

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
ÁCIDO ACONÍTICO EN EL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR**

**ANA MARÍA TASCÓN ROMERO**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2013**

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
ÁCIDO ACONÍTICO EN EL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR**

**Trabajo de grado para optar por el título de químico farmacéutico**

**ANA MARÍA TASCÓN ROMERO**

**DIRECTOR  
GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ PH.D**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2013**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRAC</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>2. DESCRIPCIÓN</b> .....	<b>10</b>
2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación .....	10
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
4.1. Objetivo General. ....	22
4.2. Objetivos específicos. ....	22
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>
5.1 Preparación de estándar TAA solución madre 1000 ppm.....	23
5.2 Preparación de estándar de TAA a 200, 450 y 700 ppm para evaluar la recuperación de TAA .....	23
5.3 Preparación de curva de calibración (100, 200, 350, 400, 600 y 800 ppm) .....	24
5.4 Tratamiento de muestra por medio de extracción en fase sólida (SPE) .....	25
5.5 Análisis de ácido trans- aconítico por cromatografía Líquida (UPLC).....	27
<b>6. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSION</b> .....	<b>42</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>44</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. CULTIVOS DE CAÑA (ASOCAÑA, 2011-2012) .....	13
Figura 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA SACAROSA (BERG, 2007, PÁG 311). .....	15
Figura 3. ETAPAS DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DEL AZÚCAR. (CENICAÑA, 2004) .....	16
Figura 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL AC. CIS-ACONÍTICO (1) AC. TRANS- ACONÍTICO (2).....	17
Figura 5.MECANISMO DE ISOMERIZACIÓN DEL ÁCIDO ACONÍTICO .....	18
Figura 6. ETAPAS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA SPE (UCM, 2012) .....	19
Figura 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS CARTUCHOS SCREEN-A.....	20
Figura 8. DETECTOR ELSD.....	21
Figura 9.MONTAJE SPE .....	26

## LISTADO DE GRÁFICAS

Gráfica 1. JUGO DE CAÑA SIN SPE(1) CON SPE(2).....	33
Gráfica 2. TAA CON COLUMNA ACQUITY UPLC BEH C18 (IZQ) (POSADA MORA, 2013). TAA CON COLUMNA ACQUITY UPLC BEH AMIDE (DER) .....	35
Gráfica 3. CURVA DE CALIBRACIÓN TAA.....	36
Gráfica 4. RECUPERACIÓN TAA 200PPM.....	39
Gráfica 5. RECUPERACIÓN TAA 450PPM.....	39
Gráfica 6. RECUPERACIÓN TAA 700PPM.....	40

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. CLASIFICACIÓN CAÑA DE AZÚCAR (DIAZ & PORTOCARRERO, 2002) .....	12
Tabla 2. COMPONENTES DE LA CAÑA DE AZÚCAR (GIL ZAPATA, 2007) .....	13
Tabla 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA (SAGARPA, 2011)	14
Tabla 4. ALÍCUOTAS DE SOLUCIÓN DE 1000 PPM. ....	24
Tabla 5. ALÍCUOTAS DE SOLUCIÓN DE 1000 PPM PARA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	25
Tabla 6. SOLVENTES UTILIZADOS EN CADA ETAPA DEL SPE (METOH/W= METANOL GRADO HPLC/AGUA).....	26
Tabla 7. GRADIENTE UTILIZADO EN EL UPLC.....	28
Tabla 8. PARÁMETROS DEL DETECTOR ELSD .....	29
Tabla 9. TABULADO DE CURVA DE CALIBRACIÓN. ....	38
Tabla 10. TABULADO DE RECUPERACIONES (200,450 Y 700PPM).....	40

## RESUMEN

La caña de azúcar y el azúcar han ocupado durante años un lugar importante en todo el sector industrial del Valle del Cauca. Durante la etapa de molienda se separa la parte sólida de la planta de la parte líquida, obteniendo el jugo de caña del cual podemos extraer diferentes metabolitos de interés como algunos ácidos orgánicos dentro de los cuales encontramos el ácido aconítico. Éste es el ácido orgánico natural más abundante en ésta matriz y por esto se le atribuye que la acidez del jugo esté comprendida entre 5,3 y 5,8 unidades de pH, además, es un metabolito de alto interés comercial debido a su capacidad de generar agentes entrecruzantes y plastificantes. Por lo mencionado anteriormente, encontramos en el ácido aconítico una oportunidad de aumentar el aprovechamiento del cultivo de caña de azúcar. Con el fin de valorar el isómero trans del ácido, se desarrolló una metodología utilizando cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC- “ultra performance liquid chromatography”) acoplado a un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD por sus siglas en inglés “Evaporative Light Scattering Detector”), empleando una columna de interacciones hidrofílicas (HILIC). Debido a la naturaleza orgánica del metabolito, el cual presenta tres grupos hidroxilos ionizables, se utilizó un cartucho SCREEN-A para realizar un tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida (SPE-“solid phase extraction”) basado en la capacidad de intercambio entre la carga positiva de una amina cuaternaria y las cargas negativas presentes en la molécula ionizada de ácido. Utilizando un estándar Aldrich Chemistry con 98% de pureza y con ayuda de una curva de calibración con concentraciones de 100, 200,350, 400, 600 y 800 ppm se logró identificar una concentración de 2016ppm (0,2% w/v) en el jugo de caña diluido.

**Palabras claves:** UPLC, SPE, ácido aconítico, identificación y cuantificación de metabolitos, jugo de caña de azúcar.

## ABSTRAC

Sugar cane and sugar have occupied an important place for years in the whole industrial sector of Valle del Cauca. During the grinding step of the sugar manufacturing process, the solid part and liquid part of the plant are separated to obtain sugarcane juice in which we can find different metabolites of interest between them we find aconítico acid. This acid is a natural organic acid present in highest concentration in this juice and is primarily responsible for the pH of the juice that is between 5.3 and 5.8 and is a metabolite of high commercial interest due to their ability to generate cross-linking agents and plasticizers. By the above, we find aconitic acid an opportunity to improve the utilization of this crop. In order to assess this metabolite in the juice of sugar cane, we developed a methodology using ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to an ELSD detector and using a BEH Amide column with hydrophilic interactions (HILIC). Due to the organic nature of the metabolite, which has three hydroxyl groups ionizable, we used SCREEN-A cartridge for performing a sample by solid phase extraction (SPE) based on the interchangeability between the positively charged of the quaternary amine and the negative charges present in the ionized molecule of acid. Using an Aldrich Chemistry standard with 98% purity and with the aid of a calibration curve with concentrations of 100, 200.350, 400, 600 and 800 ppm were identified a concentration of 2016ppm (0.2% w / v) in the juice diluted cane.

Key words: UPLC, SPE, Aconitic acid, identification and quantification of metabolites, sugarcane juice.



## 1. INTRODUCCIÓN

En Colombia actualmente encontramos 228mil hectáreas sembradas de caña de azúcar en 5 departamentos y 48 municipios, de los cuales se producen aproximadamente 2,2 millones de toneladas de azúcar, siendo el valle del Cauca el mayor productor con un 77,3% del total a nivel nacional convirtiendo a los ingenios azucareros en la industria principal del sur-occidente colombiano (Asocaña, 2013). El cultivo demanda altos requerimientos nutricionales en consideración a la alta cantidad de materia verde y seca que produce, esta situación agota los suelos y hace necesario un riguroso programa de recuperación (Ramírez, 2008), por esto, se debe buscar el mayor provecho posible de cada cultivo. Durante el proceso de fabricación del azúcar encontramos que después de la molienda y previo a la clarificación, se produce el jugo de caña diluido en el cual encontramos un alto porcentaje de ácidos orgánicos con intereses comerciales en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética.

El ácido aconítico es el ácido en mayor proporción del jugo diluido de caña, y por esto es el principal metabolito de interés en este proyecto. La extracción en fase sólida (SPE) es una muy buena manera de asegurar la eliminación de muchas interferencias que encontramos en una matriz orgánica como lo es el jugo de caña. Es importante que todas estas impurezas sean eliminadas por completo ya que podrían generar resultados erróneos durante la experimentación. Para este punto, y teniendo en cuenta las características químicas de nuestro metabolito, se decidió experimentar con un cartucho Phenomenex Screen A el cual es adecuado para separar analitos basado en intercambio iónico entre el ácido aconítico ionizado y la carga positiva de los grupos presentes en la fase estacionaria, en este caso una amina cuaternaria.

Después de obtener un extracto limpio, se hace un análisis con el cual se pueda identificar y cuantificar el ácido en nuestra muestra. Mediante UPLC acoplado con un detector ELSD. Se espera la aparición de picos característicos con intensidades detectables, dentro de los cromatogramas obtenidos con esta metodología. Es importante que tanto este análisis como la extracción previa del metabolito se realicen con estándares puros de ácido aconítico, para asegurar las mejores condiciones de experimentación y comprobar la presencia de este ácido en el jugo de caña de azúcar y logrando el desarrollo exitoso del método.

## 2. DESCRIPCIÓN

### 2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación

La producción de azúcar siempre ha ocupado un lugar importante en la economía del país. El consumo nacional de azúcar en Colombia es de 1,6 millones de tmvc (toneladas métricas en su equivalente a volumen de azúcar crudo), destinado en un 52% al consumo directo en los hogares y un 48% a la fabricación de productos alimenticios, bebidas para consumo humano y otros productos industriales. (Asocaña, 2012). Sin embargo, en los últimos años, el posicionamiento de los sub-productos ha tenido un crecimiento exponencial y ha comenzado a tener una participación importante en la productividad final de la industria azucarera. Como ejemplo encontramos la producción de alcoholes combustibles, esta opción ha comenzado a abrir nuevas posibilidades de negocio, pero igual estamos frente a una matriz compleja de la cual se pueden sacar otros productos que traerían grandes beneficios industriales.

