



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE INGENIERIA QUÍMICA

Validación de un método para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja.

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

INGENIERO QUÍMICO

Autora: Yela Cano, Keyla Alexandra

Director: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny

LOJA

2022



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2022

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 13 de junio de 2022

Magister
Natalí Solano
Directora de la Carrera de Ingeniería Química
Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Validación de un método para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja, realizado por Keyla Alexandra Yela Cano ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico a Usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

PhD Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

CI: 1103596167

Correo electrónico: jgfigueroa@utpl.edu.ec

Declaración de Autoría y Cesión de Derechos

Yo, Keyla Alexandra Yela Cano, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Titulación denominado: Validación de un método para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja de la carrera de Ingeniería Química, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco Teórico, Capítulo 2. Metodología, Capítulo 3. Resultados, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Ph.D. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Autor: Keyla Alexandra Yela Cano

C.I.: 0401499454

Correo electrónico: kayela@utpl.edu.ec

Dedicatoria

A Dios quien es mi fortaleza y mi amigo fiel que con su amor han estado conmigo toda la vida hasta el día de hoy.

A mis abuelos Pablo Benancio, María Ester, José Félix, Rosa María por tener sabiduría, alegría y poner amor a mi vida.

A mis padres Simón Bolívar y Janneth Narcisa quienes son los promotores de este sueño, que con sus oraciones, cariño, paciencia y palabras de aliento me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, muy agradecida por inculcar en mí el ejemplo de valor y valentía, de no temer las dificultades e inculcarme que Dios está siempre conmigo.

A mis hermanos Lady Pamela y Lenin Hernán por su apoyo incondicional, en todo este proceso y en todo momento por estar conmigo.

Keyla Alexandra Yela Cano

Agradecimiento

A mi familia por ser mi motor de apoyo en todo este tiempo, por sus sabios consejos que me han brindado para cumplir mis metas.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por abrirme las puertas a tan prestigiosa institución y permitirme formarme como profesional con ética y valores de excelencia.

A mi director de trabajo de titulación por brindarme su amistad, sus conocimientos para guiarme para el desarrollo de este trabajo.

A todos los docentes que han sido parte de mi formación como profesional.

A mis amigos más cercanos, que han estado del primer día de mi formación profesional que me han permitido compartir momentos placenteros a lo largo de estos años.

Índice de Contenido

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	II
Declaración de Autoría y Cesión de Derechos	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de Contenido	VII
Índice de Tablas	IX
Índice de Figuras	IX
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo Uno	4
1 Marco teórico	4
1.1 Miel de abeja	4
1.1.1 Azúcares	5
1.1.1.1 Monosacáridos	5
1.1.1.2 Disacáridos	5
1.2 Cuantificación de azúcares en miel de abeja	5
1.3 Cromatografía de gases	6
1.4 Curva de calibración	8
1.4.1 Calibración externa	8
1.4.2 Estándar interno	8
1.5 Validación de un método analítico	8
1.5.1 Rango lineal	9
1.5.2 Precisión	9

1.5.3 Límite de detección (LOD)	9
1.5.4 Límite de cuantificación (LOQ).....	10
Capítulo Dos.....	11
2 Metodología	11
2.1 Reactivos, solventes y patrones	11
2.2 Equipos.....	11
2.3 Preparación de la muestra	11
2.4 Preparación de la curva de calibración	15
2.5 Preparación de la Curva de Calibración	17
2.6 Secado	17
2.7 Derivatización.....	18
2.8 Protocolo instrumental por GC.....	20
2.9 Evaluación del rango lineal, precisión, límite de detección y cuantificación del método cromatográfico.....	21
Capítulo Tres	22
3 Resultados	22
3.1 Rango Lineal	22
3.2 Precisión.....	23
Límite de Detección	24
3.3 Límite de Cuantificación	25
Conclusiones	26
Recomendaciones	27
Referencias.....	28

Índice de Tablas

Tabla 1 Valor medio de los componentes de la miel	4
Tabla 2 Cantidades de solución madre y etanol para soluciones estándar	17
Tabla 3 Condiciones cromatográficas empleadas en la validación	20
Tabla 4 Estudio de la linealidad para los cuatro azúcares analizados	23
Tabla 5 Estudio de precisión para los cuatro azucares analizados.....	23
Tabla 6 Límite de detección para los cuatro azucares analizados.....	24
Tabla 7 Límite de cuantificación para los cuatro azucares analizados.	25

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema de un sistema común de GC	7
Figura 2. Metodología para la validación de un método para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja.	13
Figura 3 Homogenización de la miel de abeja	14
Figura 4 Preparación de solución muestra de miel	15
Figura 5 Preparación de solución madre con los estándares de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa.....	16
Figura 6 Preparación de solución patrón de manitol.....	16
Figura 7 Preparación de los viales para el proceso de secado	18
Figura 8 Preparación del reactivo de derivatización	18
Figura 9 Calentamiento de los viales	19
Figura 10 Proceso de centrifugación de las muestras	20
Figura 11 Curvas de calibración de los cuatro analitos de interés.....	22

Resumen

La validación de un método analítico surge cuando existe la necesidad de probar los parámetros de desempeño de un método son aptos para su aplicación proporcionando resultados confiables y verídicos, el presente trabajo presenta la validación de un método analítico para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para cumplir con el esquema de validación previamente establecido, se determinaron los siguientes parámetros: linealidad, precisión, límite de detección y cuantificación.

Una vez definidos los parámetros de del sistema, los resultados mostraron que el método es selectivo para los propósitos previstos, seguidamente se evaluaron los parámetros de validación como: Linealidad del sistema y del método para los cuales se obtuvieron valores cercanos a la unidad ≥ 0.999 , Precisión del sistema y del método obteniéndose valores menores al coeficiente de variación $Cf \leq 15\%$ que reflejan muy buena precisión y repetitividad, luego se determinó el límite de detección de los cuatro azúcares de interés obteniéndose valores entre 1,09 y 2,54 mg /mL respectivamente y el límite de cuantificación 1,56 mg/ml cumpliendo así con los parámetros establecidos y de esa manera comprobando la veracidad del método analítico.

Palabras clave: cromatografía, espectrometría, validación

Abstract

The validation of an analytical method arises when there is a need to test the performance parameters of a method are suitable for its application providing reliable and true results, this paper presents the validation of an analytical method for the determination of fructose, glucose, sucrose and maltose in honey using the technique of gas chromatography coupled to mass spectrometry.

