarímetros Schmidt Haensch	Universal $\lambda=589.44$ nm
	Infrarrojo $\lambda=882.60$ nm
Tubos de polarización de 200, 100 y 50 mm	
Sacarosa grado R.A.	

#### Procedimiento :

Se revisa el correcto funcionamiento de los polarímetros con sus correspondientes cuarzos, colocando éstos en el compartimiento de lectura y comparando la lectura obtenida con la reportada en el certificado del cuarzo. Lo anterior se realiza a 20°C.

Cada una de las celdas fué limpiada completamente y sometida a lectura sin muestra, con objeto de observar la existencia de actividad óptica propia de los vidrios.

Para verificar el intervalo de linealidad bajo el cual operan los instrumentos, se realizó una curva de calibración desde 0 a 150% usando sacarosa R.A. y agua destilada. Las lecturas fueron realizadas a 20°C, cuando fué posible.

En el caso en que la lectura no fuese a 20°C se aplicó la siguiente ecuación :

$$P_{20} = P_t [1 + 0.0003(t - 20)]$$

Fig.5 Ecuación de Pol, en función de la temperatura <sup>[35]</sup>

Las soluciones de sacarosa fueron preparadas de acuerdo a la relación 100 °Z = 26 g<sup>sacarosa</sup>/100ml y de acuerdo a la relación mostrada más adelante. Posteriormente fueron filtradas usando filtros Whatman Nº 42 y, finalmente, se colocaron en tubos de polarización de 200mm ajustando la temperatura a 20 °C y tomando lecturas por cuadruplicado.

Grados Z	g de Sacarosa R.A.	Aforo final
0	0.00	100
0.05	0.013	100
0.1	0.026	100
0.5	0.13	100
1.0	0.26	50
5.0	1.3	50
10	2.6	25
20	5.2	25
40	10.4	25
60	15.6	25
70	18.2	25
80	20.8	25
90	23.4	25
100	26	25
150	39	25

Tabla 2. Curva de calibración para los polarímetros.

• **Calibración del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.**

Material y equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Perkin Elmer  
 Bomba binaria modelo 200 Perkin Elmer  
 Interfase serie 900 Perkin Elmer  
 Detector de Índice de refracción Perkin Elmer  
 Estándares de Glucosa, Fructosa y Sacarosa grado R.A.  
 Acetonitrilo grado HPLC  
 Agua desionizada  
 Baño ultrasónico  
 Filtros 0.2 mm y cartuchos sep-pack para HPLC

Procedimiento :

La calibración consiste en la preparación de estándares de cada uno de los azúcares a detectar para así indicar al cromatógrafo los tiempos de retención y área bajo la curva para concentraciones específicas para, de este modo, poder obtener resultados con mayor rapidez.

Los estándares de fructosa, glucosa y sacarosa fueron elaborados en concentraciones 1, 5 y 10% (P/V), filtradas a través de membranas de 0.12 mm de diámetro e inyectadas en el CLAR de acuerdo a las siguientes:

Condiciones experimentales para CLAR

Columna	Altech Versapack 200 mm Sílica Aminobonded
Fase móvil	Acetonitrilo:Agua 75:25
Flujo de la fase móvil	2 mL/min
Detector	Índice de refracción
Volumen de inyección	20 mL

Se realizaron las inyecciones por triplicado y los resultados de éstas se promediaron para ser introducidas en el ordenador que controla al CLAR y procesa los resultados.

### 3.3 Comparación entre métodos de clarificación y capacidad de los polarímetros de lectura en soluciones coloridas

Material y equipo

Polarimetría :

Tubos de Pol	200 mm, 100 mm y 50 mm
Temperatura	20 °C

Cromatografía:

Las mismas condiciones y equipo mencionados anteriormente.

Clarificación

Acetato de plomo básico R.A.	Oxalato de potasio anhidro
Tricloruro de aluminio R.A.	Celite
Hidróxido de calcio	Tierra de diatomeas
Alcohol etílico 96°GL	Filtros Whatman Nºs 2 y 42
Embudos de filtración rápida	

Los datos obtenidos de esta comparación son tratados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) del cual, se muestra un ejemplar en el anexo 2.

Procedimiento

**Clarificación con acetato de plomo**

Con objeto de observar el comportamiento de los polarímetros ante soluciones de diferente coloración, se prepararon soluciones 1N (26g/100 mL) de azúcar blanca, morena y moscabado. Antes de llevar a la marca de aforo se añadió solución saturada de acetato de plomo en exceso tan pequeño como fue posible, eliminando éste con oxalato de potasio anhidro. Se filtró con papel Whatman N° 2 y 42, empleando tierra de diatomeas como filtro ayuda. Se determinó la lectura directa en los polarímetros y su correspondiente lectura en el CLAR.

Adicionalmente, se realizó la determinación de sacarosa por el método de Jackson y Gills que consiste en realizar dos lecturas, una directa y otra después de hidrolizar la muestra con ácido clorhídrico. Se realiza la lectura del invertido con el objeto de verificar la eficacia del acetato de plomo en la eliminación de polímeros como las dextranas. Mientras más cercanas sean las lecturas obtenidas por este método y por una polarización directa, mejor será la acción del agente clarificante.

**Lectura directa :** Se preparan 100 mL de una solución normal del azúcar a analizar, se filtra con un papel filtro Whatman # 40 con objeto de eliminar las impurezas gruesas. Se coloca la solución en el tubo de polarización y se realiza la lectura de  $^{\circ}Z$  en ambos polarímetros.

**Lectura del invertido :** Se pesa la cantidad adecuada de la muestra de azúcar para preparar 100 mL de una solución normal, se añade 1 mL de solución de acetato de plomo neutro para clarificar, o la cantidad suficiente para que la solución quede clara.

El exceso de plomo se elimina añadiendo oxalato de potasio en el menor exceso posible, lo cual es corroborado por la ausencia de formación de un precipitado blanco al añadir el oxalato. Se afora y se filtra con un filtro Whatman # 40 usando tierra de diatomeas como filtro ayuda.

Se toman dos porciones de 50 mL del filtrado y se colocan en matraces de 100 mL. A la primera porción, se le añaden 2.315g de NaCl y se afora al volumen. La temperatura deberá ser 20°C.

La segunda porción se hidroliza usando 10 mL de HCl<sub>conc</sub> y se mantiene por 13 minutos -tiempo total- a 60 °C, para ser enfriado posteriormente hasta 20 °C aforando al volumen final.

Se realiza la lectura de la muestra y el hidrolizado, y se calcula la cantidad de azúcar corrigiendo la lectura al peso normal de la solución, de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$\alpha = \frac{100(P - P')}{132.56 - 0.0794(13 - c) - 0.53(t - 20)}$$

Figura 6. Ecuación de Jackson y Gills para calcular azúcar por hidrólisis [36]

en donde  $P$  y  $P'$  son las lecturas de la muestra y el hidrolizado respectivamente,  $C$  es la lectura de sólidos totales por refractometría. (no la lectura de °Z del instrumento) y  $t$  es la temperatura a la que se realiza la lectura.