La caña de azúcar está constituida por el tronco y las hojas, el tronco está compuesto por la fibra y por el jugo que contiene agua y sacarosa, pero también encontramos dentro de él otros compuestos como los ácidos orgánicos. Estos ácidos se concentran en las plantas y representan un alto porcentaje de los componentes no-azúcares de la caña de azúcar. El ácido aconítico es el compuesto orgánico más predominante, su concentración es de tres a seis veces mayor que otros ácidos y además cumple una labor fundamental dentro del proceso de vida de las plantas. De este sub-producto se podría obtener un gran provecho debido a su importancia a nivel industrial en la generación de agentes entrecruzantes naturales y bioplásticos. (Gil Zapata, 2007).

El progreso de la industria de la caña de azúcar depende hoy en día del posicionamiento que logren diferentes sub-productos en el mercado mundial. Es necesario entonces generar nuevas oportunidades de negocio para lograr mejorar la productividad, sostenibilidad y competitividad de los ingenios azucareros colombianos. (Rivera, 2010)

Con este trabajo de grado se quiere ampliar la línea de investigación sobre derivados de productos naturales y biotecnológicos en farma-cosmética, centrándose en la extracción y valoración de ácido aconítico en el jugo de caña de azúcar diluido, generando nuevas ideas de negocios que de variedad al mercado y aumenten los ingresos a las empresas. El encontrar nuevos metabolitos secundarios en matrices naturales como el jugo de caña que han venido siendo desaprovechadas representa un gran desarrollo investigativo y más si se trata de una industria de gran importancia regional como lo es la industria azucarera. Se

podría llegar a brindar un servicio a los ingenios, los cuales se verían altamente beneficiados, obteniendo una mayor productividad de sus cultivos.

### 3. MARCO TEÓRICO

El azúcar como producto principal de los cultivos de caña, ha ocupado continuamente un lugar relevante en la historia de la humanidad. La caña de azúcar es una especie de pasto gigante, cultivada en los países del trópico y subtropical. Es un complejo híbrido constituido por al menos dos de las cinco especies del género *Saccharum* (Ver clasificación en tabla 1). Su producción en Colombia está concentrada en el valle del Cauca con un área neta sembrada de aproximadamente 224 mil hectáreas. Cultivos que han venido creciendo desde los años noventa en un porcentaje aproximado del 30% como consecuencia de la sustitución de cultivos menos rentables y a la apertura económica. Con esta disponibilidad, se obtienen anualmente 122,1 toneladas de caña de azúcar por hectárea sembrada. Este cultivo llega a Cali traído por Sebastián de Belalcázar en 1540, quien la planta en su estancia de Yumbo y de allí se disemina por toda la cuenca del río Cauca. (Asocaña, 2011-2012).

Tabla 1. CLASIFICACIÓN CAÑA DE AZÚCAR (DIAZ & PORTOCARRERO, 2002)

<b>Nombre científico</b>	<i>Saccharum officinarum</i> L.
<b>Nombre común</b>	Caña de azúcar, conocida con otros nombres como caña de castilla, caña dulce, cañaduz, cañamelar, cañamiel y Sa-kar.
<b>Clasificación</b>	
<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Angiospermae
<b>Sub-clase</b>	Monocotyledoneae
<b>Superorden</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Commelinales
<b>Familia</b>	Poaceae
<b>Genero</b>	<i>Saccharum</i>
<b>Especie</b>	<i>officinarum</i> L.



Figura 1. CULTIVOS DE CAÑA (ASOCAÑA, 2011-2012)

La parte esencial para la producción de azúcar la constituye el tallo el cual se convierte en la materia prima para realizar el proceso de molienda (figura 3. Paso 2) que tiene como resultado final la separación de una parte sólida llamada fibra y una parte líquida que conocemos como jugo. Éste jugo contiene en mayor proporción agua y sacarosa, pero también se encuentran otras sustancias en cantidades muy pequeñas pero aprovechables. La proporción de los componentes (Tabla 2) cambian de acuerdo con la variedad de familias, la edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos etc. (perafán, 2009)

El contenido total de sólidos en el tallo limpio puede variar desde 24 hasta 27 g/100 g de caña. Los sólidos solubles pueden variar entre 10-16 g/100 g de caña, y la fibra entre 11-16 g/100 g caña. (Gil Zapata, 2007)

<b>COMPONENTES DE LA CAÑA DE AZÚCAR</b>	
Agua	73-76%
Sacarosa	8-15%
Fibra	11-16%
Glucosa libre	0,2-0,6%
Fructosa libre	0,2-0,6%
Sales	0,3-0,8%
ácidos Orgánicos	0,1-0,8%
Otros	0,3-0,8%

Tabla 2. COMPONENTES DE LA CAÑA DE AZÚCAR (GIL ZAPATA, 2007)

Después de la extracción del jugo se obtiene un residuo llamado bagazo (Ver componentes de bagazo en tabla 3), el cual es uno de los sub-productos que ha comenzado a marcar una pauta dentro de la industria azucarera ya que está siendo aprovechado como generador de vapor y electricidad para alimentar las turbinas de vapor que accionan los molinos y los turbogeneradores de energía eléctrica (Figura 3. Paso 3) (cenicaña, 2004). También se adelantan investigaciones sobre el uso de bagazo de caña de azúcar para la remoción de hidrocarburos en suelos contaminados (Garcia-Torres et al, 2010).

<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA</b>	
Materia	Bagazo entero seco %
Celulosa	51.23
Hemicelulosa	24.11
Lignina	20.67
Cenizas y otros compuestos	3.99

Tabla 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA (SAGARPA, 2011)

Con el jugo diluido se comienzan una serie de procesos de purificación para la obtención del producto principal de esta industria: La sacarosa (alfa-D-Glucopiranosil - (1→2) - beta-D-Fructofuranósido) (Figura 2), mejor conocida popularmente como azúcar de mesa. Este compuesto bioquímico es un disacárido que se encuentra libre en la naturaleza debido a que las plantas lo utilizan como un modo de transporte de carbohidratos, está compuesto por fructosa y glucosa y al no tener ningún carbono anomérico libre no posee poder reductor. (Berg, 2007, pág 311).

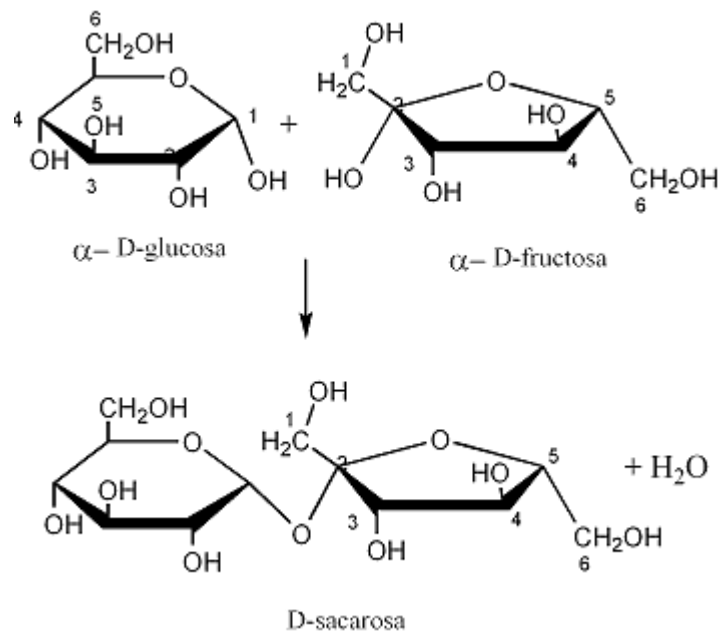


Figura 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA SACAROSA (BERG, 2007, PÁG 311).

El proceso productivo comienza con la cosecha, almacenamiento y purificación de la materia prima (figura 3. Paso 1) La caña se prepara para comenzar su transformación, los tallos se liberan del residuo pobre en sacarosa del cual se origina una cantidad de 25 a 30 Kg/100 Kg de caña (GTZ & BMZ, 1996). La otra parte continua al paso de molienda donde se exprime y lava el bagazo mediante molinos continuos que van retroalimentando al anterior hasta llegar al último donde se realiza un lavado más riguroso con agua caliente, de esta manera se extrae el jugo contenido en la fibra de caña. Este jugo extraído se pasa por un calentamiento donde se eleva la temperatura hasta un valor cercano del punto de ebullición (105°C) seguido de una adición de cal para eliminar toda la acidez presente. Los ácidos orgánicos inducen un descenso del pH ocasionando un aumento en la tasa de inversión de la sacarosa por catálisis ácida, lo que contribuye al incremento de las pérdidas adicionales de azúcar comercial. (Laharrahondo, 1995), por esto es importante su eliminación en esta etapa del proceso. También suelen competir por la cal con el ácido fosfórico disminuyendo la efectividad de la alcalinización del jugo (Gil Zapata, 2007).

La clarificación consiste en separar los sólidos insolubles en el jugo diluido el cual pasa a ser un jugo con un nivel de turbiedad bajo. Este jugo contenido, llamado jugo claro, sigue con el proceso de evaporación y cristalización. Durante la evaporación se extrae hasta el 80% del agua y se obtiene la meladura. En la cristalización se forman los cristales de sacarosa, la meladura pasa por diferentes tachos donde se obtienen masas con diferentes proporciones de cristales y miel,

componentes que seguidamente son separados en las centrífugas. Los cristales de azúcar retenidos en las mallas de las centrífugas son disueltos con agua caliente, este jarabe recibe el nombre de licor, el cual es enviado a la refinería. Durante la refinación el jugo pasa por diferentes procedimientos que finalizan con filtración, lavados con vapor y agua caliente, y secados con aire, obteniendo como producto final el azúcar comercial. (Cenicaña).

