

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR EL CONTENIDO DE  
ÁCIDO TRANS ACONÍTICO EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR

LAURA POSADA MORA

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

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR EL CONTENIDO DE  
ÁCIDO TRANS ACONÍTICO EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR

LAURA POSADA MORA

Proyecto de grado

Doctor  
Guillermo León Montoya

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

## CONTENIDO

pag

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR EL CONTENIDO DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR .....	1
ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR EL CONTENIDO DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR .....	3
ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR EL CONTENIDO DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR .....	9
1. RESUMEN.....	9
1.1 ABSTRACT.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA QUE EL TRABAJO TIENE EN EL CAMPO PROFESIONAL.....	13
4. DELIMITACIÓN (ALCANCE Y LÍMITES) .....	16
5. MARCO TEÓRICO.....	17
5.1 La caña de azúcar en Colombia .....	17
5.2 Caña de azúcar. ....	21
5.3 Proceso productivo del azúcar.....	21
5.4 Ácidos orgánicos .....	24
a. Ácido aconítico.....	25
5.5 Extracción en fase sólida por intercambio iónico .....	26
5.6 Antecedentes.....	28

5.7	UPLC-ELSD.....	29
6.	OBJETIVOS .....	31
6.1	Objetivo General.....	31
6.2	Objetivos Específicos.....	31
7.	METODOLOGÍA.....	32
7.1	preparación de estándar.....	32
7.2	tratamiento de muestra.....	32
7.3	CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TAA.....	34
7.4	RECUPERACIÓN DEL TAA EN JUGOS DE DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE AZUCAR .....	35
7.5	análisis por uplc-elsd .....	36
8	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	37
9	CONCLUSIONES.....	52
10	RECOMENDACIONES .....	53
11	BIBLIOGRAFÍA.....	54

## CONTENIDO DE GRÁFICOS

	pag
Gráfico 1: Composición del jugo de azúcar.....	13
Gráfico 2: Balance azucarero entre los años 2000-2011 .....	18
Gráfico 3: Hectáreas de caña de azúcar sembradas y cosechadas en el periodo de 1986-2010. ....	19
Gráfico 4: Comparación del balance azucarero entre febrero 2011 y febrero 2012. ....	19
Gráfico 5: Modelo de sostenibilidad .....	20
Gráfico 6. Fases de la extracción en fase sólida .....	27
Gráfico 7: Interacción entre el cartucho de SPE y el TAA. ....	28
Gráfico 8: Curva de calibración del TAA .....	38
Gráfico 9: Área bajo la curva vs concentración de TAA por interpolación. ....	39
Gráfico 10: Curva de calibración y datos interpolados. ....	40
Gráfico 11: Cromatograma de estándar TAA después de realizar elución a pH 0,5. ....	42
Gráfico 12: Isomerización del TAA a cis-acónítico. ....	42
Gráfico 13: Degradación del TAA a pH neutro. ....	43
Gráfico 14: Degradación del TAA a pH 2.0 .....	43
Gráfico 15: Degradación del TAA a pH 1.0 .....	44

Gráfico 16: Degradación del TAA a pH 0.5 .....	44
Gráfico 17: Curva de calibración TAA .....	45
Gráfico 18: Estabilidad del TAA Vs. pH en el tiempo y estabilidad promedio.....	47
Gráfico 19: Etapas del proceso de fabricación de azúcar y clase de jugo extraído de cada una de ellas. ....	49
Gráfico 20: Cromatograma de comparación de jugos obtenidos en diferentes etapas de la fabricación de azúcar.....	49
Gráfico 21: Concentración promedio de TAA en jugos de caña de azúcar .....	50

## CONTENIDO DE TABLAS

	pag
Tabla 1: pKa del TAA .....	32
Tabla 2: Método UPLC establecido.....	36
Tabla 3: Condiciones del ELSD establecidas.....	36
Tabla 4: Resultados de la curva de calibración.....	38
Tabla 5: Concentración de TAA por interpolación.....	39
Tabla 6: Datos de área y concentración Recuperación 500ppm.....	48
Tabla 7: Concentración de TAA en jugo de caña de azúcar. ....	50

# ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA VALORAR EL CONTENIDO DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR

## 1. RESUMEN

Hoy en día el sector agrícola azucarero tiene un alto impacto en la economía colombiana, influyendo positivamente y de manera directa en el producto interno bruto (PIB) del país. Durante la fabricación del azúcar se generan diferentes residuos de desecho como lo son las hojas, el bagazo y la melaza. No obstante, existen otra cantidad de componentes presentes en la matriz o jugo de caña, los cuales son descartados debido a que se convierten en interferencias durante el proceso de extracción y purificación. Entre estos componentes se encuentran los ácidos orgánicos, tales como el ácido glicólico, el ácido málico, el ácido cítrico y el ácido aconítico (AA), siendo este último el que se encuentra en mayor concentración. Los ácidos orgánicos han sido utilizados en formulaciones cosméticas y dermatológicas por su efecto en peeling químico, actuando como exfoliantes y por tanto aumentando la permeabilidad de la piel, por tal motivo el AA podría ser utilizado en esta industria. Ahora bien, con el propósito de identificar y valorar el ácido trans aconítico (TAA) en jugo de caña de azúcar en diferentes etapas del proceso de producción y con el ánimo de establecer un método para valorar una molécula de origen natural desechada en el proceso de extracción y purificación de azúcar, en la ejecución del proyecto se estableció la extracción en fase sólida por intercambio iónico como método para el tratamiento de muestra, y se determinaron los parámetros cromatográficos óptimos por cromatografía de ultra-alta resolución y su detección evaporativo de luz dispersada (UPLC-ELSD) para la valoración del TAA. Así, la concentración de TAA fue valorada en cinco etapas del proceso de extracción de azúcar y se determinó un mayor porcentaje de este ácido en el jugo diluido, con un valor de 135,12g/L. Por último, los resultados de este proyecto son alentadores acerca de la oportunidad de generar nuevos productos cosméticos, que incorporen componentes como el ácido aconítico actualmente desechado, lo que en última instancia contribuye al desarrollo de la bioprospección de productos naturales en el país.

Palabras claves: Jugo de caña de azúcar, valoración, extracción en fase sólida por intercambio iónico, UPLC-ELSD.



## 1.1 ABSTRACT

Today the sugar agricultural sector has a high impact on the Colombian economy, influencing positively and directly in the gross domestic product (GDP). During the manufacture of sugar waste is generated such as leaves, bagasse and molasses. However, there are many other components present in the matrix or cane juice which are discarded because they become interference during the extraction and purification process. Among these components are the organic acids, such as glycolic acid, malic acid, citric acid and aconitic acid (AA), the latter being located in the highest concentration. Organic acids have been used in cosmetic and dermatological formulations for chemical peeling effect in acting as exfoliants and therefore increasing the permeability of the skin for that reason the AA may be used in this industry. Now, in order to identify and assess the trans aconitic acid (TAA) in sugarcane juice at different stages of the production process and with the aim of establishing a method for valuing a naturally occurring molecule in the process discarded extraction and purification of sugar, the project was established by solid phase extraction and ion exchange method for sample treatment and chromatographic parameters were determined by chromatography optimal ultra-high resolution and evaporative light scattering detection (UPLC-ELSD) for the assessment of the TAA. Thus TAA concentration was evaluated in five stages of the sugar extraction process was determined and a higher percentage of the acid in the dilute juice, with a value of 135.12 g / L. Finally, the results of this project are encouraging about the opportunity to generate new cosmetic products that incorporate components as currently aconitic acid waste, which ultimately contributes to the development of bioprospecting of natural products in the country.

## 2. INTRODUCCIÓN

En 1510 se inició en Colombia el cultivo de la caña de azúcar en tierras de Santa María La Antigua del Darién. En 1533 Pedro de Heredia, fundador de Cartagena, la introdujo la caña en la Costa Atlántica, y posteriormente en 1541 Sebastián de Belalcazar, fundador de Santiago de Cali, la plantó en el Valle del Cauca (Procaña, asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar).