To comply with the previously established validation scheme, the following parameters were determined: linearity, precision, detection limit and quantification.

Once the parameters of the system were defined, the results showed that the method is selective for the intended purposes, then the validation parameters were evaluated such as: Linearity of the system and of the method for which values close to the unit ≥ 0.999 were obtained, Precision of the system and of the method, obtaining values lower than the coefficient of variation $Cf \leq 15\%$, which reflect very good precision and repeatability, then the detection limit of the four sugars of interest was determined, obtaining values between 1.09 and 2.54 mg / mL respectively and the quantification limit 1.56 mg/ml thus complying with the established parameters and thus verifying the veracity of the analytical method.

Keywords: chromatography, spectrometry, validation

Introducción

La miel se caracteriza por ser dulce y viscosa, la cual se compone principalmente de carbohidratos disueltos en agua, predominando glucosa y fructosa, encontrándose también en menor cantidad azúcares tales como sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos (Ulloa et al., 2010).

La validación de métodos analíticos se basa en realizar procedimientos cuyos resultados obtenidos proporcionen fiabilidad y repetitividad para que los métodos analíticos y que su uso sea aplicado en el laboratorio, esto refleja un requisito en la práctica de análisis químico que permiten garantizar confianza y seguridad en cuanto a los resultados obtenidos (Morillas, 2016).

Es necesario validar un método analítico cuando haya la necesidad de que sus parámetros de desempeño son los adecuados para la aplicación del método analítico por lo tanto el objetivo del presente estudio fue validar un método cromatográfico que permita identificar y cuantificar los carbohidratos presentes en la miel.

Hoy en día, los métodos cromatográficos se han convertido en técnicas analíticas verídicas y prometedoras que nos permiten conocer cualitativamente y/o cuantitativamente la composición de cualquier material, debido principalmente a la rapidez del análisis y bajo costo (López, Uribe, & Ramos, 2013).

El presente documento consta de 3 capítulos, en el primer capítulo se detalló la revisión bibliográfica respecto a la miel de abeja. En el segundo capítulo, se presenta la metodología utilizada para la validación del método analítico. En el tercer capítulo, se discutieron los resultados obtenidos. Finalmente, se detallan las conclusiones alcanzadas y las recomendaciones para futuras investigaciones.

Capítulo Uno

1 Marco teórico

1.1 Miel de abeja

La miel es un fluido de sabor agradable y generalmente muy viscosa, la cual es elaborada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores (Ulloa, Mondragon, Rodriguez, Resendiz, & Rosas, 2010). Este producto es muy usado en todo el mundo como sustituto del azúcar. Además, posee propiedades nutricionales y medicinales (Pinargote, 2015)

La composición de la miel depende de diversos factores, tales como: ambiente, tipo de procesado, fuente de néctar (Ulloa, et la, 2010). Pese a esto, la miel se compone mayoritariamente de carbohidratos como glucosa y fructosa, encontrándose también en menor cantidad azúcares tales como sacarosa, maltosa, y en menor proporción otros polisacáridos (Martínez & Sanz, 2006). En la Tabla 1, se presenta la composición química de la miel.

Tabla 1

Valor medio de los componentes de la miel

Componentes	Promedio (%)	Rango (%)
Agua	17,2	12,2 – 22,9
Fructosa	38,4	30,9 – 44,3
Glucosa	30,3	22,9 – 40,7
Sacarosa	1,3	0,2 – 7,6
Maltosa	2-16	2,7 – 16,0
Otros disacáridos	7,3	0,1 – 3,8
Acido glucónico	0,57	0,17 – 1,17
Ácidos (sin incluir glucónico)	0,43	0,13 – 0,92
Lactonas	0,14	0,0 – 0,37
Minerales	0,17	0,02 – 1,03
Nitrógeno	0,04	0,0 – 0,13

Nota. Adaptado desde Ball (2007)

1.1.1 Azúcares

La miel se caracteriza por su variada cantidad de glúcidos en los que se encuentran monosacáridos que se forman debido a la hidrólisis enzimática de la sacarosa del zumo. Además, las enzimas también inician la formación de nuevos enlaces glicosídicos obteniéndose así disacáridos, trisacáridos y demás polisacáridos (Martínez & Sanz, 2006).

1.1.1.1 Monosacáridos. Los monosacáridos son monómeros sencillos, su grupo funcional es aldehído o cetona, los característicos de la miel son la fructosa y glucosa, ambos tienen la misma fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ y peso molecular de 180,16 g/mol (Martínez & Sanz, 2006).

1.1.1.2 Disacáridos. Los disacáridos se forman por la condensación de dos monosacáridos a través de un enlace glucosídico, de modo que: la sacarosa está formada por la unión de una glucosa y una fructosa. Así mismo, la maltosa está formada por la unión de dos glucosas, unidas por un enlace alfa. Ambos azúcares presentan la misma fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ y peso molecular de 342 g/mol (Martínez & Sanz, 2006).

1.2 Cuantificación de azúcares en miel de abeja

La determinación de hidratos de carbono en miel, generalmente se lleva a cabo mediante técnicas de analíticas como:

- Cromatografía iónica-espectrometría de masas (HPAEC-MS): De acuerdo con Tedesco, et al. (2020), en esta técnica la separación se da en condiciones alcalinas, mediante la columna CarboPac PA10 en la cual la fase estacionaria es que interactúa con la concentración de los iones (fase móvil). Empleando como detector, un espectrómetro de masas de un solo cuadrupolo.
- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR): Según (Anjos et al., 2015) busca establecer el mejor método calibración usando cromatografía iónica en el que se buscó identificar trehalosa, glucosa, fructosa, sacarosa, melezitosa, turanosa y maltosa en donde las moléculas absorben la energía

de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incide sea igual a la necesaria para que se dé una transmisión vibracional de la molécula por lo que la molécula comienza a vibrar de una manera determinada mediante la luz suministrada mediante luz infrarroja, se empleó la columna CarboPac PA20 y un detector electroquímico en Integrated Pulsed.