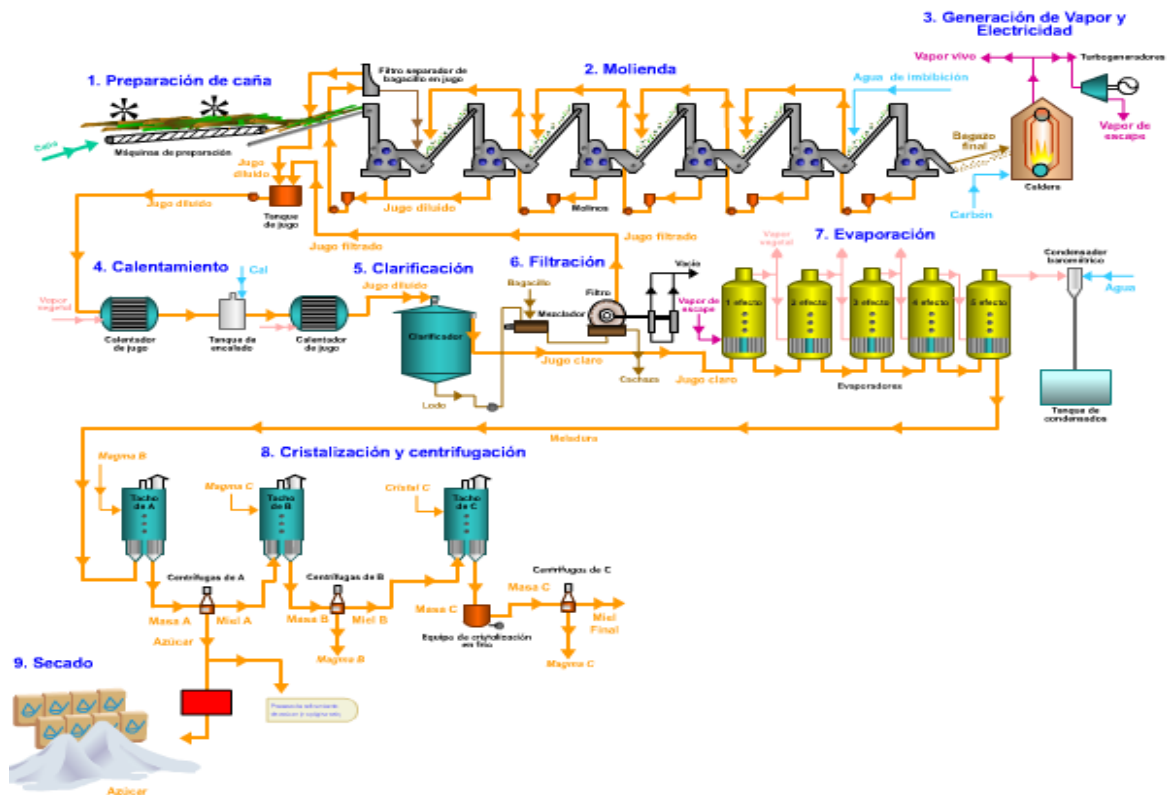


Figura 3. ETAPAS DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DEL AZÚCAR. (CENICAÑA, 2004)

Aparte del bagazo, también se obtienen otros residuos que son aprovechados industrialmente. Las impurezas sedimentadas en el proceso de clarificación pasan a filtros rotatorios donde se retiene la cachaza, principal abono en la plantación y las mieles obtenidas durante la evaporación y cristalización se vuelven a cristalizar para ser agotadas y finalmente son utilizadas como materia prima en la producción de alcohol etílico (Posada Mora, 2013).

El ácido aconítico (Ácido Prop-1-eno-1,2,3-tricarboxílico) es un ácido alifático insaturado tribásico de fórmula molecular  $C_6H_6O_6$  y peso molecular 174 g/mol. Es



un sólido cristalino de color blanco-amarillo, con un punto de fusión de 195°C, soluble en agua y alcohol. Al ser un ácido orgánico es un ácido débil, presenta tres valores de  $pK_a$  debido a sus tres carboxilos ionizables, los valores respectivos son 2.8 (A)- 4.46 (B)- 6.3 (C) (Figura 5). Existen dos formas geométricas, el isómero trans e isómero cis. La cantidad del isómero cis que se encuentra en la caña es poco debido a que este es utilizado en el ciclo de krebs. Por el contrario, el ácido trans-aconítico (TAA) se almacena en las células y es el ácido en mayor proporción dentro del jugo de caña diluido. Los ácidos son capaces de participar en reacciones complejas con azúcares y otros componentes orgánicos del jugo, generando un marcado efecto melasigénico (producción de mieles) durante la etapa de cristalización de la sacarosa y conducen, en consecuencia, a la producción de mieles finales de alta pureza y a una disminución de productividad del proceso de obtención del azúcar comercial (Laharrahondo, 1995). Pero en este caso, el ácido aconítico podría ser extraído y tratado como un nuevo sub-producto aprovechable de la industria azucarera.

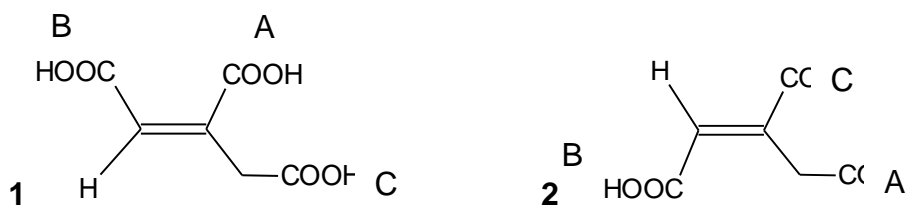


Figura 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL AC. CIS-ACONÍTICO (1) AC. TRANS-ACONÍTICO (2)

En una primera descripción del ácido Cis-aconítico, Malachowski y Maslowski notaron que en solución acuosa se presentaba una rápida conversión al isómero trans utilizando altas temperaturas (citado por Ambler & Roberts, 1943) El isómero trans también es altamente vulnerable a procesos de isomerización, a temperaturas entre 70-90°C y a pH bajos (Gil Zapata, 2007), pero su estabilidad es mayor. El mecanismo de isomerización (Ver figura 5) comienza cuando el medio donde se encuentra el analito se encuentra muy ácido ( $pH < 2.8$ ), se produce una adición electrofílica donde los electrones del doble enlace forman un nuevo enlace con un protón generando un carbocation. El carbocation ataca el agua quedándose con su hidroxilo y formando un alcohol, en este punto del mecanismo se presenta la rotación del enlace dejando los dos grupos carboxilos paralelos, posteriormente se produce una deshidratación del alcohol y se vuelve a formar el doble enlace, dejando como resultado el Ácido Cis-Aconítico.



adecuado acondicionamiento se procede a cargar el cartucho con la muestra con un flujo controlado mediante una válvula en la estación de vacío (Ver figura 6). Los componentes de interés se retienen en el adsorbente de SPE mientras que la matriz y los contaminantes eluyen. Usando una serie de solventes se realizan lavados que con fuerza creciente vayan eliminando cualquier número de contaminantes que queden en el cartucho para que al final sólo quede el analito de interés atrapado, para ser eluido en un último paso y se obtenga el resultado deseado. (Madrid, 2012)

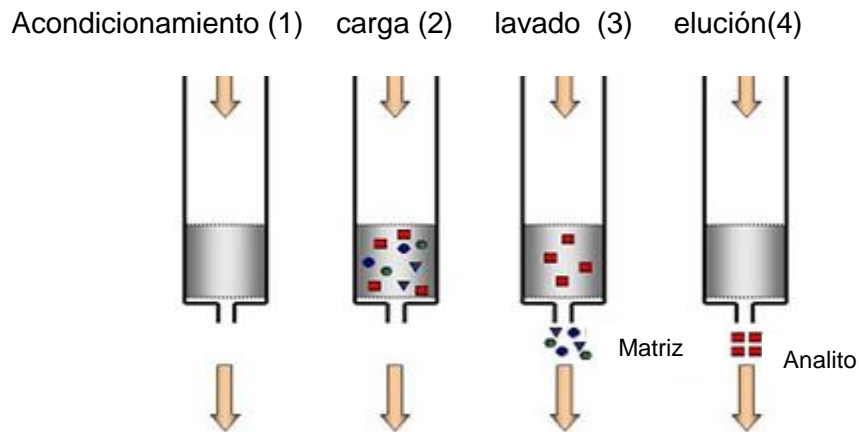


Figura 6. ETAPAS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA SPE (UCM, 2012)

Todo este proceso de tratamiento de muestra se centra en la resina que posea el cartucho seleccionado. Para la extracción de un metabolito secundario como el ácido aconítico utilizamos cartuchos SCREEN-A cuya selectividad esta soportada por un adsorbente hidrófobo C8 y un grupo de intercambio aniónico fuerte para la extracción de fármacos de matrices biológicas (Figura 8).El intercambio iónico separa analitos basándose en las interacciones electrostáticas entre el analito de interés y los grupos cargados positivamente en la fase estacionaria. Para que se produzca el intercambio iónico, tanto de la fase estacionaria y la muestra debe estar a un pH donde ambas partes se encuentren cargadas (Phenomenex, 2013).