Desde entonces, la caña de azúcar ha sido la fuente de obtención de mieles y azúcar como producto de consumo. Para 1930 sólo había tres ingenios en el Valle del Cauca: Manuelita, Providencia y Ríopaila. Actualmente, el sector azucarero es uno de los más importantes en Colombia, para el mes de febrero de 2012 fueron molidas en los ingenios azucareros 1.973.654 TON de caña de azúcar, lo que representó un aumento de 17,09% frente al mes anterior y de 4,21% frente a febrero de 2011. Bajo este escenario, la producción de azúcar durante el mismo mes fue de 203.720 Toneladas Métricas de Volumen Crudo (TMVC), lo que representó un aumento de 29,35% frente al mes anterior y de 6,07% frente a febrero de 2011 donde se produjeron 192.055 TMVC (Asocaña, sector azucarero Colombiano, 2012). En este sentido, la producción de caña de azúcar en el país ha aumentado desde entonces hasta llegar a ser el séptimo productor mundial con 430.000 ha de plantación. (Proexport, 2012).

Colombia es un país con una muy alta biodiversidad y por tanto la cantidad de fauna y flora representa una amplia variedad de metabolitos secundarios que podrían ser de interés para diferentes industrias. Sin embargo, se presenta un problema: si se identifica una planta que contenga un metabolito de interés, en el momento realizar un escalonamiento a nivel industrial se tendrían que hacer uso de herramientas y/o tecnologías para efectuar una producción en masa de la planta y obtener una cantidad considerable del metabolito. Una de las ventajas claras en el aprovechamiento de un desecho agrícola cuyo cultivo está altamente extendido en el país, es la posibilidad de soportar el escalamiento industrial que resulta siendo no solo ambientalmente correcto sino económicamente sostenible.

Los alfa-hidroxiácidos (AHA), dentro de los cuales se encuentra el AA, han sido utilizados en la realización de formulaciones tanto cosméticas como dermatológicas, por su efecto sobre permeabilidad de la piel (Copoví, Díez-Sales, Herráez-Domínguez, & Herráez-Domínguez, 2006), (MARGARET E. K.

KRAELING and ROBERT L. BRONAUGH, 1997). Se ha demostrado que el uso repetido de las formulaciones que contienen AHA altera la estructura de la capa córnea (Leyden y col., 1995), la epidermis viable y dermis (Lavker et al., 1992), y puede resultar en alteraciones en la barrera de la piel que podrían causar cambios en la absorción percutánea de los productos químicos aplicados tópicamente. Por tal motivo, han sido reconocidos como importantes elementos terapéuticos complementarios en el tratamiento del foto envejecimiento, el daño actínico, el melasma, la hiperpigmentación y el acné (Copoví, Díez-Sales, Herráez-Domínguez, & Herráez-Domínguez, 2006).

### 3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA QUE EL TRABAJO TIENE EN EL CAMPO PROFESIONAL.

La industria del azúcar en todo el mundo con frecuencia se enfrenta a fluctuaciones en el precio del azúcar lo cual hace a este sector vulnerable. La posibilidad de aumentar la rentabilidad mediante la diversificación de los productos tradicionales obtenidos a partir de la caña de azúcar es sin duda el mejor camino para asegurar el crecimiento económico de las empresas de este sector. El auge del etanol en el mundo ha traído un nuevo aire a la industria azucarera, y se ha visto reflejado en la evolución positiva del precio internacional del azúcar en los últimos años.

En el proceso de obtención del azúcar, la extracción del jugo se realiza por medio de un tándem de molinos generando un jugo ácido y turbio. Posteriormente se realiza un proceso de clarificación diseñado para remover impurezas, el cual emplea cal y calor. A continuación, se agrega al jugo lechada de cal para neutralizar la acidez que presenta, formando sales insolubles de calcio. Consecutivamente, se realiza calentamiento del jugo alcalinizado obteniendo un precipitado por sedimentación de albumina, grasas, gomas y ceras. Esto es filtrado y el jugo clarificado sigue el proceso de transformación, mientras que los residuos obtenidos son desechados o utilizados como fertilizantes (Chen, 2006).