- Derivatización con micro extracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (D-SPME-GC/MS): Wan et al (2015), señala que los grupos polares como N-H y O-H son un grupo relativamente no polar, por ende es no volátil. Es por esta razón, que se debe realizar una derivatización, empleando el anhídrido acético como reactivo de derivatización y N-metilimidazol como catalizador. Permitiendo así el análisis por GC.
- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): Como afirma Kamal y Klein (2011), este método permite determinar fructosa, glucosa y sacarosa presentes en la miel, usando un detector de índice de refracción, una columna de sílice, y fase móvil apolar.

1.3 Cromatografía de gases

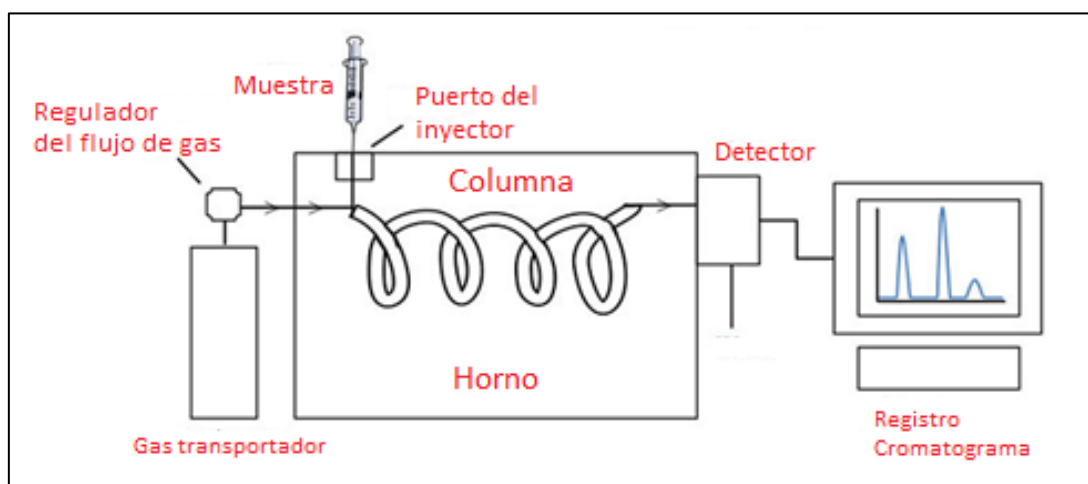
La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica ampliamente utilizada para la realización de análisis cualitativos y cuantitativos. Es un método de separación, donde la fase estacionaria es un líquido no volátil y la fase móvil es un gas inerte. Esta técnica se basa en el principio de retención selectiva que permite analizar y separar mezclas complejas de compuestos. Sin embargo, para que una muestra se pueda analizar por GC, debe ser lo suficientemente volátil para ser evaporada en el puerto de inyección (Skoog et al., 2015). En aquellas muestras que tienen grupos funcionales no polares, se realiza una derivatización que consiste en una modificación de un compuesto para dar como producto un derivado con nuevas propiedades que faciliten el análisis por GC. La derivatización tiene como objetivo de mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y en algunos casos la sensibilidad en la

detección (Wang et al., 2015). El cromatógrafo de gases está conformado por las siguientes partes (Figura 1):

- Un gas transportador (fase móvil), principalmente helio de alta pureza.
- Puerto de inyección, en donde la muestra ingresa al sistema a través de una jeringa.
- El inyector, donde la muestra es vaporizada en la corriente de gas portador.
- El horno, lugar donde se encuentra la columna cromatográfica (fase estacionaria), que es la encargada de interactuar con las sustancias que componen la muestra.
- El detector, dispositivo al cual cada analito llegará una vez separado de los demás componentes para ser detectado y se registrará una señal analítica.
- El software, que se encarga de registrar la señal producida por el detector. El registro de la señal y el tiempo transcurrido se denomina cromatograma (Skoog, Holler, West, & Crouch, 2015).

Figura 1

Esquema de un sistema común de GC



Nota. Tomado de Rodríguez, 2020.

1.4 Curva de calibración

La curva de calibración se construye a partir de la preparación de una serie de estándares de concentraciones conocidas. Se utiliza para determinar la cantidad de la sustancia presente en una muestra problema (Skoog et al., 2015).

1.4.1 Calibración externa

La calibración externa determina la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito, este tipo de calibración consiste en la preparación de una serie de diluciones de un estándar independientes de la muestra. A continuación, estas disoluciones son analizadas en el equipo instrumental y se obtiene una respuesta analítica, la relación lineal entre la concentración de las disoluciones y la señal, se utiliza para determinar la concentración de una disolución desconocida de analito (Skoog et al., 2015).

1.4.2 Estándar interno

El método de estándar interno, consiste en la adición de una cantidad conocida de una disolución de un analito a todas las muestras, estándares y blanco. Sin embargo, el analito que se adiciona, no debe estar presente en las muestras. Además, debe tener características similares al compuesto o sustancia que se va a cuantificar. Este método es importante porque puede equilibrar ciertos errores que influyen tanto en los estándares como en la muestra de referencia. En esta curva de calibración se grafica la proporción de las señales del compuesto de interés y el analito que se adicionó, respecto a concentración del analito (Skoog et al., 2015).

1.5 Validación de un método analítico

La validación de un método analítico es un procedimiento que posibilita confirmar que un método analítico es correcto para un uso establecido. Se realiza con el objetivo de garantizar resultados confiables y es buena práctica analítica (Segura & Coneo, 2017).

1.5.1 Rango lineal

El rango lineal, se evalúa mediante la preparación de un conjunto de soluciones estándar en un rango de concentraciones aproximada del analito, partiendo primero en la preparación de una solución madre de concentración conocida. El método se basa en la relación proporcional entre la concentración y una determinada señal analítica (Segura & Coneo, 2017).

La curva de calibración se relaciona una señal instrumental en función de la concentración de un analito, esta relación debe ser lineal y las concentraciones no lineales deben ser descartadas ya que están fuera del límite de linealidad. los datos experimentales permiten calcular y justificar la linealidad mediante el coeficiente de correlación (r), debe ser mayor a 0,995 (Segura & Coneo, 2017).

1.5.2 Precisión

La precisión refleja todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones óptimas. La precisión depende de la concentración de analito, por lo tanto, debe determinarse en una serie de concentraciones. La precisión se evalúa determinando la repetibilidad y reproductividad de los resultados analíticos (Segura & Coneo, 2017).

La repetibilidad es una medida de la variabilidad en los resultados. Se lleva a cabo por un solo analista, utilizando el mismo equipo, y en un corto plazo de tiempo (Segura & Coneo, 2017).