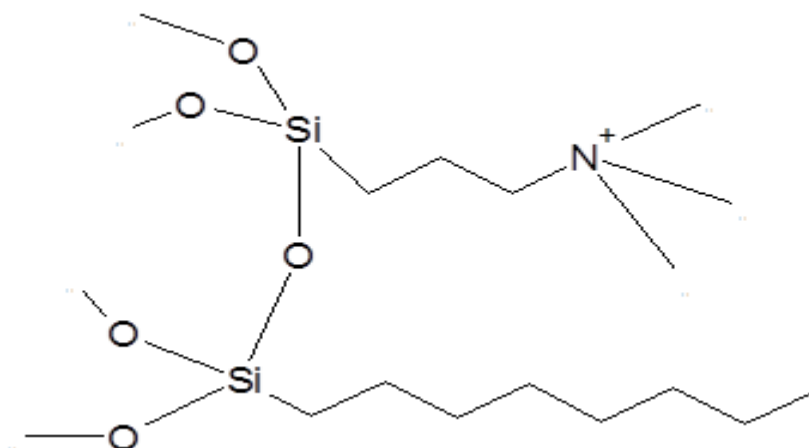


Figura 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS CARTUCHOS SCREEN-A

Para el análisis de la muestra tenemos disponibles muchas técnicas que nos permiten determinar un analito de cualquier naturaleza. En este proyecto se utilizó la cromatografía líquida de ultra resolución (“Ultra performance liquid chromatography” (UPLC)) la cual es una técnica que se caracteriza por analizar una variedad de muestras y cada uno de sus componentes basándose en las interacciones químicas que se generan entre una fase móvil y una columna cromatográfica como fase estacionaria. El UPLC usando partículas pequeñas (<2µm) y presiones hasta de 15000psi ha demostrado una mayor resolución, velocidad y sensibilidad en los análisis comparado con la cromatografía líquida de alta resolución (“High performance liquid chromatography” (HPLC)), ofreciendo beneficios adicionales como una significativa disminución en el consumo de fase móvil (Chen & Kord, 2009).

La columna se elige dependiendo de la naturaleza del analito de interés, y así mismo se eligen los solventes a utilizar. En este caso, se utilizará una columna que nos permita obtener una cromatografía basada en interacciones hidrofílicas (HILIC). Éste tipo de cromatografía es importante para la separación de sustancias altamente polares entre ellos principios activos, neurotransmisores, nucleosidos, nucleótidos, aminoácidos etc. En una separación tipo HILIC, la fase móvil consta de solventes orgánicos acuosos y la fase sólida consiste en una columna soportada en sílica con algún grupo polar como amino, amida, zwitteriones funcionales, polioles etc. (Ikegami et al, 2008). La columna ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7µm 2,1 x 100mm presenta un ligando trifuncional amida que permite interactuar con analitos polares no ionizados con la fase estacionaria mediante interacciones dipolo-dipolo. (Waters, 2012)

Cuando ésta se acopla a un detector de dispersión de la luz tras evaporación (ELSD-Figura 7) permite detectar y cuantificar concentraciones más bajas de analito en las muestras. (Waters, 2012). En este detector, el flujo proveniente de la columna pasa a un nebulizador donde se transforma en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno o aire. Posteriormente se evapora la fase móvil originando analito sólido. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz laser y la radiación dispersada se detecta en dirección perpendicular al flujo mediante un fotodiodo de silicio. (Skoog at el, 2008). Cuando una molécula no presenta grupos cromóforos es difícil hacer su identificación mediante un detector uv-visible, por lo que se comienza a pensar en otra serie de detectores. El uso de IR tiene limitaciones debido a su baja sensibilidad, la espectrometría de masas (MS) es una técnica más cara y sofisticada como para utilizarlo de manera rutinaria en los campos industriales, en cambio, el ELSD, como un detector universal, posee una alta sensibilidad de detección y no requiere un cromóforo en el analito (Kong at el, 2010). La respuesta de este detector cambia exponencialmente con el aumento de la concentración de analito que se utilice.

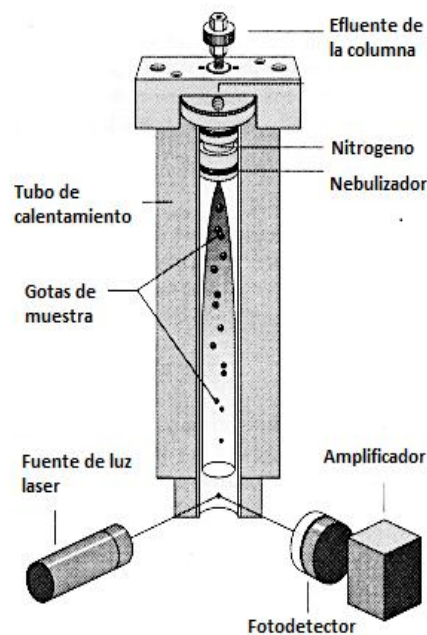


Figura 8. DETECTOR ELSD

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General:

Desarrollar una metodología de identificación y cuantificación de ácido trans- aconítico en el jugo de caña de azúcar, que permita mejorar los tiempos de retención cromatográfica.

### 4.2. Objetivos específicos:

- Determinar las mejores condiciones de análisis de muestra empleando una nueva fase estacionaria que incremente las interacciones hidrofílicas extendiendo la retención del ácido trans-aconítico.
- Identificar y cuantificar el ácido trans-aconítico en la matriz del jugo de caña de azúcar, considerando las condiciones de estudio definidas.

## 5. METODOLOGÍA

La metodología desarrollada está compuesta por dos grandes etapas. La primera incluye un tratamiento de muestra que permite la eliminación rápida de las interferencias mediante extracción en fase sólida (SPE), ésta etapa va seguida de un análisis mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) acoplado a un detector de dispersión de luz mediante evaporación (ELSD). A continuación se explica detalladamente el paso a paso llevado a cabo para el exitoso planteamiento de ésta metodología.

### 5.1 Preparación de estándar TAA solución madre 1000 ppm

Para asegurar que el método desarrollado efectivamente determine el ácido trans-aconítico, se hace experimentación utilizando un estándar de ácido trans-aconítico Sigma-aldrich 98% de pureza. Se prepara una solución madre de 1000ppm de TAA de la siguiente manera:

- 1 - Pesar 10,2 mg de estándar en balanza analítica (capacidad) utilizando como recipiente un balón volumétrico de 10 mL.
- 2 - Tomar 10mL de Agua Tipo 1 recién recolectada (conductividad de 0,05  $\mu$ S/cm y filtrada por membrana de 0,22  $\mu$ m) con una probeta de vidrio de igual capacidad, y disolver los 10mg de estándar pesados previamente.
- 3 -Transferir a un vial ámbar de 20 mL.
- 4- Rotular el vial como ácido trans-aconítico 1000 ppm

### 5.2 Preparación de estándar de TAA a 200, 450 y 700 ppm para evaluar la recuperación de TAA

Con el fin de evaluar la capacidad de recuperación de la metodología planteada para la determinación y cuantificación del ácido de interés. Se procede a realizar una serie de ensayos utilizando diferentes concentraciones de estándar preparadas a partir de la solución madre de 1000 ppm de la siguiente manera:

1 - Calcular la alícuota que se debe tomar a partir de la solución madre de 1000 ppm para preparar 1 mL de la nueva concentración, utilizando la fórmula 1.

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}$$

Fórmula 1. Alícuotas de estándar TAA 1000 ppm

En la tabla 4 encontramos las alícuotas calculadas para cada una de las concentraciones requeridas.

<b>Concentración final</b>	<b>Alícuota de 1000 ppm</b>
200 ppm	0,2 mL
450 ppm	0,45mL
700 ppm	0,7 mL

Tabla 4. ALÍCUOTAS DE SOLUCIÓN DE 1000 PPM.

2 - Tomar el volumen determinado de solución madre (1000 ppm), utilizando una micropipeta de 1000 ul y adicionarlo en un vial para UPLC.

3 - Completar volumen restante con agua tipo 1 recién recolectada utilizando micropipeta de 1000 ul, hasta completar a 1 mL.

4 - Realizar cada concentración por triplicado.

5 - Rotular cada vial con su concentración indicada y numerando del 1 al 3.

### 5.3 Preparación de curva de calibración (100, 200, 350, 400, 600 y 800 ppm)

Cuando se quiere determinar la cantidad de analito de interés que se encuentra en alguna matriz, se debe construir una curva de referencia con cantidades conocidas



a partir de un estándar, donde se encuentre una relación entre la concentración y la absorbancia de la muestra, generando una ecuación que nos permita interpolar los resultados obtenidos. A partir de la solución madre de 1000ppm preparada en el paso 5.1, tomar con micropipeta el volumen determinado para preparar 1mL de la nueva concentración. (Ver fórmula 1 y tabla 5). Completar a volumen con agua Tipo 1 recién recolectada hasta 1mL y rotular cada vial con su concentración indicada.