Cada análisis de la muestra se realizó por duplicado como mínimo, y la lectura en los instrumentos se realizó por cuadruplicado, mostrándose más adelante, el promedio de las lecturas.

La cantidad de azúcar en las muestras se compara con el resultado obtenido por CLAR. Este dato se usó como referencia para el contenido de azúcar, ya que es una de las técnicas más precisas y, por consiguiente, fué la base de comparación para ambos polarímetros.

#### **Clarificación con alcohol etílico**

Como es bien sabido, el etanol tiene cierta actividad óptica. Por esta razón se decidió estudiar la respuesta de los polarímetros ante distintas cantidades de etanol manteniendo constante la concentración de sacarosa. Se preparó una serie de 10 frascos de acuerdo a la siguiente tabla :

Solución "stock" de sacarosa R.A. 100 °Z (26g/100 mL)		
mL "stock" de sacarosa	mL de etanol	aforo con agua
2	0	25
2	1	25
2	2	25
2	3	25
2	5	25
2	7	25
2	9	25
2	10	25
2	15	25
2	23	25

Tabla 3. Condiciones de trabajo para estimar el efecto del alcohol etílico en la lectura de azúcar en los polarímetros.

De este estudio se obtuvo la proporción de etanol/agua que altere en la menor proporción la lectura real.

Teniendo como fundamento el hecho de que el etanol posee la capacidad de precipitar material con un peso molecular mayor a 10,000 daltons, se utilizó como agente clarificante.<sup>[37]</sup>

De este modo se elaboraron soluciones 2N del azúcar a analizar, se tomó una alícuota de 10 mL y se aforó a 50 mL con EtOH al 96%. Se deja reposar y se filtra usando filtro Whatman Nº2. El filtrado es analizado en los instrumentos de la manera descrita realizando la corrección al peso normal de la muestra.

#### ***Clarificación con $AlCl_3$ /CaOH 2:1***

Se ponen a peso constante los reactivos R.A., se muele finamente el  $AlCl_3$  y se mezcla perfectamente con el CaOH. Se añaden las sales floculantes (aprox. 2-3g) a las soluciones 1 N de azúcar hasta obtener un filtrado claro, se lleva a la marca del aforo y se procede después a la filtración como ya se ha mencionado.

### **3.4 Análisis de las melazas.**

Procedimiento :

Para el análisis de las melazas se procedió a realizar una dilución 1:1, de la cual se prepararon soluciones 1N (26g/100mL) previamente clarificadas de la misma forma que los azúcares usando acetato de plomo, etanol y tricloruro de aluminio/hidróxido de calcio procurando mantener las mismas condiciones de temperatura.

Para el análisis por CLAR, la muestra fué filtrada adicionalmente con cartuchos sep-pack con objeto de eliminar lípidos y proteínas que podrían quedar atrapados en la columna y restarle vida útil.

### 3.5. Análisis por espectrofotometría de absorción atómica

Material y equipo :

Espectrofotómetro de absorción atómica Varian modelo SpectrAA 400	Micropipetas de 1 y 5 mL
Lámparas de Fe, Cu, Pb, Cd,	Ácido perclórico concentrado
Acetileno	Ácido nítrico concentrado
Oxido nítrico	Agua desionizada.

#### Digestión de la muestra vía húmeda

La digestión consiste en la destrucción de la materia orgánica por acción de los ácidos nítrico y perclórico. Ésta se aplicó a dos muestras de diferente concentración y por ello se usaron diferentes condiciones para cada una.<sup>[36-40]</sup>

La preparación de las muestras inicia con la realización de las diluciones pertinentes, normalmente se preparan muestras muy concentradas para poder realizar lecturas a niveles "traza". Se agrega ácido nítrico y perclórico sometiendo la muestra a baño de arena a temperatura constante.

Las condiciones se muestran a continuación :

	Muestra 1 - Melaza 1:1 a 26g/100 mL	Muestra 2 - Melaza 1:1
Muestra, mL	5	5
HNO <sub>3</sub> ,	2	3
HClO <sub>4</sub> ,	2	3
Temperatura, °C	90	90
Tiempo, h	48	48
Segunda etapa		
HNO <sub>3</sub> ,	1	2
HClO <sub>4</sub> ,	1	2
Temperatura, °C	90	90
Tiempo, h	24	24

Tabla 4. Mineralización de la materia orgánica por vía húmeda, condiciones para recipiente abierto

Como condición, las muestras a introducirse en el espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) deben ser incoloras, ya que la presencia materia orgánica colorida<sup>2</sup> puede interferir en la lectura (se forman complejos organometálicos que provocan lecturas erróneas).

Como método alternativo se empleó la mineralización de la materia orgánica por vía seca, que se describe a continuación:

<sup>2</sup> La absorción de fondo (en inglés "background absorption") que es una interferencia, surge del hecho de que no todos los materiales de la matriz del analito son atomizados al 100%. Las formas no disociadas de materiales matriciales pueden tener bandas de absorción muy anchas y confundirse con la del analito, además de que partículas finas en la flama pueden dispersar la luz a una longitud de onda más amplia. Esto origina errores en las lecturas. Sin embargo, la presencia de color no indica necesariamente materia orgánica, pues algunos metales pueden producir ciertas tonalidades.

Se pesa una cantidad del homogeneizado de la muestra colocándose en una cápsula de porcelana y se seca a la estufa a 110-160°C durante 4 horas. Una vez seca la muestra, se coloca en la mufla y se eleva la temperatura gradualmente hasta alcanzar los 450°C manteniéndola hasta cenizas blancas que se enfrían en el desecador. Este método no es aplicable para la determinación de metales o metaloides volátiles como mercurio o arsénico entre otros.

#### Método de destrucción de la materia orgánica

Procedimiento:

Se toma una cantidad homogeneizada de la muestra, se coloca en una cápsula de porcelana o crisol y se coloca en la estufa a 110°C por 24 hrs para su secado. Posteriormente, se calcina con un mechero hasta obtener cenizas negras y ausencia de humo. Se termina la calcinación en la mufla a 450 °C hasta la obtención de cenizas blancas.[39]

Las cenizas obtenidas de este modo son disueltas en ácido nítrico al 1 a 2% (v/v) y, finalmente, son filtradas con fibra de vidrio Whatman GF/A.

Las condiciones de trabajo del equipo de EAA son las siguientes :

	Fe	Cu	Cd	Ca	Pb
Corriente, mA	5 mA	5 mA	4 mA		5 mA
Combustible	Acetileno	Acetileno	Acetileno		Acetileno
Soporte	Aire	Aire	Aire		Aire
Estequiometría	Oxidante	Oxidante	Oxidante		Oxidante
Long. de onda, nm	372 nm	324.7 nm	228.8 nm		217 nm
Abertura "slit", nm	0.2 nm	0.5 nm	0.5 nm		0.5 nm
Flujo aire					
Flujo acetileno					

Tabla 5. Condiciones de trabajo para espectrofotometría de absorción atómica.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Calibración de instrumentos.

Se muestran los resultados de la calibración de los instrumentos, como señal de su correcto funcionamiento. Como se mencionó en el capítulo anterior, UNV es el polarímetro universal y NIR es el de infrarrojo cercano.