1.5.3 Límite de detección (LOD)

El límite de detección indica la cantidad mínima de analito que puede ser detectada pero no cuantificada, puede determinarse de manera estadística sobre el ruido y también calcularse a partir de la curva de calibración. Para ello, se analiza por lo menos diez blancos (muestra que no tenga cantidades detectables de analito). Dejando expresado como el promedio de señal del blanco más tres veces la desviación estándar (Segura & Coneo, 2017).

1.5.4 Límite de cuantificación (LOQ)

Se expresa como la cantidad mínima de analito que puede cuantificarse con una precisión y exactitud, se puede calcular como diez desviaciones estándar por encima de la señal del blanco (Segura & Coneo, 2017).

Capítulo Dos

2 Metodología

En este capítulo se aborda la metodología empleada para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja. En la figura 2, se presenta un diagrama de la metodología, donde se incluye la preparación de reactivos, estándares y muestras.

2.1 Reactivos, solventes y patrones

Se empleó como muestra miel de abeja obtenida de un proveedor local. Respecto a las muestras, en la derivatización se utilizaron los reactivos oxima (2,5% de clorhidrato de hidroxilamina en piridina), hexametildisilazano, y ácido trifluoroacético. Por otro lado, para realizar la curva de calibración se emplearon los estándares de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa de la marca TM MEDIA, los mismos que están certificados por la norma ISO 9001:2008 e ISO 9001:2015. Para el estándar interno se ocupó el manitol (grado AR) certificado con la norma ISO 9001:2015. Finalmente, como solventes se utilizaron hexano, etanol acuoso al 80% y agua destilada.

2.2 Equipos

Se utilizó el cromatógrafo de gases TRACE 1310 acoplado al espectrómetro de masas ISQ 7000, ambos de marca Thermo Fisher Scientific. La separación de los compuestos se la realizó en una columna TR5-MS con dimensiones de 30 cm x 0,25 mm x 0,25 μ m, con fase estacionaria compuesta en un 95% de dimetilpolisiloxano y 5% de fenil. Además, se utilizó un calentador de bloque de laboratorio digital marca Accublock™ Labnet y una centrifugadora marca Fisher.

2.3 Preparación de la muestra

La miel se obtuvo de un proveedor local y se cosechó en agosto de 2021. Para homogenizar la muestra se la calentó por 35 minutos en baño María a una temperatura de 40°C (Figura 3), esta temperatura se encuentra dentro del rango de descristalización de la

miel (Lopez, 2014). Culinado el tiempo, se agitó el frasco que contiene la miel de abeja con la finalidad que la miel obtenga una consistencia líquida.

Figura 2.

Metodología para la validación de un método para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja.

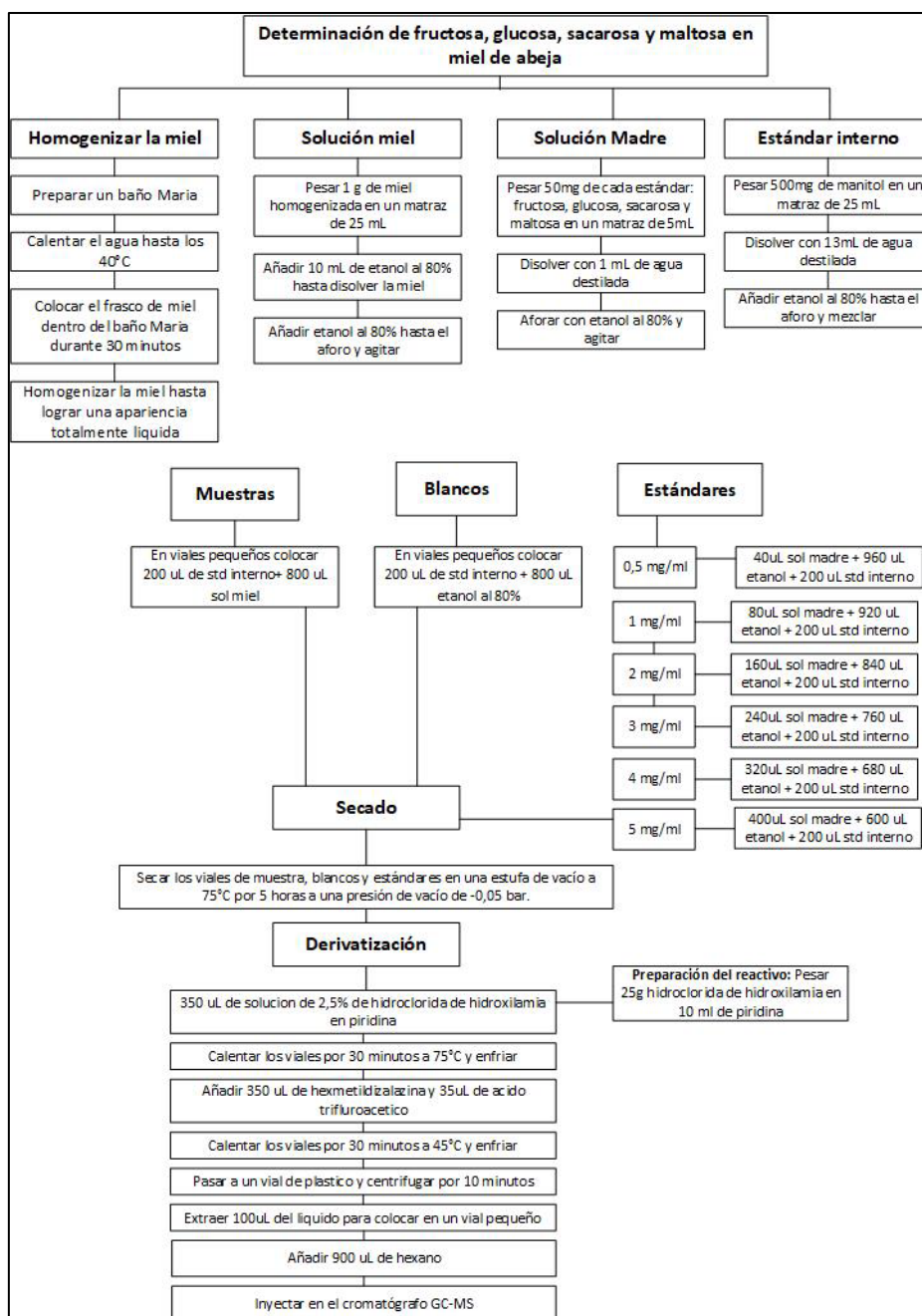
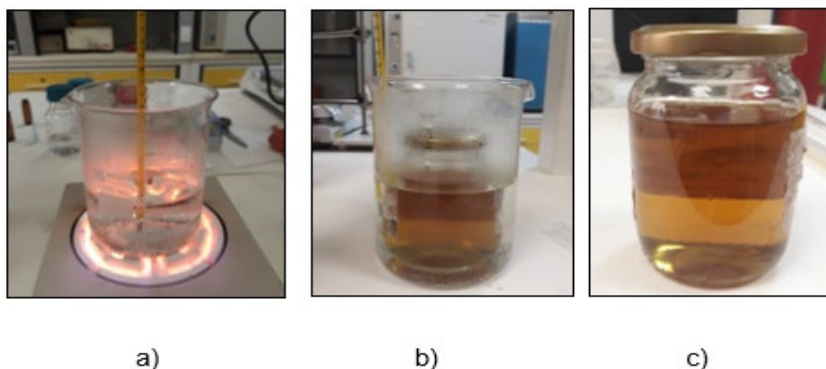
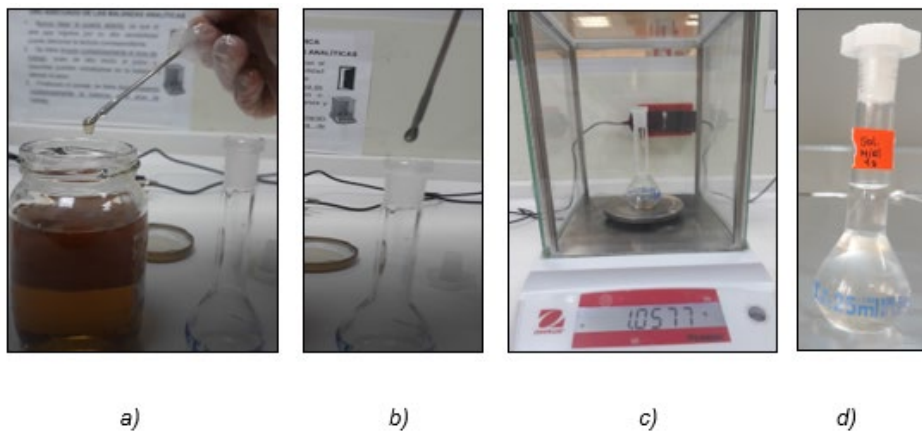


