

El uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la industria azucarera: Comparación de métodos analíticos para determinar Sacarosa y Azúcares Reductores Totales en melaza

Romina Torres*, Edgardo Figueroa*, Soledad Medina*, Silvia Zossi* y Marcelo Ruiz*

RESUMEN

La producción de alcohol a partir de la caña de azúcar se ha visto potenciada ante la iniciativa tomada por el Gobierno Nacional de impulsar una Ley que estimule la producción, comercialización y consumo de alcoholes carburantes. En Tucumán, estos alcoholes se producen principalmente a partir de la melaza de caña de azúcar. Por este motivo el Laboratorio de Físicoquímica de la EEAOC se planteó la necesidad de garantizar la confiabilidad de la información que se suministra a los clientes mediante la evaluación de los métodos para determinar concentración de sacarosa y azúcares reductores totales en melaza. En este trabajo se realizó un estudio de comparación de los resultados obtenidos por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y los métodos analíticos de Clerget para la determinación de sacarosa, y el de Lane y Eynon para la determinación de azúcares reductores totales en melazas de distintos ingenios azucareros de la provincia de Tucumán. Los resultados mostraron buena precisión del método de doble polarización comparado con el de HPLC, mientras que el método de Lane y Eynon es un método de mediana precisión comparado con el de HPLC.

Palabras clave: azúcares reductores, sacarosa, polarización, melaza, HPLC.

ABSTRACT

The use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the sugar industry: Comparison of analytical methods to determine Sucrose and Total Reducing Sugars in molasses

The alcohol production from sugar cane has been promoted by an initiative taken from the Argentinian Government with the objective to develop a law to stimulate the production, commercialization and consume of alcohols fuels. In Tucuman, these alcohols are produced from sugar cane molasses. This is the reason why in the chemistry lab of EEAOC posed the need to ensure reliability of the information provided to customers through the evaluation of the different methods to determine the per cent of sucrose and total reducing sugars in molasses. This work present a comparative study among the High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the analytical method of Clerget to determine the per cent of sucrose and the Lane and Eynon method to determine total reducing sugars in molasses of different sugar mills from Tucuman. The results showed a good precision of the Clerget method compared with HPLC determination, whereas that the Lane Eynon method showed a medium accuracy compared with the HPLC method.

Key words: reducing sugars, sucrose, polarization, molasses, HPLC.

Fecha de recepción: 13/11/2018 - Fecha de aceptación: 17/10/2019

* Sección Química de Productos Agroindustriales, EEAOC email: silviazossi@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN

El sector industrial está atravesando épocas de grandes cambios: la disminución de las reservas de petróleo, la inestabilidad de los precios de los productos agrícolas, la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovables, los acuerdos comerciales, el interés por el cuidado del medio ambiente y la responsabilidad social empresarial son sin duda temas hacia donde el mundo está fijando su mirada por las implicaciones políticas y económicas que conllevan. El sector azucarero no es ajeno a ninguno de ellos y es consciente de que en un mundo globalizado y competitivo, la manera de permanecer es aprovechando las oportunidades que cada uno de ellos presenta.

Para nadie es un secreto que la realidad geopolítica actual da al tema energético la máxima prioridad, porque la oferta de recursos no renovables es, como su nombre lo indica, limitada, ya que la mayor parte del petróleo se concentra en unos pocos países (Asocaña, 2006).

La producción de alcohol a partir de la caña de azúcar se ha visto incrementada por el anunciado déficit de petróleo en los próximos años y ante la iniciativa tomada por el Gobierno Nacional de impulsar una Ley que estimule la producción, comercialización y consumo de alcoholes carburantes. El sector azucarero tiene el reto de aportar al mercado fuentes alternativas de energía renovables que satisfagan las necesidades de aquel y otorguen un valor agregado, dependiendo cada vez menos del azúcar en su presentación granulada, además de preservar el medio ambiente.

En Tucumán la actividad principal es la industria de la caña de azúcar, lo que hace muy importante aprovechar al máximo materias primas como la melaza para la producción de bioetanol. Sería, asimismo, una excelente materia prima para la obtención de diferentes productos biotecnológicos por vías fermentativas (ácido cítrico, levadura, polímeros de ácido láctico, etc.).

Los azúcares que están presentes en la melaza y son empleados por las levaduras para producir bioetanol son sacarosa (el compuesto mayoritario) y glucosa y fructosa en menor proporción; conocer sus concentraciones es de vital importancia para determinar su costo comercial y determinar los rendimientos fermentativos con mayor precisión.

Es por este motivo que el laboratorio de química de la EEAO se planteó la necesidad de garantizar la confiabilidad de la información que se suministra a los clientes mediante la evaluación de los métodos para determinar concentración de sacarosa y azúcares reductores totales en melaza.