<b>Concentración final</b>	<b>Alícuota 1000 ppm</b>
100ppm	0,1mL
200ppm	0,2 mL
350 ppm	0,35 mL
400 ppm	0,4 mL
600ppm	0,6 mL
800ppm	0,8 mL

Tabla 5. ALÍCUOTAS DE SOLUCIÓN DE 1000 PPM PARA CURVA DE CALIBRACIÓN

#### 5.4 Tratamiento de muestra por medio de extracción en fase sólida (SPE)

A continuación se indican las condiciones determinadas para llevar a cabo un exitoso tratamiento de muestra que nos permita eliminar interferencias presentes en nuestra matriz

**Cartucho:** Phenomenex Screen A, resina amino cuaternaria.

**Montaje:**

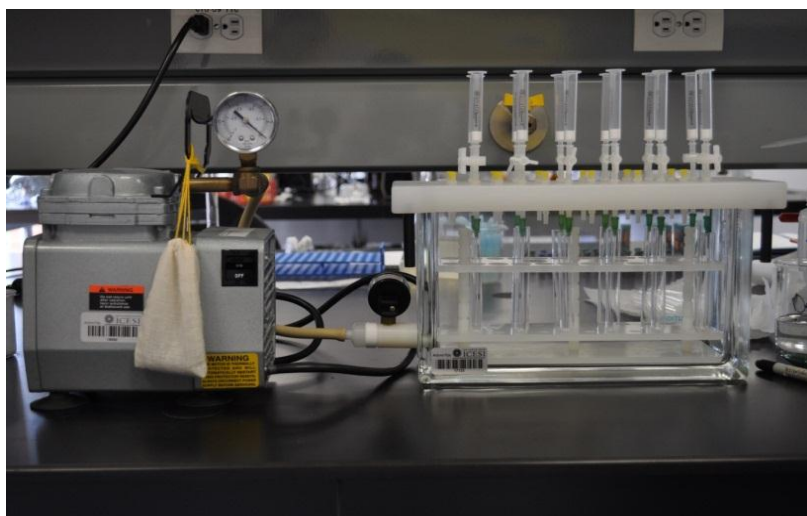


Figura 9.MONTAJE SPE

**Solventes:**

ACONDICIONAMIENTO	Metanol – Agua Tipo 1
CARGA	solución de estándar de TAA o muestra de jugo de caña diluido pH = 8,0
LAVADO	Solución 90:10 MetOH/W pH>7,0
ELUCIÓN	Solución 20:80 MetOH/W 5%HCl pH= 1,0-2,0

Tabla 6. SOLVENTES UTILIZADOS EN CADA ETAPA DEL SPE (METOH/W= METANOL GRADO HPLC/AGUA)

Procedimiento:

1. ACONDICIONAMIENTO: Realizar acondicionamiento del cartucho utilizando 1mL de cada solvente medido con micropipeta de 1000 ul (Primero Metanol grado HPLC seguido de Agua tipo 1). Este punto es muy importante porque se realiza la activación del material para que éste produzca una correcta retención del analito.

2. CARGA: Adicionar 1mL de solución estándar de TAA o 3mL de jugo de caña dilluido. Asegurar un pH = 8.0 con el fin de que el ácido se encuentre desprotonado y logre un contacto efectivo con la matriz del cartucho. Al abrir la llave del cartucho se debe asegurar un flujo de elución moderado.

3. LAVADO: Por ensayos previos, se encontró el mejor solvente para realizar el lavado del cartucho donde se asegura una eliminación de interferencias sin remover el analito de interés. Adicionar 1mL de la solución de lavado (MetOH/W 90:10).

4. ELUCIÓN: Con 1mL de solución MetOH/W 20:80 con 5% de HCl para asegurar un pH bajo, donde se logre romper la unión analito-resina y aseguremos la elución completa del ácido aconítico.

Para tener en cuenta en cada etapa:

- Medir el pH de cada solvente.

- Antes de adicionar los solventes se debe asegurar que cada uno de los cartuchos este bien puesto y que debajo se hayan colocado los tubos de ensayo debidamente marcados, donde se va a recolectar cada uno de los extractos obtenidos.

- Para agilizar el proceso se utiliza bomba de vacío.

Nota: Es importante que este procedimiento se le realice tanto a las soluciones estándar de TAA como a la muestra, para asegurar equidad de condiciones. Recoger cada uno de los extractos obtenidos para ser analizados mediante UPLC. La curva de calibración no lleva tratamiento de muestra.

## 5.5 Análisis de ácido trans- aconítico por cromatografía Líquida (UPLC)

Equipo: UPLC WATERS con detector ELSD



Figura 10. UPLC WATERS ACQUITY H-CLASS

Columna: ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7 $\mu$ m 2,1 x 100mm 50mm

Condiciones de la corrida cromatográfica:

Solvente A: agua tipo 1 con 0.05% ácido fórmico.

Solvente B: acetonitrilo grado HPLC con 0.05% ácido fórmico

#### TABLA DE GRADIENTE

	Tiempo (min)	Tasa de flujo (mL/min)	% Solvente A	% Solvente B
1	Inicial	0,5	0	100
2	1,00	0,5	0	100
3	2,00	0,5	40	60
4	4,00	0,5	40	60
5	4,10	0,5	0	100
6	6.00	0,5	0	100

Tabla 7. GRADIENTE UTILIZADO EN EL UPLC

## ELSD

<b>Parámetros</b>		
Presión del gas	40.0	Psi
Modo del nebulizador	Heating	30%
Gain	25	-
Temperatura del tubo deriva	40.0	°C

Tabla 8. PARÁMETROS DEL DETECTOR ELSD

- 1 - Filtrar cada extracto obtenido utilizando filtros de nylon 0,22 $\mu$ m.
- 2 - Correr el estándar previamente filtrado.
- 3 - Identificar el ácido aconítico por sus espectros de absorción.
- 4 - Correr la muestra previamente filtrada.
- 5 - Comparar áreas de picos obtenidos contra pico del estándar.

Para tener en cuenta durante el desarrollo de la metodología:

1. El SPE se debe realizar tanto para la muestra como para los estándares para asegurar las mismas condiciones en los análisis, y la minimización de errores. Es muy importante tener en cuenta la velocidad de flujo tanto en la carga.
2. En el momento de pesar el estándar, se debe reportar el valor exacto para tener una concentración exacta y poder conocer el porcentaje de recuperación correctamente sin valores superiores a 100%. La balanza debe ser una balanza analítica y los instrumentos para la toma de alícuotas deben ser volumétricos. Es importante purgar los instrumentos para evitar contaminaciones cruzadas de la muestra,
3. Los solventes para el UPLC deben ser filtrados por filtros de membrana de 0,22 $\mu$ c para evitar que cualquier impureza tapone la columna de cromatografía y dañe el equipo.
4. Controlar con equipos calibrados, los pH de las soluciones a trabajar y la temperatura de la muestra. De esta manera se puede evitar la isomerización del TAA que se ve favorecida a pH bajos y temperaturas altas.

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El objetivo principal de este trabajo de grado incluía desarrollar una metodología de identificación y cuantificación de ácido trans- aconítico en el jugo de caña de azúcar, que permita mejorar los tiempos de retención cromatográfica. Debido a que la matriz que estamos utilizando es totalmente natural se hace necesario desarrollar un tratamiento de muestra que permita eliminar la mayoría de las interferencias presentes. Es de conocimiento general que dentro del jugo de caña se encuentran muchos otros componentes que deben ser retirados antes de pasar a la etapa de análisis de muestra. Las condiciones ideales para realizar éste tratamiento fueron determinadas durante un largo proceso de ensayos cuyos resultados fueron presentados en el trabajo de grado de Laura Posada Mora (Posada, 2013).

El tratamiento de la muestra se realizó mediante extracción en fase sólida o SPE. Ésta es una manera rápida de realizar una limpieza a las muestras utilizando cartuchos con resinas especiales que retengan hasta cierto punto el analito de interés y permita separarlo exitosamente del resto de la matriz obteniendo un extracto concentrado del mismo. El cartucho seleccionado fue un Phenomenex Screen A, el cual posee un relleno que presenta en su estructura una amina cuaternaria (figura 7) y permite retener el analito mediante interacciones de intercambio iónico. Es importante tener en cuenta los pH con los que se debe trabajar debido a que es muy importante que la matriz se active correctamente durante la etapa del acondicionamiento, que se utilice un solvente que no interfiera con la actividad de la matriz. Las muestras deben estar a un pH dos unidades por encima del pKa mayor, donde se asegure que nuestro ácido se va a encontrar completamente ionizado permitiendo así que se genere una fuerte atracción con los grupos funcionales opuestos. El pH seleccionado es de 8,0, teniendo en cuenta que el ácido aconítico presenta pKa de 2.8- 4.46- 6.3, y a este pH podemos asegurar que se tiene una carga negativa que genere interacción con la carga positiva de la amina cuaternaria del SCREEN-A. Es muy común que este tipo de adsorbentes se utilicen para la extracción de ácidos débiles como lo son los ácidos orgánicos que presentan una o más cargas negativas. (Figura 11)