° Z Teórico	Lectura UNV	Lectura NIR
0	0	0
0.05	0.035	0
0.1	0.085	0.0974
0.5	0.465	0.479
1.0	0.975	0.99
5.0	5.04	4.9925
10.0	10.02	9.955
20.0	19.93	19.825
40.0	39.935	39.815
60.0	59.73	59.587
70.0	69.005	68.86
80.0	79.53	79.36
90.0	89.80	89.603
100.0	99.125	98.955
150.0	149.184	148.94

Tabla 6. Resultados de la calibración de los polarímetros.

#### Análisis de regresión lineal

	a	b	r
NIR	0.01	0.9920	0.9999911
UNV	-0.0145	0.9939	0.9999898

Tabla 7. Análisis de linealidad de la lectura de los polarímetros.

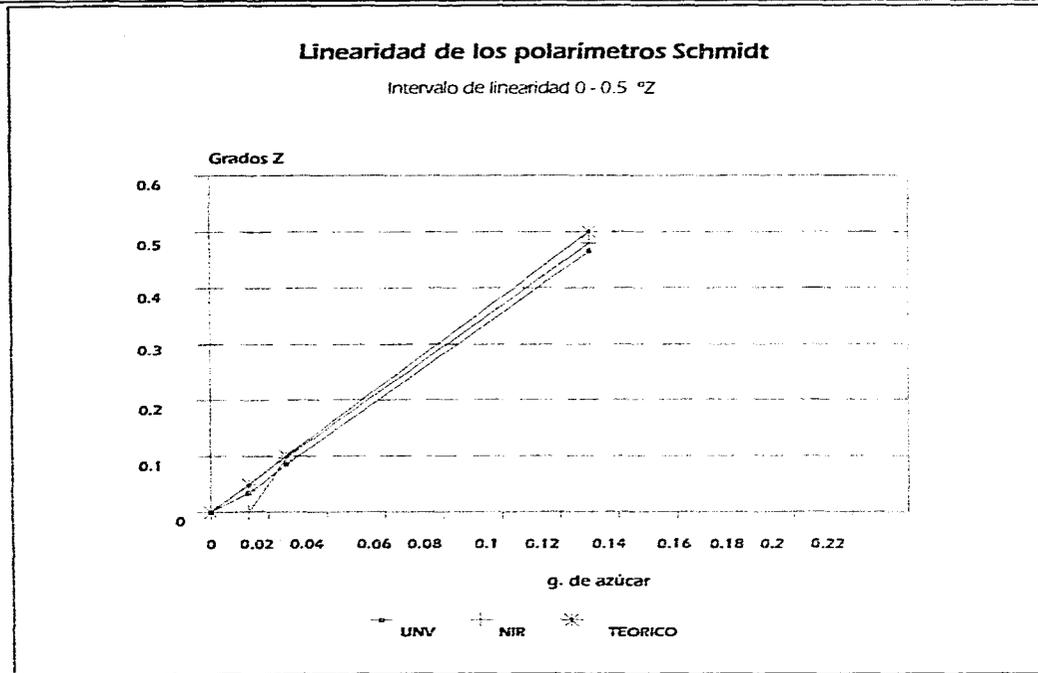
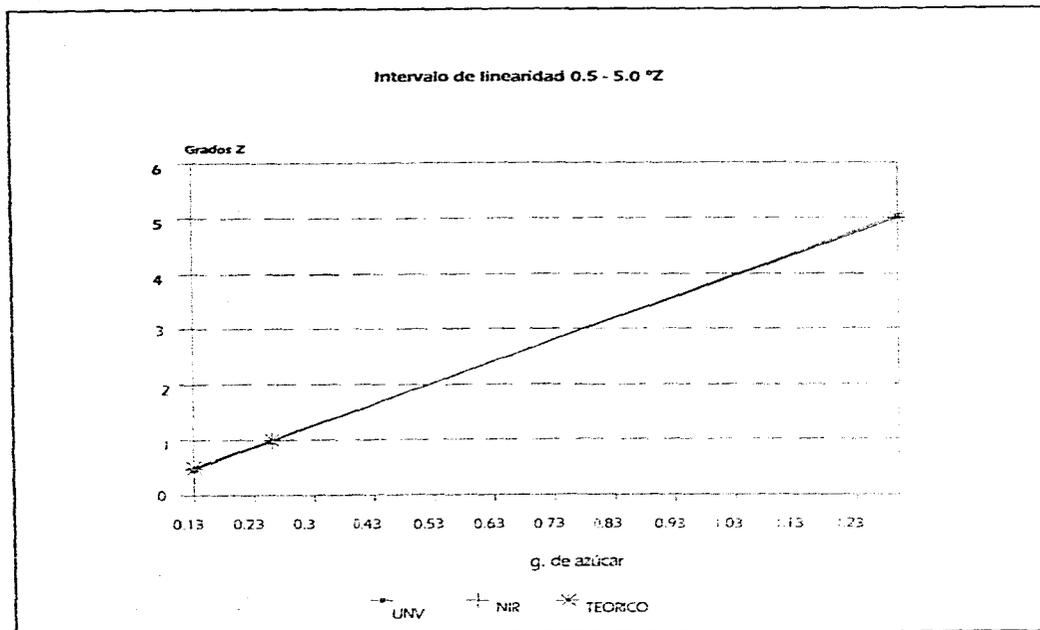


Fig. 3x. Ilustración de la linealidad de los polarímetros en el intervalo 0.0 - 0.5 °Z.\*

\* Como se puede apreciar en la tabla 6.0, los valores obtenidos en ambos polarímetros son muy cercanos, por lo que en la gráfica parecen estar sobrepuestos.

Fig. 3<sub>B</sub> Ilustración de la linealidad de los polarímetros en el intervalo 0.5 - 5.0 °Z.