Figura 3*Homogenización de la miel de abeja*

Nota. a) Medición de temperatura del agua, b) Calentamiento de la miel a baño María y c) Miel homogenizada

Luego se preparó la solución muestra de miel en un matraz de aforo de 25mL, en la cual se tomó 1 gramo de miel y con la ayuda de una espátula se procuró no regar la muestra por las paredes del matraz seguidamente, se añadió 10 mL de etanol al 80% al matraz y se agitó suavemente hasta disolver la miel (Figura 4). Una vez que toda la miel se disolvió, se añadió más etanol al 80% hasta la marca de aforo, el matraz se agitó hasta mezclar completamente su contenido.

Para la derivatización, se mezcló en un vial de 2 mL 800 μ L de la disolución de miel y 200 μ L de patrón interno de manitol, la agitación se la realizó con la ayuda de un vortex. El blanco, se cambió la disolución de miel por etanol al 80%.

Figura 4*Preparación de solución muestra de miel*

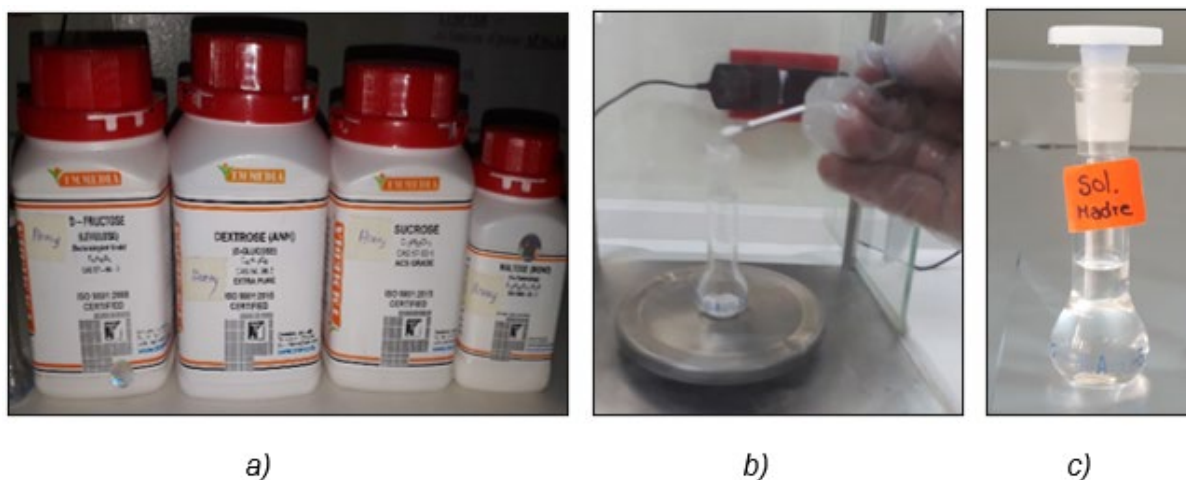
Nota. a) Colocar la miel en el matraz con la ayuda de una espátula, b) Destinar la miel sin tocar las paredes del matraz, c) Pesado de la miel de abeja y d) Solución miel preparada.

2.4 Preparación de la curva de calibración

Se preparó inicialmente la solución madre con una concentración de 10 mg/mL, en un matraz volumétrico de 5 mL donde se pesó 50 mg de cada uno de los siguientes estándares: fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa disolviendo primero con un 1 mL de agua destilada y luego se añadió etanol al 80% hasta la marca de aforo, el matraz de la solución madre se agitó hasta mezclar perfectamente su contenido (Figura 7).