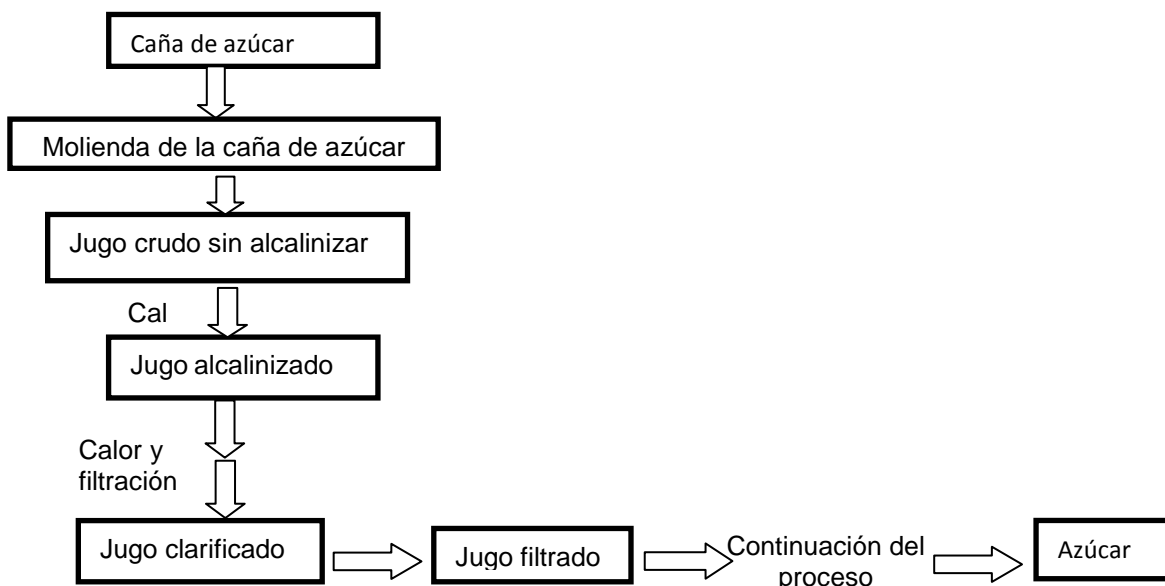


Gráfico 1: Composición del jugo de azúcar.

Fuente: Cenicaña

Como se muestra en el gráfico 1 el jugo de caña sin alcalinizar presenta un porcentaje entre el 1 – 3% de ácidos orgánicos, dentro de los cuales se encuentra el TAA, el cual es de gran importancia para industrias como la cosmética (MARGARET E. K. KRAELING and ROBERT L. BRONAUGH, 1997), (Copoví, Díez-Sales, Herráez-Domínguez, & Herráez-Domínguez, 2006), (Rosa María Coro-Antich, 2000); la farmacéutica (Jesper Larsena, 2009), la textil (Yang, 1996), la plástica (Earl W Gluesenkamp, 1959), entre otras. Sin embargo, uno de los sectores que tiene mayor impacto y crecimiento económico en el país es el sector cosmético. Según el *Conpes 3678*, para que Colombia sea un país que logre competir con la industria mundial debe incorporarse y desarrollarse en sectores altamente competitivos, con productos innovadores y de alto valor agregado. De este modo, el sector cosmético hace parte del Programa de Transformación Productiva (PTP), donde por medio de Ingredientes Naturales se busca un crecimiento económico (República de Colombia, 2010). Por esta razón, se busca realizar la valoración de este ácido para una posible incorporación en esta industria, teniendo en cuenta que la valoración realizada es un primer acercamiento a esta posibilidad. Aunque cabe resaltar que la metodología a implementar podría ser útil en todas las industrias siempre y cuando la materia prima sea la misma (jugos de caña de azúcar).