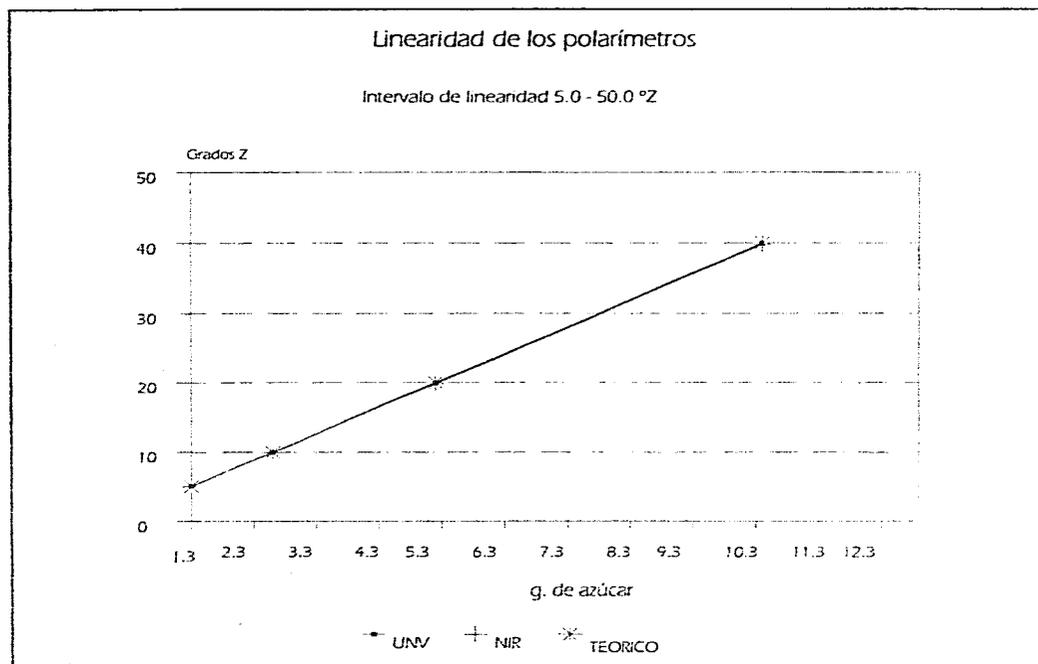


Fig. 3c- Ilustración de la linealidad de los polarímetros en el intervalo 5.0 - 50.0 °Z.

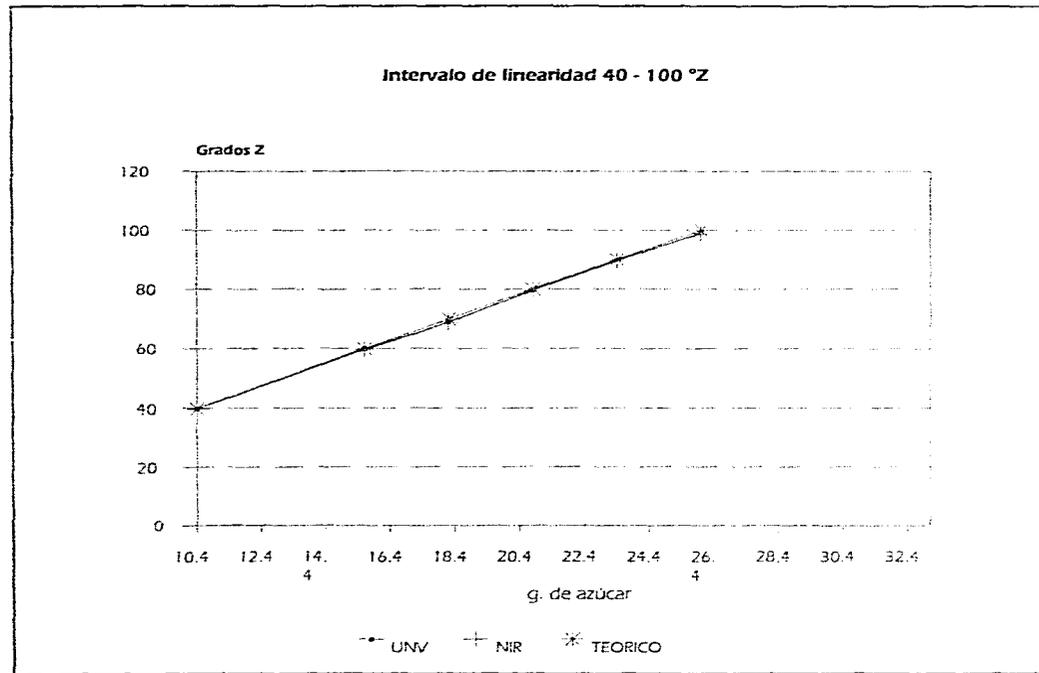


Fig. 3<sub>e</sub> ilustración de la linealidad de los polarímetros en el intervalo 40 - 100 °Z.

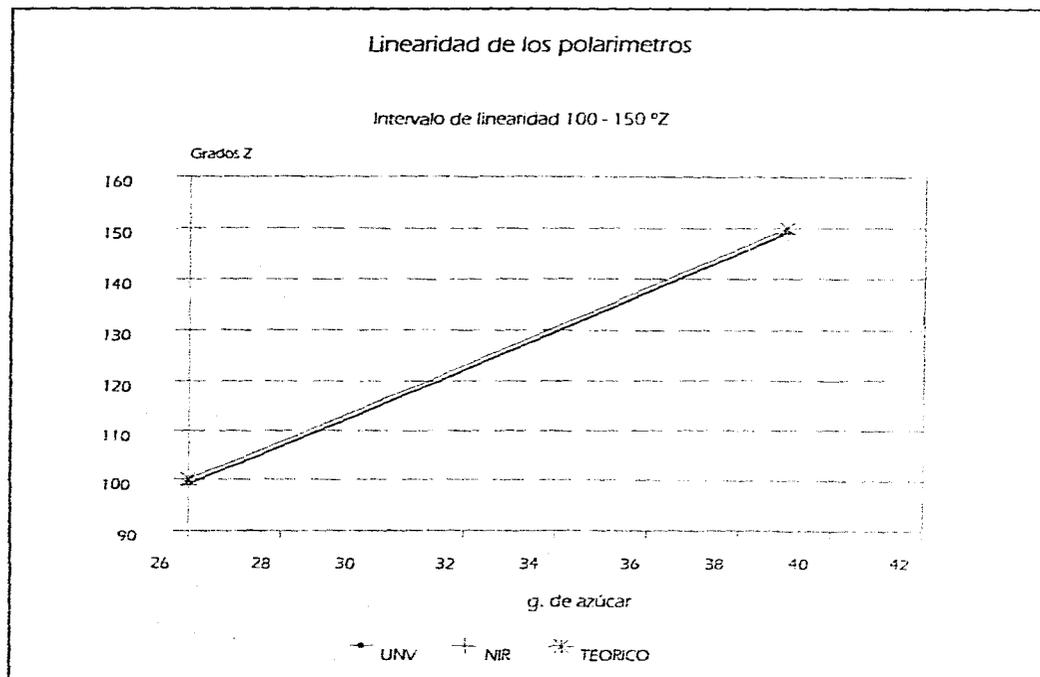


Fig. 3<sub>c</sub>- Ilustración de la linealidad de los polarímetros en el intervalo 100 - 150 °Z.

4.2. Pruebas con agentes clarificantes y lectura de soluciones coloridas

Tratamiento con acetato de plomo como agente clarificante						
	Z UNV	Z NIR	g Azúcar UNV	g Azúcar NIR	g Azúcar por Hidrólisis	g de azúcar por HPLC
Azúcar blanca. Sólidos totales por refractometría: 24 2666 g/100 mL	92.63	92.45	24.095	24.035	31.73	25.91
Azúcar morena. Sólidos totales por refractometría: 23 8 g/100 mL	98.05	98.09	25.496	25.500	32.51	25.56
Azúcar moscabado. Sólidos totales por refractometría: 23 666	97.29	97.16	25.295	25.260	34.45	25.65

Tabla 8. Resultados del análisis de azúcares con PbAcO

Tratamiento con Alcohol etílico como agente clarificante									
	Lectura directa.				Lectura del clarificado				HPLC
	Z UNV	Z NIR	g UNV	g NIR	Z UNV	Z NIR	g UNV	g NIR	
Azúcar Blanca. Temperatura de trabajo 17.5 °C	96.337	96.15	25.045	25.00	97.49	97.40	25.34	25.32	26.2
Azúcar morena. Temperatura de trabajo 17°C	96.69	96.61	25.14	25.12	96.68	96.41	25.135	25.065	
Azúcar moscabado. Temperatura de trabajo 17°C	95.97	96.02	24.95	24.97	97.35	97.07	25.31	25.24	25.33

Tabla 9. Resultados del análisis de azúcares con EtOH.