Los métodos comúnmente utilizados para la determinación de sacarosa se fundamentan en las propiedades ópticas de la misma. El método polarimétrico se basa en la propiedad que tiene esta sustancia en solución acuosa para rotar el plano de la luz polarizada. El ángulo de rotación de soluciones de sacarosa pura es proporcional a su concentración. El método mencionado es el de simple polarización. Si bien este es el más utilizado en la industria azucarera local, no brinda exactitud en la determinación del contenido verdadero de la sacarosa en melaza de caña ya que existen otras sustancias ópticamente activas que también pueden rotar el plano de luz polarizada dando resultados erróneos. Por este motivo Icumsa (2007) estableció el método de doble polarización o método Clerget

con el cual se obtiene una medida más confiable de su concentración (Medina *et al.*, 2016).

El análisis de azúcares reductores totales por el método de Lane y Eynon aprovecha la propiedad del poder reductor que tienen los azúcares para su cuantificación. La reacción ocurre en medio básico fuerte que requiere un estabilizador para el ión Cu^{+2} , como el tartrato para evitar la formación de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble, con el cual forma un compuesto de coordinación de color azul.

Debido a que no se eliminan las demás especies que contiene la matriz de la muestra, algunas de estas pueden generar interferencias, tales como especies inorgánicas y moléculas con grupos aldehído en su estructura susceptibles a oxidación, al igual que otros azúcares como cetosas que pueden sufrir efectos de tautomerización por la alcalinidad del medio, afectando el resultado del contenido real de azúcares reductores en la melaza.

El método de Lane y Eynon no brinda exactitud en la determinación del contenido verdadero de estos azúcares en la melaza y se considera que solo proporciona una medida aproximada de su concentración, ya que existen otros compuestos que también reducen el cobre, dando resultados mayores a las concentraciones existentes de glucosa y fructosa.

El método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un método de separación basado en las diferentes interacciones, tanto físicas como químicas, que existen entre la muestra y una fase estacionaria contenida en la columna cromatográfica. De acuerdo a estas interacciones, los distintos componentes de la muestra atraviesan la columna a diferentes velocidades y de esa forma se produce la separación de los mismos.

Este método de determinación de concentración de sacarosa y contenido de azúcares reductores directos (glucosa y fructosa principalmente) en melaza por HPLC brinda una mayor exactitud en los resultados debido a que es específico y selectivo para los mismos, permitiendo cuantificar cada azúcar por separado. Sumando estequiométricamente estos tres azúcares mayoritarios se obtienen los azúcares reductores totales que pueden ser fermentados por las levaduras para obtener alcohol (azúcares fermentescibles totales).

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y los métodos analíticos de Clerget para la determinación de sacarosa, y el de Lane y Eynon para la determinación de azúcares reductores totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de las pruebas del presente trabajo se utilizaron 39 muestras de melaza provenientes de distintos ingenios de la provincia de Tucumán.

Para determinar el contenido de sacarosa por el método de doble polarización se siguió la técnica ICUMSA GS 4/7-1. Para ello se utilizó:

- Polarímetro digital Schmidt+Haensch NIR W2
- Tubo polarimétrico de 100 mm
- Papel de filtro Whatman N° 91 de 185 mm de diámetro o su equivalente

El análisis de azúcares reductores totales por el método de Lane y Eynon se realizó a partir de la técnica ICUMSA GS 4/3-7.

Para determinar los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa por HPLC se utilizó un equipo marca Waters compuesto por una bomba cuaternaria, un inyector Alliance modelo e2695, un detector del índice de refracción y un horno calefactor. Se empleó una columna Sugar Pack de Waters, rellena con resina de intercambio catiónico en forma cálcica (Medina *et al.*, 2016).

Las condiciones propuestas en esta metodología fueron las siguientes:

- Fase Móvil: Agua + 0,05g/l de EDTA cálcico
- Temperatura de columna: 85°C
- Temperatura de detector: 45°C
- Caudal: 0,5 ml/min
- Volumen de inyección: 20 µl

La comparación de los métodos se realizó a partir del estudio de la variable estadística t de Student. Además, se realizó el análisis de correlación para determinar la relación existente entre las respuestas obtenidas bajo cada tratamiento.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Para realizar las pruebas del presente trabajo se tomaron como muestra los lotes de melazas analizados por el laboratorio de Química en el año 2015. Se analizaron 39 muestras por duplicado por los dos métodos en estudio.

• Sacarosa

Las concentraciones de sacarosa en las melazas alcanzaron valores de hasta 60%. En la Figura 1 se representa el comportamiento de la sacarosa en ambos métodos. Mediante un análisis visual se observa una buena correlación, presentándose en la Tabla 1 el tratamiento estadístico correspondiente.