En relación con el trabajo, se plantea la oportunidad de industrializar el proceso de obtención de TAA en jugos de caña de azúcar, con el fin de aumentar el portafolio de productos del sector azucarero del departamento, debido a que éste, a pesar de que presenta otros productos y/o servicios adicionales al azúcar como lo son el papel, el etanol, energía, abono, etc. no está obteniendo un crecimiento económico marcado, llegando a un punto en donde el progreso sólo se generará aumentando la extensión de las plantaciones de caña o incluso incursionando en otros sectores agrícolas como el cultivo de frutas y hortalizas o sectores primarios como la pesca. Esta estrategia la vienen implementando algunos grupos económicos donde están incluidos los ingenios azucareros. Por tal motivo, se busca el aprovechamiento del TAA que es descartado durante el proceso de extracción y purificación del azúcar. Por tanto, la estandarización de la metodología tiene como fin poder obtener una recuperación máxima del TAA presente en el jugo sin intervenir en el proceso de extracción de azúcar de caña.

La bioprospección como herramienta para proporcionar materias primas nacionales con valor agregado, constituye una oportunidad para mejorar la competitividad de tanto del sector azucarero del valle como de la industria colombiana en los renglones económicos asociados con el sector farmacéutico y cosmético. Es importante que el país aumente su competitividad en los sectores derivados del uso de la biodiversidad que siguen una tendencia fuerte al crecimiento a nivel mundial. Por ejemplo, el comercio de productos derivados de fuentes naturales incrementó un 173% entre 2002 y 2008 (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, 2012).

#### 4. DELIMITACIÓN (ALCANCE Y LÍMITES)

Se busca implementar una metodología que permita la valoración del TAA, para lo cual se realizará un tratamiento de muestra por extracción en fase sólida, utilizando cartuchos que permitan una interacción por fuerzas electrostáticas entre el analito y la resina de intercambio iónico. Esta meta se tratará de alcanzar implementando numerosos experimentos a diferentes pH, para así determinar en cuál se presenta una mejor interacción y por tanto una mejor purificación.

Igualmente se pretende establecer las mejores condiciones tanto para el tratamiento de la muestra, utilizando extracción por fase sólida, como para la determinación del TAA por UPLC-ELSD, obteniendo de este modo un análisis en tiempos más cortos que los empleados con un cromatógrafo de alta eficiencia (HPLC), mejor resolución de los cromatogramas, mejor sensibilidad, entre otras ventajas que ofrece esta tecnología (Swartz, 2005). Adicionalmente, el uso del ELSD garantiza la detección del TAA, una molécula que presenta una absorptividad molar muy baja y cuyas características fisicoquímicas no permite su identificación por métodos convencionales como los detectores ultravioleta.

El presente trabajo tiene un alcance exclusivo a escala de laboratorio, por lo tanto, los volúmenes empleados serán los suficientes para la estandarización de la metodología y una determinación inicial de la concentración del TAA en los jugos analizados. La factibilidad en el proceso de industrialización y escalonamiento en cuanto a espacio, costos y reproducibilidad no es tomado en cuenta en los objetivos establecidos, estos son factores que podrían ser evaluados en trabajos posteriores.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 LA CAÑA DE AZÚCAR EN COLOMBIA

La caña de azúcar (*Saccharum Officinarium*) es uno de los cultivos más antiguos en el mundo, se cree que empezó hace unos 3.000 años como un tipo de césped en la isla de Nueva Guinea y de allí se extendió a Borneo, Sumatra e India. En 1493 Cristóbal Colón llegó por segunda vez a América y trajo consigo la caña, pero fue sólo en 1501 cuando se introdujeron las primeras plantas que lograron crecer en estos suelos (Procaña, asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar).

En 1510 se inició en Colombia el cultivo de la caña de azúcar en tierras de Santa María La Antigua del Darién. En 1533 Pedro de Heredia, fundador de Cartagena, la introdujo la caña en la Costa Atlántica, y posteriormente en 1541 Sebastián de Belalcazar, fundador de Santiago de Cali, la plantó en el Valle del Cauca (Procaña, asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar).

Desde entonces, la caña de azúcar ha sido la fuente de obtención de mieles, panela y azúcar como producto de consumo. Para 1930 sólo había tres ingenios en el Valle del Cauca: Manuelita, Providencia y Ríopaila; desde esos años la industria azucarera empezó a expandirse en la región hasta completar 22 ingenios (Asocaña, sector azucarero Colombiano). En la actualidad son 11 ingenios azucareros a lo largo del valle geográfico del río Cauca.