Tratamiento con AlCl <sub>3</sub> como agente clarificante									
	Lectura directa.				Lectura del clarificado				HPLC
	Z UNV	Z NIR	g UNV	g NIR	Z UNV	Z NIR	g UNV	g NIR	
Azúcar Blanca	99.69	99.57	25.92	25.89	98.90	98.42	25.71	25.59	25.88
Azúcar morena	98.99	98.94	25.74	25.72	98.85	98.76	25.70	25.68	25.997
Azúcar moscabado	97.58*	98.71	25.37*	25.66	97.53	97.46	25.36	25.34	

Tabla 10. Resultados del análisis de azúcares con AlCl<sub>3</sub>

\* Indica que el polarímetro indicaba obstrucción, y la lectura nunca fue estable.

Análisis de las melazas de ingenio azucarero							
trata- miento	pol. Universal g de sacarosa		pol. Infrarrojo g de sacarosa		C.L.A.R. en gramos		
	Directo	Clarif.	Directo	Clarif.	Fru	Glu	Sac
EtOH	-	7.29	7.18	7.69	3.125	1.737	18.09
AlCl <sub>3</sub>	-	6.93	7.44	7.1	3.55	2.04	21.67
Filtro	-	7.29	7.94	7.31	3.1	1.92	17.9

Tabla 11. Resultado del análisis de sacarosa en mieles incristalizables

Los cromatogramas más representativos de análisis de azúcar y melazas, así como los datos de la integración se muestran en el anexo 3.

#### 4.3. Análisis de melazas por espectrofotometría de absorción atómica

Elemento	ppm (mg/L)	Técnica
Hierro (Fe)	103.16	Vía húmeda
Plomo (Pb)	11.488	Vía seca
Cobre (Cu)	92	Vía seca
Cadmio (Cd)	0	Vía seca

Tabla 12. Resultados de metales en melazas por absorción atómica

#### 4.4. Discusión

Se puede observar que los polarímetros presentan un intervalo de linealidad muy similar en el que, como es de esperar, a concentraciones muy bajas la respuesta no es muy buena (esto es muy notorio en el NIR). Se puede observar que el polarímetro infrarrojo tiene una tendencia a observar valores ligeramente menores al universal. Debe hacerse notar que el valor teórico de azúcar nunca fue alcanzado por los instrumentos.

El cromatógrafo de líquidos presentó una buena resolución entre las señales de fructosa, glucosa y sacarosa, la variabilidad entre una y otra inyección fue mínima. La calibración del instrumento no presentó ningún problema.

Después de realizar un análisis de varianza se pudo observar que no existe diferencia significativa entre los polarímetros, no importando el tipo de tratamiento aplicado.

Es muy importante resaltar que el polarímetro infrarrojo presentó en casi todas las lecturas valores menores a los reportados en el polarímetro universal.

Se piensa que este fenómeno puede deberse a la diferencia en la longitud de onda, es decir, al aumentar esta es posible que una cantidad menor de moléculas ópticamente activas sean "atravesadas" por el haz de luz, provocando que la lectura sea menor.

En todos los casos, el cromatógrafo de líquidos tuvo la lectura más alta, y fue la pauta para la comparación del instrumento más cercano al valor teórico. Tomando este criterio estrictamente el polarímetro universal fue el que mejor se acercó al dato real. Nuevamente se subraya que, estadísticamente, no hay diferencia significativa entre los dos polarímetros en la lectura de sacarosa.

En el renglón de lectura de soluciones coloridas, fue obvio que el polarímetro universal no es capaz de realizar lecturas a líquidos oscuros. Para ello requiere de una celda de menor longitud conforme la intensidad de la solución se incrementa. En el caso extremo, las melazas, no existe celda suficiente, se requieren realizar diversas diluciones a fin de lograr la lectura. (Sin olvidar el paso de la clarificación)

El polarímetro infrarrojo (NIR) realiza la lectura de estas soluciones de una manera más rápida sin mermar la exactitud de la medición.

La determinación de azúcar por el método de Jackson y Gills (hidrólisis de la muestra) muestra que el acetato de plomo neutro no es un agente eficaz para eliminar los polímeros de glucosa, (como las dextranas) que están presentes aún en el azúcar. (Se incrementan al disminuir la pureza del azúcar, blanca, morena y moscabado)

En lo que respecta a los tratamientos con agentes clarificantes, se demuestra mediante el análisis de varianza que existe una diferencia significativa entre los tratamientos que emplean acetato de plomo y tricloruro de aluminio/hidróxido de calcio 2:1. Esto se debe a que comparativamente, en el tratamiento con acetato de plomo se obtienen, en promedio, las lecturas más bajas de sacarosa y con el  $AlCl_3/(CaOH)_2$  las lecturas más altas (y las más similares a aquellas obtenidas en el CLAR).

La diferencia también indica que con la mezcla  $AlCl_3/(CaOH)_2$  se obtiene la mejor clarificación, sin embargo, es necesario juzgar otro criterio: El tiempo de filtración. En una escala comparativa, el clarificante que más tiempo requiere para filtrar es el  $AlCl_3/(CaOH)_2$  seguido del acetato de plomo y finalmente, el etanol es el más rápido.

Este criterio práctico es uno de los más importantes puesto que las determinaciones de sacarosa en los ingenios deben de realizarse en el menor tiempo posible.

El tratamiento usando etanol como agente clarificante tiene una ventaja más, a saber, permite la separación de las dextranas de una forma limpia, que pudiera representar, más adelante, el uso de este nuevo subproducto en la industria de los aditivos alimentarios donde tiene gran aplicación.

Sobre el empleo del etanol, existen algunos inconvenientes tales como su volatilidad; se detectaron variaciones en las lecturas debido a la evaporación y subsecuente concentración de la muestra. Esto obliga a trabajar rápidamente y a la temperatura ambiente o menor de ser posible, con lo que se hace necesaria la corrección de las lecturas así obtenidas.

En segunda instancia y, como se mencionó anteriormente, el etanol es una molécula ópticamente activa, influyendo así, aunque en menor grado, en los resultados finales.

Puesto que estas melazas se emplean como complemento para alimento animal y como sustrato para diferentes fermentaciones, se realizó la búsqueda de metales pesados que pudieran ocasionar problemas, ya sea de toxicidad o durante la fermentación. El cadmio está ausente, los niveles de plomo son bajos tomando en cuenta que las melazas siempre se diluyen para su uso, y los niveles altos de hierro y cobre pueden deberse a desgaste del equipo (tuberías, tanques...etc.) empleados para el proceso. Si se aplica el criterio de la dilución y no se considera un problema grave, pero sí debe tomarse en cuenta.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 5.1. Conclusiones.