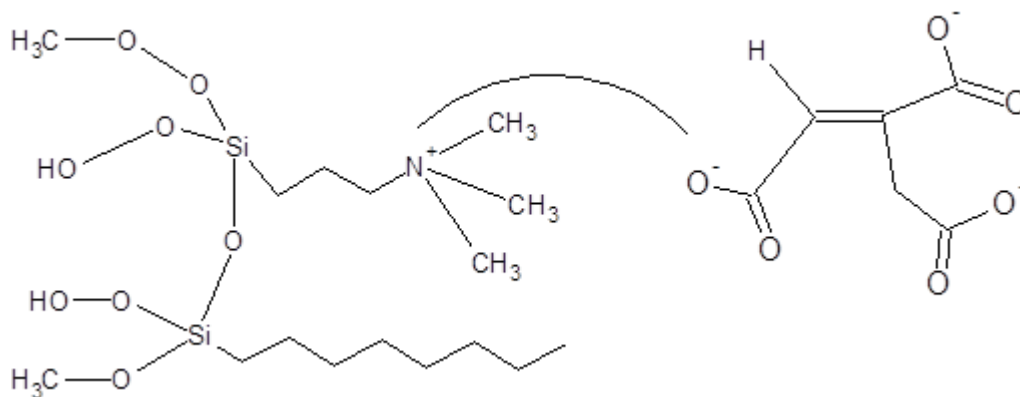
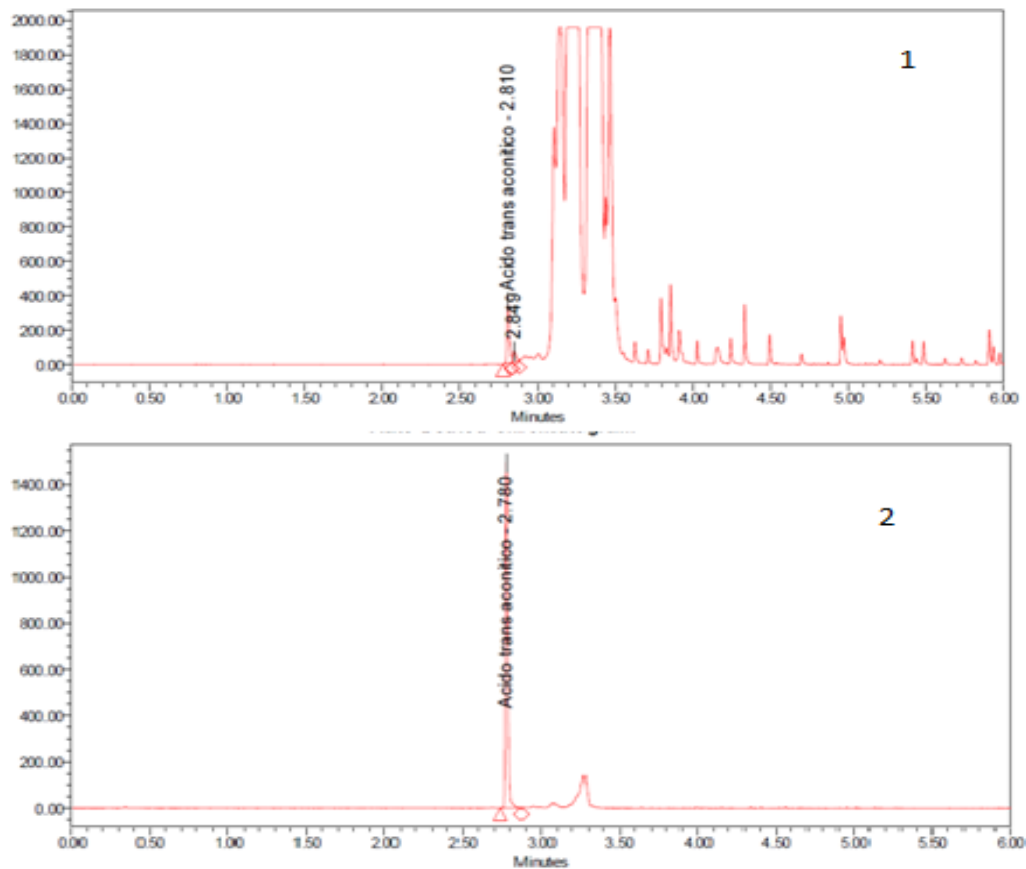


Figura 11. ENLACE IONICO SCREEN-A--TAA

La siguiente etapa crítica de todo este proceso de extracción es la elución del metabolito. Para realizar este procedimiento debemos asegurar un medio tan lleno de protones ( $H^+$ ) que se unan a aquellos oxígenos cargados negativamente en el ácido, al igual que en el punto anterior, protonando la molécula y permitiendo que se rompan los enlaces iónicos y eluya el analito. El pH ideal se encuentra dos valores por debajo del  $pK_a$  menor del ácido. Para lograr un valor de pH bajo, se adiciona a los solventes un porcentaje de ácido clorhídrico (5%). El pH debe encontrarse entre 1,0 y 2,0 o lo más bajo posible. Las soluciones con las que se hace el lavado no pueden estar por debajo de pH 7,0 para evitar que antes de la elución se protonen moléculas de ácido y se pierda analito.

En la gráfica 1 podemos observar los cromatogramas obtenidos al inyectar dos muestras de jugo de caña de azúcar diluido. En la parte superior se tiene la muestra inyectada directamente en el equipo UPLC y en la parte inferior una muestra previamente tratada mediante SPE. Las notorias diferencias entre estos dos cromatogramas están indicando la importancia de utilizar un tratamiento de muestra efectivo, el SPE elimina todas aquellas interferencias que aparecen posterior al ácido trans-aconítico y que posiblemente sean aquellos componentes de más que están presentes en el jugo como algunas sales, otros ácidos orgánicos (ácido oxálico, itacónico, cítrico etc), algunos azúcares, glucosa, fructosa, etc. Estos componentes sin importancia para este trabajo disminuyen la concentración de ácido en la muestra y además se convierten en interferencias notorias para el análisis.





Gráfica 1. JUGO DE CAÑA SIN SPE(1) CON SPE(2)

	Nombre	Tiempo de retención	de Area	Altura	cantidad (ppm)
1	TAA	2,819	395496	354258	933

Tabla 9. JUGO DE CAÑA SIN SPE

	Nombre	Tiempo de retención	de Area	Altura	cantidad (ppm)
1	TAA	2,78	1641249	149811	2016

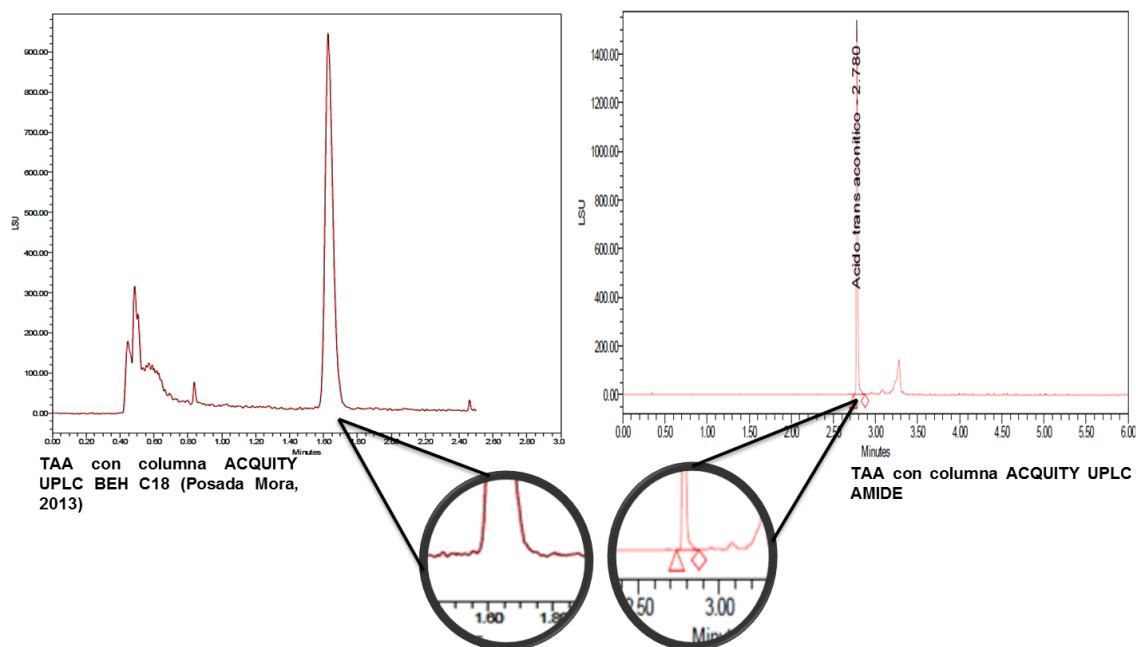
Tabla 10. JUGO DE CAÑA CON SPE

Después de realizar el tratamiento de muestra se procede a analizar las muestras mediante UPLC acoplado a un detector ELSD. Antes de realizar la experimentación se debió realizar una serie de pruebas utilizando soluciones estándar a concentraciones variadas. De esta manera aseguramos que

efectivamente el método permita identificar el ácido aconítico independientemente de la concentración en el que se encuentre. La columna que se decide utilizar es una columna ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7 $\mu$ m 2,1 x 100mm.

Este tipo de fase estacionaria permite realizar una cromatografía basada en interacciones hidrofílicas (HILIC), de esta manera permite una excelente retención de compuestos polares. La fase amida es altamente estable, y permite trabajar con un amplio rango de pH que va desde 2,0 hasta 11,0, algo importante en estos experimentos ya que debido a la naturaleza de nuestro metabolito utilizamos solventes con diferentes tipos de pH. A cada solvente se le adiciona 0.05% de ácido fórmico, hay diferentes razones para adicionar ácido en bajas concentraciones a la fase móvil, la más relevante es el beneficio que se genera en términos de retención y /o forma de los picos en condiciones ácidas, porque cualquier actividad de silanoles residuales se ve suprimida (Sigma-Aldrich). Por otro lado, esta columna permite tener tiempos de retención mayores comparados con la respuesta de otras columnas y aunque el pH de la muestra se encuentra en 1, la columna no sufre mayor percance porque el volumen que se inyecta es solo de 1 $\mu$ L y además este pasa rápidamente por la columna.

En ensayos pasados, se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm X 100 mm. Esta columna se caracteriza por utilizarse en cromatografías de fase reversa donde la fase estacionaria es apolar, esto impide que los metabolitos polares prolonguen su tiempo de contacto con la columna, eluyendo rápidamente. Por el otro lado, tenemos a la columna amida, que claramente permite obtener mayores tiempos de retención. El ácido aconítico eluye en un tiempo de 2,780 minutos, 1,18 minutos de diferencia con respecto al obtenido con la columna C18 donde el tiempo de retención fue de 1,62 minutos. (ver gráfica 2).



Gráfica 2. TAA CON COLUMNA ACQUITY UPLC BEH C18 (IZQ) (POSADA MORA, 2013). TAA CON COLUMNA ACQUITY UPLC BEH AMIDE (DER)

La Columna ACQUITY UPLC BEH Amide, al ser una columna amida que genera cargas parciales positivas e interactúan con las cargas parciales negativas de los carboxilos presentes en el ácido, esto permite que los tiempos de retención sean mayores. Estas interacciones no se presentan en una columna C18 utilizada para cromatografías en fase reversa. Para este tipo de análisis es muy conveniente que se tengan tiempos de retención moderados, para asegurar una respuesta óptima del método con respecto a la identificación y cuantificación del analito.