Se observó que el valor t_{exp} resultó menor que el valor de t crítico, con lo cual quedó demostrado que no existen diferencias significativas entre los métodos

En la Figura 2 se presenta la correlación entre el método de doble polarización y el método de HPLC. Se observó que el coeficiente de correlación es cercano a la unidad, mostrando poca dispersión entre los valores promedio de cada muestra.

• Contenido de azúcares reductores totales

Se correlacionaron los datos obtenidos en la determinación del contenido de azúcares reductores totales en melaza por el método de Lane y Eynon con el método de cromatografía líquida de alta resolución. Con dicho método se obtienen las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa; la suma estequiométrica de estos tres azúcares se comparó con los resultados determinados mediante el método analítico de Lane y Eynon para azúcares reductores totales.

Para calcular los azúcares totales determinados por cromatografía líquida se usó la siguiente expresión:

$$\text{Azúcares totales} = [\text{sacarosa}] * 1,052 + [\text{glucosa}] + [\text{fructosa}]$$

En la Figura 3 se observa dispersión de los datos obtenidos en ambos métodos para determinar azúcares reductores totales.

En la Tabla 2 se observan los resultados obtenidos por los dos métodos en el análisis estadístico del porcentaje de azúcares reductores totales en melaza.

Se demostró entonces que existen diferencias significativas entre los métodos debido a que el valor t_{exp} resultó mayor que t crítico.

A pesar de obtener resultados no satisfactorios en la comparación de métodos, se realizó el análisis de correlación para obtener una medida de la magnitud de la asociación o covariación de cada variable en estudio.

En la Figura 4 se muestra la correlación entre el método de Lane y Eynon y el método de HPLC para azúcares reductores totales y la ecuación de la recta obtenida:

El análisis arrojó un $R^2 = 0,660$ mostrando alta dispersión entre los valores promedio de cada muestra. Este resultado era esperable, teniendo en cuenta que en la melaza están presentes compuestos no azúcares como por ejemplo los ácidos orgánicos, aminoácidos, etc., que pueden interferir en la medición de glucosa y fructosa, ya

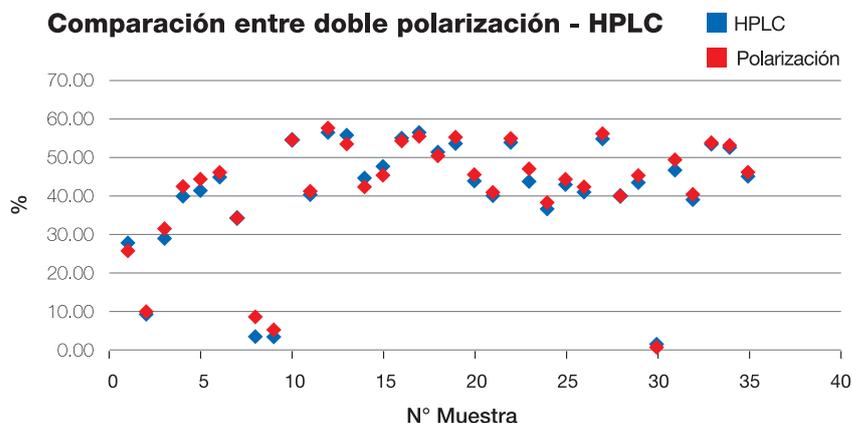


Figura 1. Concentraciones de sacarosa obtenidas por cromatografía líquida y doble polarización.

Tabla 1. Resultados estadísticos obtenidos por los métodos de Doble Polarización y HPLC para la determinación de Sacarosa.

	N	Media	Desv. Est.	Varianza	Estadístico t	Estadístico t crítico	P
Doble Polarización	39	43,47	12,86	165,36	0,32	2	>0,0001
HPLC	39	42,51	13,16	173,26			

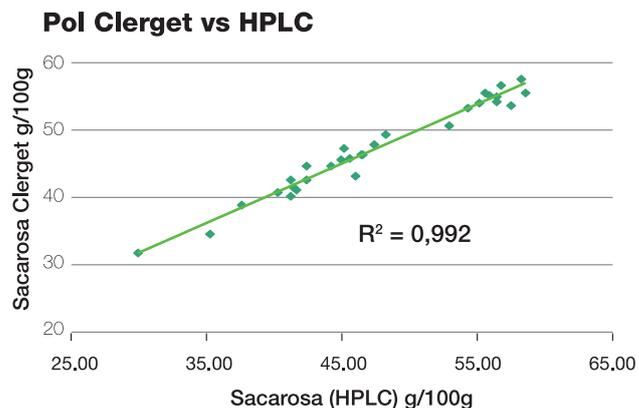


Figura 2. Correlación entre método Clerget y HPLC.