1. **A**mbos instrumentos, el polarímetro universal y el infrarrojo muestran un excelente intervalo de linealidad desde 0 hasta 150 %Z.
2. Ambos instrumentos observaron valores por debajo del valor teórico, aún trabajando a 20°C. Se observa que el NIR tiene valores más cercanos al teórico en el intervalo 0-10 %Z, en el resto muestra valores ligeramente inferiores al polarímetro UNV, del cual se puede decir que fue el que presentó los valores más cercanos al teórico en el intervalo 10 - 150 %Z.
3. En general, el polarímetro NIR presenta valores ligeramente menores que el UNV.
4. Estadísticamente, no existe diferencia significativa entre las lecturas obtenidas por el polarímetro universal y el infrarrojo.
5. La presencia de partículas suspendidas en las soluciones a ser analizadas en los polarímetros afecta la lectura siendo todavía más notorio en soluciones muy coloridas.
6. Estadísticamente existe una diferencia significativa entre el uso de acetato de plomo (datos más lejanos al valor real) y la mezcla  $AlCl_3/Ca(OH)_2$  (valores de sacarosa más altos), no así entre los clarificantes anteriores comparado con el etanol.
7. El tratamiento con plomo no elimina eficientemente las dextranas, que se hacen presentes en el momento de la hidrólisis de la muestra "clarificada".
8. El tratamiento con etanol elimina en gran proporción las dextranas, e inclusive disminuye la coloración, por lo que facilita la lectura de la muestra.
9. El etanol debe usarse a determinadas concentraciones para minimizar en lo posible su influencia sobre la lectura del polarímetro ya que posee cierta actividad óptica. Para usarse etanol al 96% como agente clarificante se deberá usar en una proporción aproximada de 45% del volumen a aforar, a fin de lograr la menor interferencia posible. Adicionalmente, se pueden usar filtros de poro grande en la filtración sin peligro de que pasen partículas en suspensión.
10. La mejor velocidad de filtración se obtiene usando etanol y la más lenta usando la mezcla  $AlCl_3/Ca(OH)_2$ .
11. Los niveles de metales pesados en las melazas no representan peligro tomando en cuenta que, en el empleo de éstas en las diferentes industrias que la requieren, las diluyen.

## 5.2. Recomendaciones

### ***En cuanto a los instrumentos :***

- El uso del polarímetro infrarrojo para la lectura de soluciones altamente coloridas, pero sin ninguna partícula en suspensión que altere la lectura. El polarímetro universal puede ser usado para muestras menos coloridas y, al igual que el anterior, sin partículas en suspensión.
- Las membranas de filtración como alternativa a la aplicación de agentes clarificantes en soluciones que no tengan una gran cantidad de sedimento que pudiera tapar los poros de la membrana.

### ***En cuanto a los tratamientos :***

- Es necesario en el caso del etanol establecer factores de corrección de acuerdo a la cantidad usada, por lo que se recomienda realizar estudios más específicos sobre ello.
- Por cuestiones prácticas, la filtración y lecturas de las soluciones así clarificadas deberá ser lo más rápido posible con objeto de disminuir la evaporación. Del mismo modo se recomienda trabajar a temperatura ambiente (si es menor a 20°C) o enfriar el alcohol con el mismo objetivo.
- En la determinación de elementos por absorción atómica se recomienda el uso de la vía seca mientras los elementos no sean volátiles (As, Mo, Hg) en estos casos se recomienda la vía húmeda, e incluso la digestión vía húmeda usando microondas en un recipiente cerrado.
- Se recomienda estudiar la posibilidad de extracción de dextranas como una alternativa de uso de sub-productos, y buscar una aplicación adecuada.

**CAPITULO 6.0 BIBLIOGRAFÍA.**

1. *Manual de los derivados de la caña de azúcar.* ICIDCA-GEPLACEA-PNUID Colección GEPLACEA, serie Diversificación pp 3-46, 1990.
2. Birch G. G., Parker K. J. *Sugar: science and technology.* Applied Science Publishers Ltd., Londres pp 17-28, 129 y 221-253, 1978.
3. Duran de Bazúa C. *Calidad total en la industria de proceso. Caso tipo: Ingenios Azucareros* Presentado en Congreso de la Asociación Nacional de Ingeniería. México., 1994.
4. Pennington N., Baker C. *Sugar. A user's guide to sucrose.* AVI, Nostrand Reinhold, N.Y., 1990.
5. Hart H., Schuetz R *Estereoisomerismo y actividad óptica* en *Química orgánica.* Publicaciones Cultural S.A. 1ª Edición, pp 105-125, México, 1980.
6. Morrison R. T. *Química orgánica.* 5ª Edición. Allyn & Bacon Inc, Boston. pp 126-130, 1988
7. Streitewieser A. *Química orgánica.* 1ª Edición. Ed. Iberoamericana, México pp 105-114, y 211 1979.
8. Badui D. S. *Hidratos de carbono,* en *Química de los alimentos.* 3ª Edición. Editorial Alhambra, México. pp 47-49 y 62, 1993.
9. Fennema O. R. *Food chemistry.* 2ª Edición. Marcel Dekker Inc., N.Y. pp 96, 861., 1985.
10. Robledo V. R. *Tratamiento de las mieles incristalizables de los ingenios azucareros y estudio de las variaciones en su composición.* Tesis de Licenciatura U.N.A.M. E.N.C.O., 1955.
11. Calles y López Negrete H. *Desaparición del azúcar invertido de las melazas por medio del metabolismo microbiano para lograr una cristalización posterior de la sacarosa restante* Tesis de licenciatura. U.N.A.M. E.N.C.O., 1943
12. Galli J. A. *Pretreatment of molasses to prevent incrustations during distillation* Chemical abstracts 89:7950 f. 1977.

13. Franco Coops A. *Proceso de elaboración de algunos productos de demanda nacional a partir de mieles incristalizables*. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. Facultad de Química., 1973.
14. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Publicaciones del I.N.E.G.I. 1990.
15. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Publicaciones del I.N.E.G.I. 1991.
16. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Publicaciones del I.N.E.G.I. 1992.
17. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Publicaciones del I.N.E.G.I. 1993.
18. Estuardo Araujo B. *Disminución del impacto ambiental por la eliminación del plomo en los análisis de la agroindustria azucarera, estudio por absorción atómica, HPLC, IC, Colorimetría y métodos infrarrojos*. Documento técnico. Servicios científicos y profesionales. Mel de México S.A. C.V. , 1994
19. Valle Vega P. *Toxicología de los alimentos*. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. México. pp. 92-98, 1991.
20. Paturau J. M. *Byproducts of the sugarcane industry*. Elsevier Pub. Co. N.Y. , 1969.
21. Vercellotti S. V., Clarke M. A. *Comparison of modern and traditional methods of sugar analysis* Int. Sugar J. 96:437-441, 1994.
22. Hernández M., Juárez M. *Utilización de las técnicas cromatográficas en el análisis de alimentos*. Revista Alimentaria, 186:13-20, 1987.
23. Velasco Rosas L. *Determinación de carbohidratos en manzana por GC y HPLC*. Tesis de licenciatura. U.N.A.M. Facultad de Química. , 1994.
24. Ravindanath B. *Principles and practice of chromatography*, Ellis Horwood Ltd. Pub. Londres pp 23-27,68-69. 1989
25. Bradbury A. W. *Gas chromatography of food carbohydrates in food*, en Gas chromatography in food analysis. Butterworths, Londres, 1976.
26. Storch de García A. *Fundamentos de la cromatografía de gases*. 2ª Ed. Alhambra, España pp 1, 12-15, 1975.