Al tener mayores tiempos de retención aseguramos un aumento en el factor de selectividad de la columna, al igual que en el número de platos teóricos, con estos resultados podemos pensar en una eficiencia mayor de la columna para separar dos picos diferentes. Si tenemos en cuenta el ancho del pico generado, también podemos asegurar una mejoría en la resolución de los cromatogramas. Esto es exactamente lo que observamos en la gráfica 2. La mejoría con respecto al sistema realizado utilizando una columna C18 es notoria debido a que se mejoran estos dos parámetros fundamentales. La resolución de un sistema cromatográfico nos expresa la capacidad de separación que se puede obtener para dos componentes dados. Dentro de su definición podemos encontrar a  $R_s$  es la

resolución,  $t_{R_A}$  y  $t_{R_B}$  son los tiempos de retención de los componentes A y B, y  $W_A$  y  $W_B$  son las anchuras de los picos del cromatograma de los anteriores componentes. (Universidad central de Venezuela)

$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$	$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$	$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$
------------------------------------	---	--

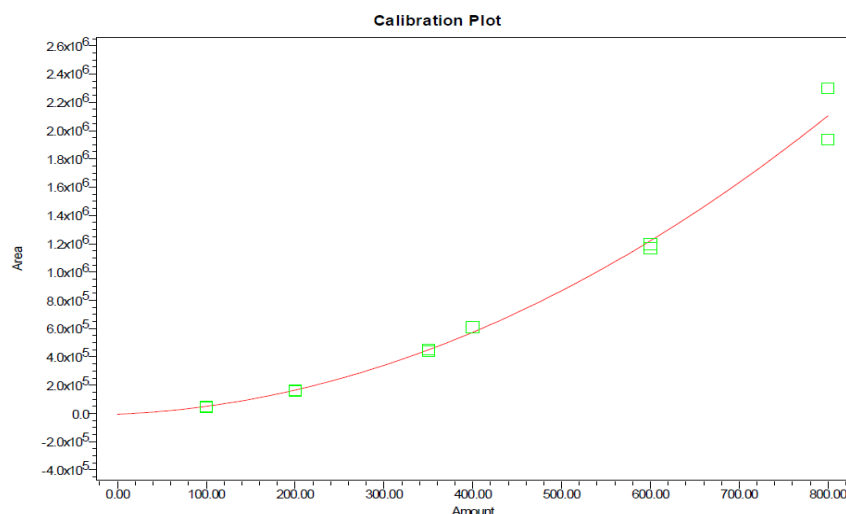
Factor de capacidad

Número de platos teóricos

Resolución

El detector ELSD se emplea generalmente para moléculas cuya respuesta en el UV no es buena. Aunque es un detector con menor sensibilidad en comparación con arreglo de diodos., las concentraciones de ácido trans-acónico son altas lo cual nos resulta adecuado emplearlo en esta metodología.

Para lograr una cuantificación del analito de interés dentro de la muestra de jugo de caña diluido se debe realizar una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de un estándar de ácido aconítico, estas soluciones debe inyectarse tal cual al equipo porque es la única manera de asegurar que se está inyectando la concentración preparada.



Gráfica 3. CURVA DE CALIBRACIÓN TAA

## REGRESIÓN EXPONENCIAL

$$Y = 9,2286 X^{1,8445}$$

Ecuación 2.Regresión exponencial Curva de calibración

$$R^2 = 0,9996$$

En la gráfica 3 podemos observar la curva de calibración obtenida utilizando cinco diferentes concentraciones, se ve claramente que la respuesta del detector que se decidió utilizar cambia exponencialmente con el aumento de la concentración del analito. Esto nos lleva a hacer un regresión exponencial para conocer la fórmula que nos muestre la verdadera relación entre la variable X (concentración de la muestra) y Y (Área del pico), para de esta manera interpolar el resultado obtenido al inyectar la muestra de jugo de caña de azúcar diluido previamente tratada. El coeficiente de correlación nos da un valor muy cercano a uno ( $R^2=0,9996$ ) por lo que podemos asegurar que es posible detectar la cantidad de analito presente en la muestra que inyectemos utilizando la curva de calibración realizada.

En la tabla 11 presentamos los resultados numéricos de la curva de calibración generada. Con estos valores el software nos genera un primer ensayo de recuperación partiendo de una concentración inicial teórica.

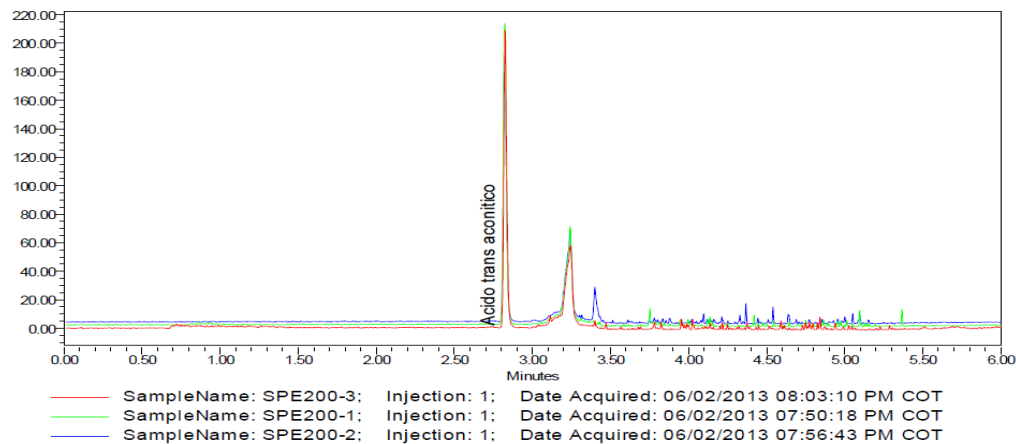
	nombre	Concentración (ppm)	Respuesta	Concentración calculada (ppm)	% recuperación	% desviación
1	Ac.trans aconítico	100	46957.2264	96.3169997	96.3169997	-3.6830003
2	Ac.trans aconítico	100	42989.0597	91.458677	91.458677	-8.541323
Media			44973.1431			
Desv. Stan			2805.91761			
%RSD			6.239			
1	Ac.trans aconítico	200	164375.544	199.481179	99.7405895	-0.2594105
2	Ac.trans aconítico	200	159829.158	196.314477	98.1572385	-1.8427615
Media			162102.351			
Desv. Stan			3214.78073			
%RSD			1.983			
1	Ac.trans aconítico	350	438426.474	345.327886	98.66511029	-1.33488971
2	Ac.trans aconítico	350	452836.991	351.509071	100.4311631	0.43116314
Media			445631.733			
Desv. Stan			10189.7742			
%RSD			2.287			
1	Ac.trans aconítico	400	610321.965	413.642999	103.4107498	3.41074975
2	Ac.trans aconítico	400	610180.914	413.591128	103.397782	3.397782
Media			610251.439			
Desv. Stan			99.7387255			
%RSD			0.016			
1	Ac.trans aconítico	600	1167295.58	585.965107	97.66085117	-2.33914883
2	Ac.trans aconítico	600	1197916.72	594.089503	99.01491717	-0.98508283
Media			1182606.15			
Desv. Stan			21652.4145			
%RSD			1.831			
1	Ac.trans aconítico	800	2298620.68	837.71346	104.7141825	4.7141825
2	Ac.trans aconítico	800	1937894.77	765.991328	95.748916	-4.251084
Media			2118257.73			
Desv. Stan			255071.736			
%RSD			12.042			

Tabla 9. TABULADO DE CURVA DE CALIBRACIÓN.

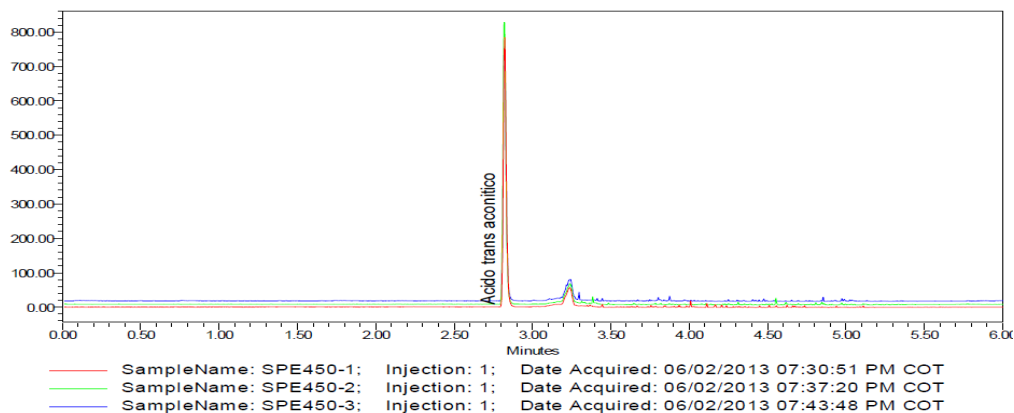
$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Concentración calculada ppm}}{\text{Concentración ppm}} \times 100$$

Ecuación 3. % de recuperación

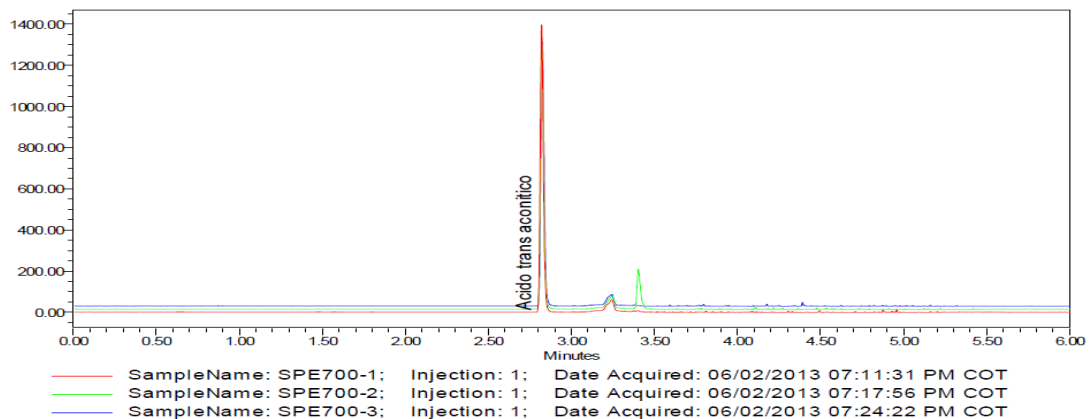
Con estos resultados tenemos una primera visión clara de que la metodología utilizada está recuperando un alto porcentaje de nuestro analito, pero para comprobar estos resultados se continúa realizando ensayos de recuperación utilizando diferentes concentraciones de soluciones estándar. Los resultados obtenidos se pueden ver en las gráficas 4 a 6 y en la tabla 12 que muestra los valores numéricos respectivos.