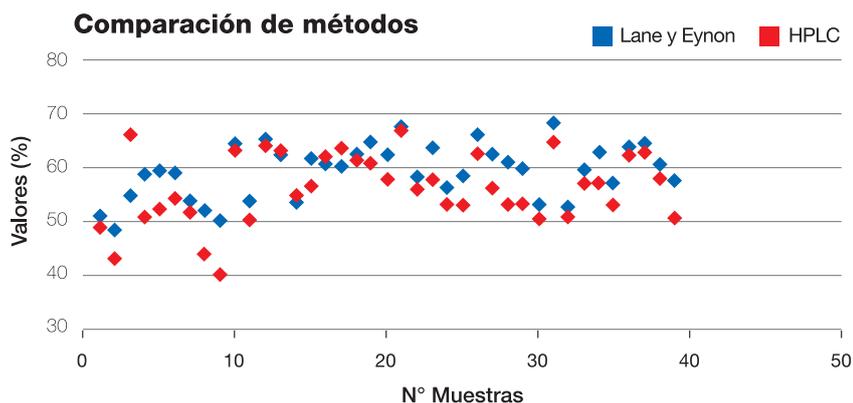


Figura 3. Comportamiento de los azúcares reductores por ambos métodos.

Tabla 2. Resultados estadísticos obtenidos por los métodos de Lane y Eynon y HPLC.

	N	Media	Desv. Est.	Varianza	Estadístico t	Estadístico t crítico	p
Lane y Eynon	39	59,49	4,96	24,62	5,18	2,02	>0,0001
HPLC	39	56,36	6,47	41,84			

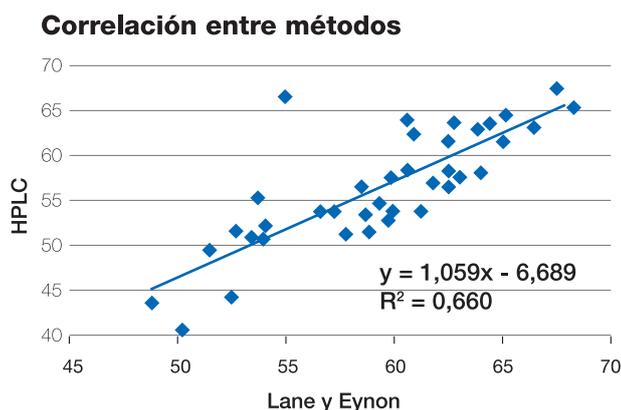


Figura 4. Correlación entre método Lane y Eynon y HPLC.

que presentan uniones carbonilo en sus moléculas y por ello podrían ser capaces de reducir el cobre, dando como resultado valores mayores para el método de Lane y Eynon.

CONCLUSIONES

Se demostró la buena precisión del método de doble polarización comparado con el de HPLC en la determinación de la concentración de sacarosa en melaza, comprobándose así la confiabilidad de los resultados obtenidos por este método en el análisis de este tipo de muestra con alto contenido de sacarosa. Por lo tanto, es posible su uso en la industria azucarera sin necesidad de una gran inversión en equipos y obteniéndose resultados confiables en forma rápida.

Se determinó que el método de Lane y Eynon para la determinación de azúcares reductores totales es un método de mediana precisión comparado con el método de HPLC, presentando alta variabilidad de los resultados por las condiciones del método y la presencia de tipos de especies reductoras en la muestras. Esto debe ser considerado cuando se determina el rendimiento de fermentación alcohólica, ya que el alcohol obtenido será menor que el teórico cuando el cálculo se base en los azúcares reductores totales obtenidos mediante el método de Lane y Eynon.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Asocaña. 2006. Informe anual 2006. [En línea]. Disponible en: www.asocana.org. Consultado el 23-10-2016.
- Cruz Cristancho, L. M. y R. A. Monroy Soler. 2014. Manual de métodos generales para determinación de carbohidratos. UPTC. [En línea]. Disponible en: www.es.slideshare.net. Consultado el 23-10-2016.
- Icumsa (International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis) Methods Book. 2011. Editorial Bartens, Berlin, Germany.
- Medina S.; R. Torres; E. Figueroa; S. Zossi y M. Ruiz. 2016. Comparación de dos metodologías analíticas para la determinación de sacarosa en muestras de melaza. [CD ROM]. En: Resúmenes de trabajos de la XX Reunión de la Sociedad de Técnicos de la Caña de Azúcar, 6 a 8 de abril, Tucumán, Argentina.