27. Grob R. *Modern Practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons. EEUJA. pp 5, 167-176, 1972.
28. Snyder L. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2ª Ed. John Wiley & Sons. E.E.U.U.A. pp 126-130 y 545-549, 1976.
29. Dunsmore A. *Some findings in the quest to eliminate the use of lead in the laboratory*. Reporte técnico del Sugar Milling Research Institute - University of Natal. , 1993.
30. Lindsay S. *High pressure liquid chromatography*. 2ª Ed. John Wiley & Sons. E.E.U.U.A., 225-239, 1992.
31. Abeydeera W. P. *High performance liquid chromatographic determination of sugar on cation exchange resins*. Proceedings of Australian Society of Sugarcane Technologists. pp 71-85, 1983.
32. Scott F.. *HPLC determination of carbohydrates in foods*, en Food analysis by HPLC. Editado por Leo M. L. Nollet., Marcell Dekker Inc. N.Y. W, 1992.
33. Saska M., Wang J *Minor component interference in HPLC analysis of molasses*. Int. Sugar J. 96 : 469-471, 1994.
34. *Presentation on the history of sugar and sugar instrumentation technology*. Documento técnico de Schmidt & Haensch GmbH & Co, 1994.
35. Whalley H. C, *Métodos ICUMSA de análisis de azúcar*. Cla. editorial continental, México pp 21-25, 1971.
36. *Manual de métodos analíticos de la asociación oficial de químicos analistas (AOAC)* 14 Ed. Washington D.C, E.E.U.U.A., 1990.
37. *Dextran method*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:212-213, 1988.
38. Santos Díaz M., Cirugeda Delgado M. *Estudio del contenido de plomo y cadmio en alimentos básicos*. Rev. Alimentaria, 243:35-37, 1993.
39. Baptista de Souza J., López Goyanes A. *Plomo y cadmio en productos derivados de la pesca. Métodos de destrucción de la materia orgánica y otros aspectos*. Revista Alimentaria. 230:49-55, 1992.
40. Lozano Soldevilla F., Galindo Martín L. *Concentraciones de metales pesados en zonas corporales de *Todarodes sagittatus sagittatus* del Banco Sahariano*. Rev. Alimentaria, 203:23-26, 1989.

41. Horng P. *Principles of Sugar technology*. Vol. 1. Elsevier Pub. Co. Amsterdam, pp 2-4 y 686 ss. . 1953
42. Horng P. *Principles of Sugar technology*. Vol. 3. Elsevier Pub. Co. Amsterdam, pp 511-516 , 580-592. 1953

### **Bibliografía adicional**

43. Emmerich A. *Method description determination of the specific rotation of fructose*. Zuckerind 113:49-50
44. Paton N.H., Player M.R., The use of near infrared polarimetry to determine the polarisation of raw sugar. Technical document from CRS Limited, Central Laboratory.
45. Altenburg W., Raw sugar. Report subject G1. Technical document. USNC October 1992.
46. Report from ICUMSA annual meetings :
- Subject 4 - Polarimetry
  - Subject 5 - Quartzplates
  - Subject 6 - Spectrophotometry
  - General subject 7 - Cane sugar processing
  - Subject 7 - Color, turbidity and reflectance measurements
47. *Cromatografía de líquidos. Curso básico*. Perkin Elmer de México.
48. Hernández M. T., Sais T., Sánchez O., *Microbiología de la producción azucarera. Producciones microbianas derivadas*, Universidad Central de las Villas, Cuba. 1986.
49. Beaty R. D., Kerber J. D., *Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry*. , The Perkin Elmer corporation, Norwalk CT, EEUUA, 1993.

## ANEXO I.

## Composición promedio de mieles incristalizables de caña de azúcar.

<i>Componentes</i>			
<b>Otros carbohidratos</b>		<b>Promedio Indicativo expresado en % en melazas</b>	
Gomas solubles, xilosa, arabinosa etc.		0.72	
Almidón			
i-inositol		0.20	
Fitina		0.18	
D- manitol		0.50	
Acido urónico		1.80	
Metoxil		0.60	
<b>Cenizas (Carbonatadas)</b>		<b>Promedio Indicativo expresado en % en melazas</b>	<b>Intervalo de % de cenizas</b>
<b>Bases</b>	$K_2O$	4.80	30-50
	$CaO$	1.20	7-15
	$MgO$	0.98	2-14
	$Na_2O$	0.10	0.3-0.9
	$Fe_2O_3 / Al_2O_3$	0.12	0.4-2.5
<b>Ácidos</b>	$SO_3$	1.80	7-27
	$Cl$	1.80	12-20
	$P_2O_5$	0.60	1-10
	$SiO_2$	0.60	1-7
<b>Ácidos nitrogenados</b>		<b>Intervalo de % en melazas</b>	
Proteína cruda		2.5-4.5	
Aminoácidos		0.3-0.5	
24 ácidos presentes de los cuales :		mg por g de melazas	
Alanina		0.20-0.20.	
g-aminobutírico		0.60-0.80	
Acido aspártico		0.90-1.65	
Acido glutámico		1.02-1.04	
Glicina		0.06-0.07	
Leucina		0.03-0.05	
Licina		0.05-0.07	

## Continuación, Anexo 1. Composición de ...

<b>Ácidos nitrogenados... cont</b>		<b>Intervalo de % en melazas... cont</b>
Serina		0.39-0.80
Treonina		0.30-0.90
Valina		0.11-0.20
<b>Ácidos nucleicos básicos</b>		
Guanina		
Hipoxantina		
5-metilcitosina		
Xantina		
<b>Ácidos no nitrogenados</b>		<b>Rango en % en melazas</b>
Aconítico		1-6
Cítrico		
Málico		
Mesacónico		1-2.5
Succínico		
<b>Esteroles, ceras ...</b>		
1-Tricentanol		
Fitosterol		
Stigmasterol		
<b>Pigmentos</b>		
Clorofila		
Taninos		
Antocianinas		
<b>Vitaminas</b>		<b>mg por g de melazas</b>
Biotina	(H)	1-3
Colina	(B <sub>4</sub> )	880
Ácido fólico	(complejo B)	0.3-0.4
Niacina	(complejo B)	17-30
Ácido pantoténico	(complejo B)	20-60
Riboflavina	(B <sub>2</sub> )	2-3
Piridoxina	(B <sub>6</sub> )	1-7
Tiamina	(B <sub>1</sub> )	0.6-1.0
Fuente : (20)		

## Anexo 2

### Ejemplo del análisis estadístico realizado a tratamientos e instrumentos.

Tabla de análisis de varianza para agentes clarificantes-instrumentos, azúcar blanca.