Figura 5

Preparación de solución madre con los estándares de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa

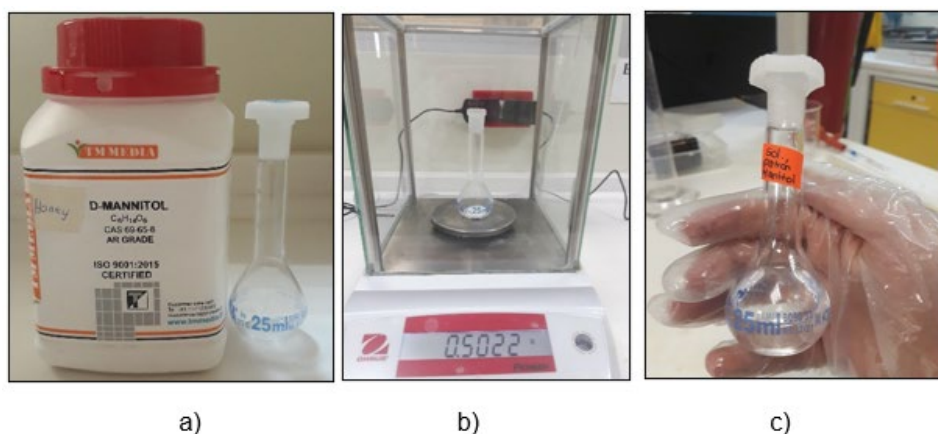


Nota. a) Estándares de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa, b) Se peso cada estándar y c) solución madre

Para la preparación de la solución de patrón interno, se pesó 500 mg de manitol en un matraz volumétrico de 50 mL, disolviendo primero el manitol con 13 mL de agua destilada y luego se añadió etanol al 80% hasta la marca del aforo (Figura 8). Finalmente, el matraz se agitó para mezclar el contenido.

Figura 6

Preparación de solución patrón de manitol



Nota. a) Estándar de manitol, b) Peso del manitol y c) Solución patrón interno preparada.

2.5 Preparación de la Curva de Calibración

Para la curva de calibración se preparó soluciones estándar de concentraciones de (0.5 ,1 ,2 ,3 ,4, 5 mg/mL) en viales color ámbar, tomando alícuotas de la solución madre y etanol hasta completar un volumen de 800 μ L. Además, se adicionó 200 μ L de estándar interno de manitol. En la Tabla 2, se detallan los volúmenes correspondientes:

Tabla 2

Cantidades de solución madre y etanol para soluciones estándar

Concentración (mg/mL)	Volumen solución madre (μ L)	Etanol al 80% (μ L)	Estándar interno (μ L)
0.5	40	960	200
1	80	920	200
2	160	840	200
3	240	760	200
4	320	680	200
5	400	600	200

2.6 Secado

Todos los viales preparados anteriormente, se colocaron en una gradilla de acero. A continuación, con la finalidad de eliminar el contenido de agua y etanol, estos fueron colocados en una estufa de vacío a una presión de -0,05 bar y a 75 °C, por un lapso de 5 h (Figura 11).

Figura 7

Preparación de los viales para el proceso de secado



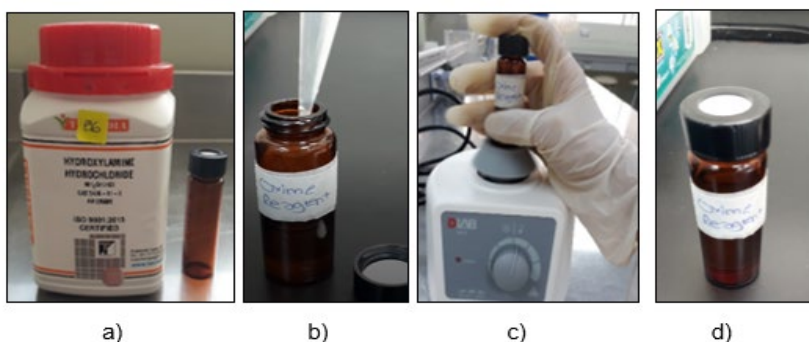
Nota. a) Presión en MPa, b) Temperatura de secado, c) Colocación de los viales en la gradilla de acero

2.7 Derivatización

El proceso de derivatización fue desarrollado dentro de una cabina de extracción de gases. Para preparar el reactivo de derivatización, se pesó 0,25 gramos de clorhidrato de hidroxilamina en un frasco ámbar y luego se adicionó 10 mL piridina.

Figura 8

Preparación del reactivo de derivatización



Nota. a) Clorhidrato de hidroxilamina, b) Colocación de piridina, c) Vortex, d) Reactivo derivatizante

A cada vial de muestras, blancos y estándares se le añadió 350 μL del reactivo de derivatización. A continuación, los viales se los colocó en una gradilla de acero y fueron calentados a 75°C por treinta minutos. Culinado este tiempo, inmediatamente se enfriaron con aire comprimido.

Figura 9

Calentamiento de los viales



a)

b)

Nota. a) Gradilla donde están los viales, b) Proceso de mezclado

Seguidamente, a cada vial se añadió 350 μL de hexametildisilazina y 35 μL de ácido trifluoroacético, seguidamente se tapó y agitó los viales, para calentarlos a una temperatura de 45°C.

Con el objetivo de sedimentar lo sólidos que se generaron durante los procesos anteriores, el contenido de los viales de muestras, blancos y estándares, se colocaron en microtubos, para luego centrifugar su contenido por diez minutos. Luego de la centrifugación, se separó 100 μL del sobrenadante (Figura 10), y se colocaron en viales ámbar de 2 mL. A continuación, se diluyó con 900 μL de hexano, para finalmente analizarlos con la ayuda de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Figura 10*Proceso de centrifugación de las muestras*

2.8 Protocolo instrumental por GC

Se utilizaron las condiciones cromatográficas descritas por (Ruiz-Matute, 2010), en la Tabla 3 se resumen las principales condiciones.

Tabla 3*Condiciones cromatográficas empleadas en la validación*

	Parámetro	Valor
Sistema de inyección	Gas usado	Helio
	Modo	Split
	Temperatura inicial	180 °C
	Precisión	11,02 psi
Horno	Temperatura inicial	200 °C
	Tiempo inicial	3 min
	Temperatura final	270 °C
	Tiempo final	3 min
	Rampa	3°C/min
Columna	Tipo	TR5-MS
	Modo	Flujo constante
	Flujo inicial	1 mL/min
	Presión de salida	Vacío
Detector	Gas empleado	Nitrógeno
	Temperatura	100 °C

2.9 Evaluación del rango lineal, precisión, límite de detección y cuantificación del método cromatográfico.

- **Rango lineal**

Para determinar el rango lineal de un método se prepararon una serie de estándares, considerando lineal el rango de concentraciones con los cuales se obtenga un coeficiente de correlación mayor a 0.99.