Gráfica 4. RECUPERACIÓN TAA 200PPM



Gráfica 5. RECUPERACIÓN TAA 450PPM



Gráfica 6. RECUPERACIÓN TAA 700PPM

	muestra	nombre	Tiempo retención	Area	Altura	cantidad (ppm)	% Recuperación
1	SPE200-1	TAA	2,823	301851	211531	280,948	140,474
2	SPE200-2	TAA	2,823	260313	184320	258,659	129,3295
3	SPE200-3	TAA	2,825	278226	208588	268,467	134,2335
<b>Media</b>				280130	201480	269,358	134,679
<b>Desv.stand</b>				20834	14933	11,17	
<b>%RSD</b>				7,4	7,4	4,1	
1	SPE450-1	TAA	2,823	1037924	783228	550,414	122,31422
2	SPE450-2	TAA	2,821	1114954	822760	571,829	127,07311
3	SPE450-3	TAA	2,822	980669	738908	533,983	118,66288 89
<b>Media</b>				1044516	781632	552,075	122,68340
<b>Desv.stand</b>				67385	41949	18,98	
<b>%RSD</b>				6,5	5,4	3,4	
1	SPE700-1	TAA	1,821	1881819	1398686	754,263	107,75185
2	SPE700-2	TAA	2,822	1821886	1291797	741,534	105,93342
3	SPE700-3	TAA	2,825	1777602	1281435	731,995	104,570
<b>Media</b>				1827102	1323973	742,597	106,08533
<b>Desv.stand</b>				52304	64911	11,17	
<b>%RSD</b>				2,9	4,9	1,5	

Tabla 10. TABULADO DE RECUPERACIONES (200,450 Y 700PPM)



Podemos decir entonces que la metodología desarrollada en este trabajo de grado obtuvo resultados satisfactorios debido a que se logró identificar el ácido trans-aconítico en una matriz de jugo de caña de azúcar recolectado en el paso previo a la clarificación durante el proceso productivo del azúcar. En el experimento de recuperación se realizaron inyecciones por triplicado y se observa que no hubo diferencias significativas por lo que es muy probable que si se realizara una prueba de repetitividad para estandarizar y validar el método, este parámetro podría estar dentro de los límites aceptados.

Se obtienen porcentajes de recuperación que superan el 100%, esto posiblemente se deba a errores en el momento de la preparación del estándar, en ninguno de los casos se pesó exactamente la cantidad que se debía por lo que es muy probable que las concentraciones hayan sido mayores si desde el principio la solución madre de 1000ppm no se preparó correctamente o también las alícuotas tomadas pudieron no ser las correctas aunque se asegura que se utilizó material volumétrico debidamente calibrado. La recuperación estuvo basada en una curva de calibración realizada con 6 concentraciones de ácido Trans-aconítico (100, 200, 350, 400, 600 y 800ppm). Esta curva no tiene una respuesta lineal debido a que el detector ELSD genera una respuesta no lineal, por esto, se hace un arreglo exponencial para la curva, donde se obtiene un  $R^2 = 0,996$  y con la ecuación del gráfico (ecuación 2) se obtiene que la muestra de jugo de caña diluido presenta ácido trans-aconítico en una concentración de 2016 ppm (0,2% w/v de jugo de caña diluido). Este valor puede ser menor debido a la explicación anterior sobre el porcentaje de recuperación.

## 7. CONCLUSIONES

- Se logró encontrar condiciones que mejoraran la metodología para la determinación de ácido trans-aconítico en jugo de caña de azúcar aumentando el tiempo de retención del metabolito en 1,18 minutos con respecto al tiempo logrado con una columna C<sub>18</sub>.
- Para lograr que los cromatogramas presenten una buena resolución es de vital importancia realizar un SPE como tratamiento de muestra debido a que este procedimiento permite limpiar la matriz de interferencias que afecten los resultados del análisis.
- Se confirmó que el jugo de caña presenta concentraciones considerables de ácido aconítico, el cual podría ser aprovechado en diferentes industrias entre ellas la farmacéutica y cosmética.
- Se encontró una concentración de 2016 ppm de TAA.
- El método de detección por UPLC-ELSD utilizando una columna amida, permitió obtener resultados con una alta resolución, sensibilidad y en un tiempo de retención de 2.8 minutos, permitiendo valorar exitosamente el contenido de TAA en jugo de caña.

## 8. RECOMENDACIONES

- La metodología desarrollada fue el resultado principal del trabajo de grado aquí presentado. Es un método que nos garantiza la valoración de ácido trans-aconítico en una matriz biológica como el jugo de caña de azúcar. Es importante que se continúen ensayos con el fin de llegar a una estandarización y validación de la metodología con el fin de darle mayor validez a los resultados obtenidos.
- Se deben evaluar criterios de selectividad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación y robustez para conocer el alcance que tiene la metodología desarrollada y que capacidad de modificación logra sin que sus resultados se vean afectados.
- Se debe evaluar la capacidad de detectar el isómero cis del ácido aconítico y observar si se logra separar exitosamente del isómero trans, pudiendo controlar el proceso de isomerización al que el ácido se ve expuesto.
- La teoría expone que dentro de la matriz del jugo de caña de azúcar están presentes muchos más analitos que podrían ser aprovechados industrialmente, por este motivo se debe seguir teniendo en cuenta el jugo de caña de azúcar para investigaciones futuras sobre el aprovechamiento de los sub-productos de la caña.

## 9. REFERENCIAS

Sagarpa, Producción a partir de caña de azúcar, recuperado de: <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/bioetanol/prouccion-a-partir-de-cana-de-azucar.html> (2011)

asocaña. (2011-2012). informe anual. Recuperado de de <http://www.asocana.org>

Posada Mora, L. (2013). Estandarización de un método para valorar el contenido de ácido trans aconítico en jugos de caña de azúcar.

GTZ, & BMZ. (1996). Guía de Protección Ambiental Tomo II: Economía Agropecuaria, Minería y Energía, Actividades Industriales y Artesanales.

CENICAÑA. (s.f.). Obtenido de Proceso de obtención del azúcar: [http://www.cenicana.org/pop\\_up/fabrica/diagrama\\_obtencion.php](http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_obtencion.php)

Rivera, N. A. (2010). Azúcar, co-productos y sub-productos en la diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. Virtual Pro procesos industriales- Agroindustria azucarera, 19.

Perafán, F. (noviembre de 2009). Azucar de caña. Recuperado el noviembre de 2012, de Electronic Thesis and Dissertation Library

Zapata, N. J. (2007). Aconitic acid from sugarcane: production and industrial application. Louisiana : Tesis.

Diaz Montejo, L. L., & Portocarrero Rivera, E. T. (2002). Manual de producción de caña.

Ramírez, M.A. Cultivos para la producción sostenible de biocombustibles: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos Modulo V: Caña de azúcar, En: SNV, Honduras, Tegucigalpa, Julio de 2008)

EL SECTOR AZUCARERO COLOMBIANO EN LA ACTUALIDAD consultado de: <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>

LAHARRAHONDO, J.E. Calidad de la caña de azúcar, En: CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali, CENICAÑA 1995 p. 337-354

Mañmary, G.H; Monteil, F & Molinier, J. Recovery of aconitic acid from simulated aqueous effluents of the sugar-cane industry through liquid-liquid extraction, ELSEVIER (1994)

Snow, N.H. Solid-Phase Extraction of drugs and metabolites, Seton Hall university, South Orange NJ, USA, Elsevier Ltd. (2007)

Wojtczak M. Antczak A. & Lisik, K. Contamination of comercial cane sugars by some organic acids and some inorganic anions, Institute of chemical food technology, Elsevier (2013) pág 193-198

Chen, S. & Kord, A. Theorical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography, Analytical Sciences, Chemical Development, GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406, USA, ELSEVIER (2009) Pags 6204-6209.

Ikegami, T. Tomomatsu, K. Takubo, H. Horie, K. Tanaka, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography, Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan, ELSEVIER (2008) Págs 474-503

Extracción en fase solida, Universidad complutense de madrid (2012). documentos y descargas UCM. Obtenido de: <http://www.ucm.es/info/ucmp/cont/descargas/documento15962.pdf>.

WATERS. (2012). waters the sciencie of what's possible. Obtenido de [http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10068208&locale=es\\_ES](http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10068208&locale=es_ES)

Kong, W. Jin, C. Liu, W. Xiao. X.. Zhao Y. Li Zulun, Zhang P. Xingfeng, Development and validation of a UPLC-ELSD method for fast simultaneous determination of five acid derivatives in Calculus Bovis and its medicinal preparations, China, ELSEVIER(2010) Pags 1193-1200.

Universidad Central de Venezuela, Guia de cromatografía, Escuela de química, Facultad de ciencias, Instrumental Analitico. Caracas 2008.

Página consultada: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992011000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992011000100003&script=sci_arttext)

PHENOMENEX Página consultada:  
<http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata/SAX?culture=es>