	NIR	UNIV	CLAR	SUMAS	MEDIA	
Pb	24.035	24.094	25.91	74.039	24.6796667	
Al	25.89	25.92	25.88	77.69	25.8966667	
EIOH	25	25.045	26.2	76.245	25.415	
<b>SUMAS</b>	<b>74.925</b>	<b>75.059</b>	<b>77.99</b>	<b>227.974</b>		
<b>MEDIA</b>	<b>24.975</b>	<b>25.0196667</b>	<b>25.9966667</b>		<b>25.3304444</b>	
F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F exp	F tab	Descis
A	2.25300689	2	1.12690344	3.761955	6.94	RECHAZO
B	2.00032689	2	1.00016344	3.33885737	6.94	RECHAZO
AB						
ERR	1.19821044	4	0.29955261			
TOT	5.45234422	8				
Ho = No existe diferencia entre instrumentos						
H1 = Existe diferencia entre tratamientos						

Estimadores de medias y diferencias de medias para los agentes clarificantes e instrumentos.

Estimadores sobre el valor más cercano a m		
tratamiento	media	d
b	24.6796667	-0.65077778
IOH	25.415	0.08455556
I	25.8966667	0.56622222
Instrumentos		
IR	24.975	-0.35544444
NV	25.0196667	-0.31077778
PLC	25.9966667	0.66622222

Prueba de rango para identificar diferencias significativas entre tratamientos e instrumentos.

Nivel de confianza  $\alpha=0.95$

Prueba de rango múltiple de Duncan		
		Decisión :
Pb - Et	0.73533333	iguales
Pb - AI	1.217	diferentes
Et - AI	0.48166667	iguales
UNV - NIR	0.04466667	iguales
NIR - CLAR	1.02166667	diferentes
UNV - CLAR	0.977	iguales
Tratamientos		
P	2	3
rp	3.927	4.013
Rp	1.02478901	1.04723155
Instrumentos		
P	2	3
rp	3.927	4.013
Rp	0.99458161	1.01636262

## Anexo 3

### Ejemplos más representativos de los cromatogramas obtenidos

Azucar Morena Processed: 11-01-1994 14:31:22 segment 1, cycle 1

#### AREA PERCENT REPORT

11-01-1994 14:31:33 Version 5.1

```

Sample Name: Azucar morena           Data file A:AZMO
Date : 11-01-1994 15:16:06 Method A:MELAZA
Interfase: 16 Cycle#: 1 Operator HCG Channel#: 1 Vial#: N.A.
Starting Peak Width: 10 Thershold: 50 Area Threshold: 5000
  
```

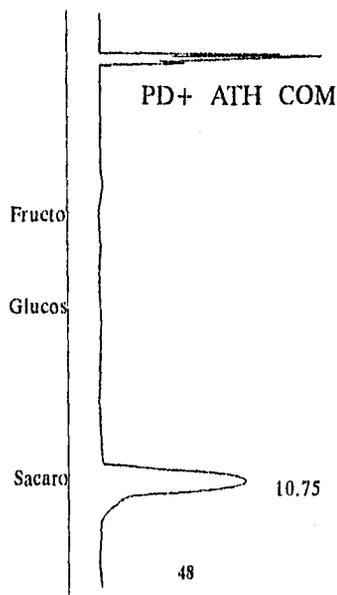
Starting delay: 2.00

Pk. No.	Ret Time	Peak Area	Area %	B L	Peak Ht.	Normalized %	Area/Height
1	10.750	44025184	100.00	1	892169	100.00	49.3

Total Area: 44025184 Area reject: 5000 one per 1.000 sec.

#### EXTERNAL STANDARD TABLE

Pk. No.	Ret Time	Peak Name	Concentration in %	Normalized conc	Area	Height	Ref Peak
1	10.750	Sacarosa	24.7574	100.00	44025184	892169	1



ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA  
 ANEXO 3

Melaza #3 AICI3 processed: 11-01-1994 14:31:22 segment 1, cycle 1

EXTERNAL STANDARD TABLE

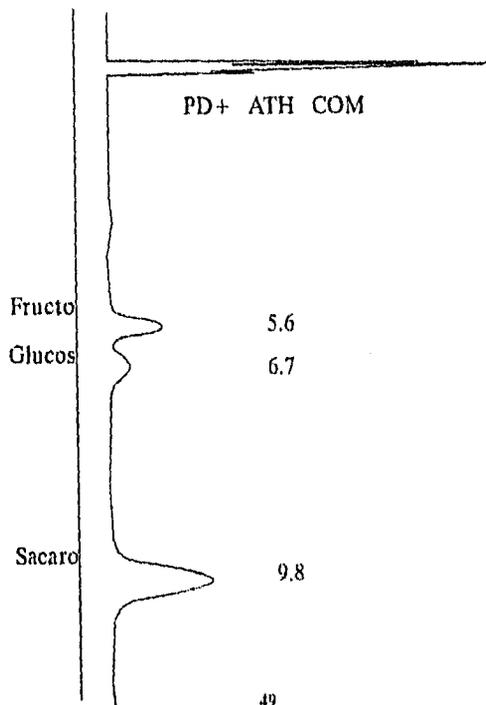
12-05-1994 13:39:22 Version 5.1

Sample Name: Melaza #3 etanol Data file A:melae7  
 Date : 12-05-1994 13:15:36 Method A:MELAZA  
 Interfase: 16 Cycle#: 7 Operator HCG Channel#: 1 Vial#: N.A.  
 Starting Peak Width: 10 Thershold: 50 Area Threshold: 5000

Starting delay: 2.00

Pk. No.	Ret Time	Peak Name	Concentration in %	Normalized conc	Area	Height	Ref Peak
1	5.667	Fructosa	0.2908	13.375	514691	30023	1
2	6.783	Glucosa	0.1374	6.3183	221514	10214	2
3	9.883	Sacarosa	1.7461	80.306	3104945	3104945	3

Total Amount: 2.1743 Area reject: 5000 one per 1.000 sec.



Melaza #3 Etanol processed: 11-01-1994 14:31:22 segment 1, cycle 1

EXTERNAL STANDARD TABLE

12-05-1994 13:39:22 Version 5.1

Sample Name: Melaza #3 etanol Data file A:mela7  
 Date : 12-05-1994 13:15:36 Method A:MELAZA  
 Interface: 16 Cycle#: 7 Operator HCG Channel#: 1 Vial#: N.A.  
 Starting Peak Width: 10 Thershold: 50 Area Threshold: 5000

Starting delay: 2.00

Pk. No.	Ret Time	Peak Name	Concentration in %	Normalized conc	Area	Height	Ref Peak
1	5.667	Fructosa	0.2908	13.375	514691	30023	1
2	6.783	Glucosa	0.1374	6.3183	221514	10214	2
3	9.883	Sacarosa	1.7461	80.306	3104945	3104945	3

Total Amount: 2.1743 Area reject: 5000 one per 1.000 sec.