- **Precisión**

La precisión del método se evaluó mediante el coeficiente de variación de diez análisis realizados sobre la misma muestra. Se expresó el resultado como porcentaje.

- **Límite de detección y cuantificación**

Para determinar el límite de detección (LDD) se analizaron 10 blancos. Específicamente, se identificó la presencia del mayor pico ocasionados por el ruido instrumental y se utilizó su área como señal instrumental. Esta señal se la multiplicó 3 y se obtuvo la concentración con la ecuación de la curva de calibración que se describió previamente. En cambio, la concentración del menor estándar se definió como límite de cuantificación. En ambos, casos las concentraciones correspondientes se expresaron en mg/mL.

Capítulo Tres

3 Resultados

En este capítulo se aborda los resultados obtenidos para la validación de un método analítico que permite cuantificar la concentración de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja.

3.1 Rango Lineal

La linealidad de un método analítico es el rango de concentraciones, en el cual la respuesta instrumental es proporcional a la concentración del analito. En la figura 13, se representa las curvas de calibración lineales (concentración vs. Señal) para los cuatro analitos estudiados, con la que se permitió evaluar la linealidad del método.

Figura 11

Curvas de calibración de los cuatro analitos de interés

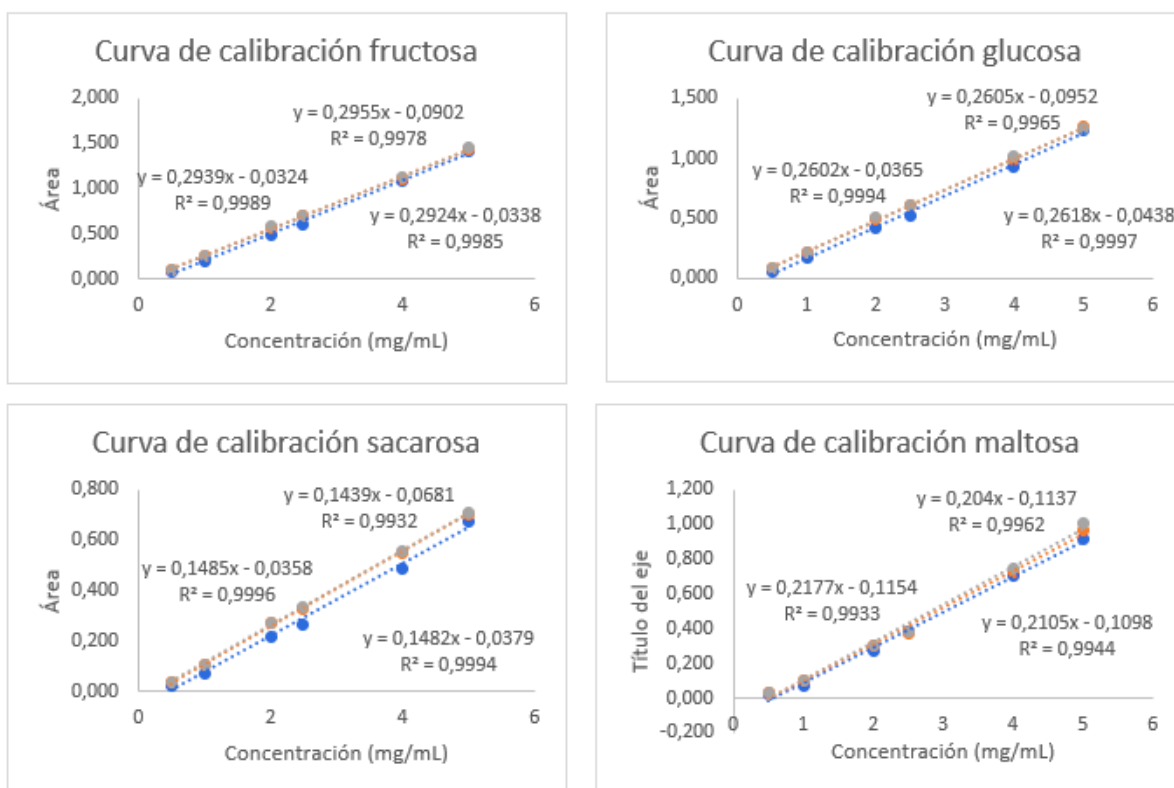


Tabla 4
Estudio de la linealidad para los cuatro azúcares analizados

Azúcar	Coefficiente de correlación (R)
Fructosa	0,998
Glucosa	0,999
Sacarosa	0,997
Maltosa	0,997

Se realizó un análisis de la regresión, en el que el valor estadístico que se utilizó para valorar la linealidad del método analítico es el coeficiente de correlación, este valor debe ser mayor a 0.999 (Brunetto-de-Galligan, et. al 2014). Como se puede apreciar en la Tabla 4, los valores encontrados estuvieron entre 0.997 a 0.999, por lo tanto, se afirma una excelente correlación entre la variable dependiente (área del pico) y la variable independiente (concentración), lo cual demuestra linealidad en el rango de concentraciones realizadas para este estudio.

3.2 Precisión

La precisión como se había mencionado en la metodología fue desarrollada sobre la misma muestra en inyecciones sucesivas, teniendo en cuenta en este análisis el tiempo de retención de cada analito de interés identificados en el cromatógrafo de gases (GC).

Tabla 5
Estudio de precisión para los cuatro azúcares analizados.

Azúcar	Coefficiente de variación (%)
Fructosa	5,45
Glucosa	5,07
Sacarosa	6,19
Maltosa	1,63

Se realizó una comparación de cada concentración y el tiempo de retención del resultado, dando como resultado que no presenta dispersión entre las concentraciones ni entre las repeticiones. El criterio que se estableció es que el coeficiente de variación C_f sea $\leq 15\%$ además de esto se evaluó la repetibilidad con respecto a los tiempos de retención. realizado dos replicas en cada nivel de concentración, por lo tanto, se evidencia que los valores reportados están por debajo de dicho valor por lo que cumple con el criterio de aceptación. reflejando una buena precisión del método validado.

Según Figueroa et al. (2013) en el caso de fructosa y sacarosa usando cromatografía iónica obtuvieron valores de coeficiente de variación entre 3 y 2 % respectivamente. Mientras que, los porcentajes expuestos en la tabla tienen una variación del $\pm 3\%$ en relación con lo señalado por el autor que se mencionó anteriormente esto debido al método elegido, en cuanto a repetibilidad el mismo autor tuvo similares tiempos de retención y la concentración diferente, demostrando una buena repetibilidad del método validado.

Límite de Detección

El límite de detección (LDD) se obtuvo del mediante 10 inyecciones sucesivas de blanco obteniendo así la más baja concentración de los cuatro azúcares de interés que este procedimiento puede detectar.

Tabla 6

Límite de detección para los cuatro azúcares analizados.

Azúcar	LDD (mg/mL)
Fructosa	2,31
Glucosa	2,07
Sacarosa	2,54
Maltosa	1,09

Nota. LDD: Limite de detección

Como se puede observar en la tabla 6, se reportó los límites de detección de los azúcares presentes en la miel de abeja, obteniendo así las concentraciones que pueden ser

detectables por el equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) Se menciona (Tedesco R. B., 2020) las concentraciones obtenidas reflejan las mínimas cantidades que el equipo GC/MS puede detectar a los analitos de interés usada para validar el método, lo que demuestra que está dentro del rango de trabajo elegido validando así este método.

3.3 Límite de Cuantificación

El nivel más bajo del rango lineal se estableció como límite de cuantificación (LDC), teniendo los siguientes resultados:

Tabla 7

Límite de cuantificación para los cuatro azúcares analizados.

Azúcar	LDC (mg/mL)
Fructosa	1,56
Glucosa	1,56
Sacarosa	1,56
Maltosa	3,13

Nota. LDC: Límite de cuantificación

Como se evidencia en la tabla 7, se obtuvo los valores de LDC en donde la maltosa presenta un valor alto con respecto a los otros azúcares de interés siendo este el valor mínimo que puede ser detectado dentro del analito. Según (Tedesco R. B., 2020) los resultados obtenidos reflejan que las concentraciones obtenidas son la mínima cantidad que el equipo puede cuantificar la concentración del analito en la muestra inyectada y se encuentra dentro del rango de trabajo usado para validar este método.

Conclusiones

Se logró validar la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas que permitió cuantificar fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel de abeja.

Se estableció que la metodología analítica para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en miel es lineal en el intervalo de concentración estudiado desde 0,5 mg/mL a 5 mg/mL obteniéndose el coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.999$ para el método.

Los resultados obtenidos para la precisión del método fueron válidos, ya que los valores obtenidos del coeficiente de variación Cf, de los factores de respuesta fueron menores al 15 %, lo que refleja que el método revela una buena precisión, es decir, los valores no se encuentran muy dispersos, además de una buena repetitividad.

Al identificar el Límite de Detección se obtuvo valores entre 1,09 y 2,54 mg/mL y el Límite de Cuantificación entre 1,56 y 3,13 mg/mL respectivamente, lo que demuestra que los valores están dentro de la concentración y rango de trabajo.

Recomendaciones

Leer previamente las hojas de seguridad de cada reactivo para conocer sus riesgos, además como usarlos de manera segura y saber lo que se debe de hacer en caso de emergencia.

El material volumétrico que es usado en la validación debe ser calibrado para garantizar los volúmenes con los que se está trabajando.

Cuando se realice la preparación de los estándares para las curvas de calibración, estos deben ser lo más exactos posibles para poder obtener una buena linealidad.

Referencias

- Brunetto-de-Gallignan, M., Orozco, W., Delgado-Cayama, Y., Clavijo-Roa, S., Gallignani-de-Bernardi, M., Ayala-Montilla, C., & Zambrano-García, A. (2014). Desarrollo de un método analítico para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacao criollos venezolanos. *Revista Cubana de Química*, 181-201.
- Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food chemistry*, 218-223.
- Ball, D. (2007). The chemical composition of honey. *Journal of chemical education*.
- Figuerola, L., Hernaez, L., & Bello, M. (2013). Validación de un método de determinación de fructosa, glucosa y sacarosa por cromatografía líquida de alta performance. *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad (Senasa)*.
- Kamal, M., & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi journal of biological sciences*, 18, 17-21.
- Lopez, A. (2014). *Efecto de la humedad de la miel y temperatura de descristalizado en la calidad de la miel procesada*.
- López, R., Uribe, M., & Ramos, C. (2013). VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN LABORATORIOS DE ENSAYO DE AGUAS RESIDUALES. *Kuxulkab'*, 19(36).
- Martínez, I., & Sanz, J. (2006). Avances metodológicos para la determinación de componentes de la miel mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.
- Morillas, E. E. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos. In *Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016)* (pp. ISBN 978-91-87461-59-0).
- Novales, A. (2010). *Análisis de Regresión*. Madrid: Departamento de Economía Cunitativa.

- Pinargote, R. (2015). Estudio de factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de miel de abeja, cantón Quevedo. *Master's thesis, Quevedo-Ecuador*, 10-25.
- Ruiz-Matute, A. B.-C. (2010). Caracterización por cromatografía de gases-espectrometría de masas de tri y tetrasacáridos en miel. *Química de los alimentos*, 120 (2), 637-642.
- Segura, A., & Coneo, E. (2017). Validación de métodos analíticos-gravimetría.
- Skoog, D., Holler, J., West, H., & Crouch, S. (2015). *Fundamentos de química analítica (Novena edición ed.)*.
- Tedesco, R. B. (2020). Determinación de carbohidratos en muestras de miel por cromatografía iónica-espectrometría de masas (HPAEC-MS). *Química Analítica y Bioanalítica*, 412 (22), 5217-5227.
- Tedesco, R., Barbaro, E., Zangrando, R., Rizzoli, A., Malagnini, V., Gambaro, A., . . . Capodaglio, G. (2020). Carbohydrate determination in honey samples by ion chromatography–mass spectrometry (HPAEC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 5217 - 5227.
- Ulloa, J., Mondragon, P., Rodriguez, R., Resendiz, J., & Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *CONACYT*.
- Wang, H., Geppert, H., Fischer, T., Wieprecht, W., & Möller, D. (2015). Determination of Sucrose in Honey with Derivatization/Solid-Phase Microextraction and Gas-Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of chromatographic science*, 53, 1427-1431.