Actualmente, el sector azucarero es uno de los más importantes en Colombia y representó para el 2011 una producción de 22.728.758 toneladas (TON) de caña molida, de las cuales se produjeron 2.339.988 toneladas métricas en su equivalente a volumen de azúcar crudo (TMVC) de azúcar y a partir de ésta, 942.035 TMVC fueron exportados. Se importaron 188.147 TMVC de azúcar, por tanto, el consumo nacional aparente, cantidad de producto que se dispone para consumo del país fue de 1.593.871 TMVC (Asocaña, sector azucarero Colombiano, 2012)

Durante el mes de febrero de 2012 fueron molidas en los ingenios azucareros 1.973.654 TON de caña de azúcar, lo que representó un aumento de 17,09% frente al mes anterior y de 4,21% frente a febrero de 2011. Bajo este escenario, la



producción de azúcar durante el mismo mes fue de 203.720 TMVC, lo que representó un aumento de 29,35% frente al mes anterior y de 6,07% frente a febrero de 2011 donde se produjeron 192.055 TMVC (Asocaña, sector azucarero Colombiano, 2012)

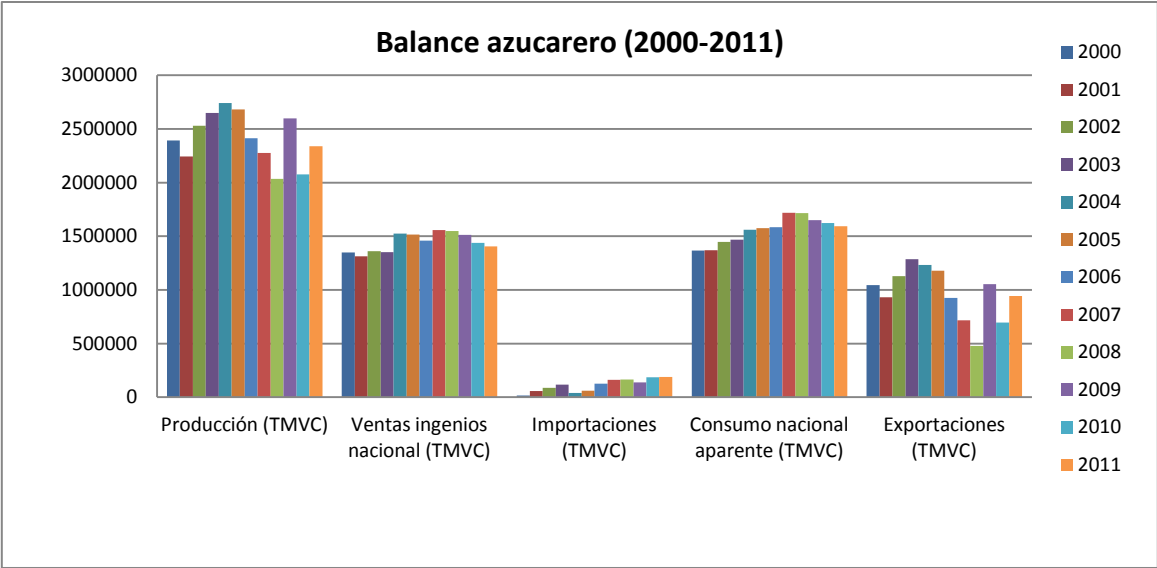


Gráfico 2: Balance azucarero entre los años 2000-2011

Fuente de datos: Asocaña.

La cantidad de área neta sembrada de caña de azúcar y de área cosechada con destino a la producción de azúcar en Colombia en el 2010 fue de 219.309 y 172.421 hectáreas respectivamente. Esta estadística no incluye callejones ni vías internas, la información corresponde a los ingenios localizados en el valle geográfico del río Cauca, que hasta 2008 procesaban el 99,7% del total de la caña de azúcar del país, y a partir del 2009 el 100% (Asocaña, sector azucarero Colombiano, 2012).

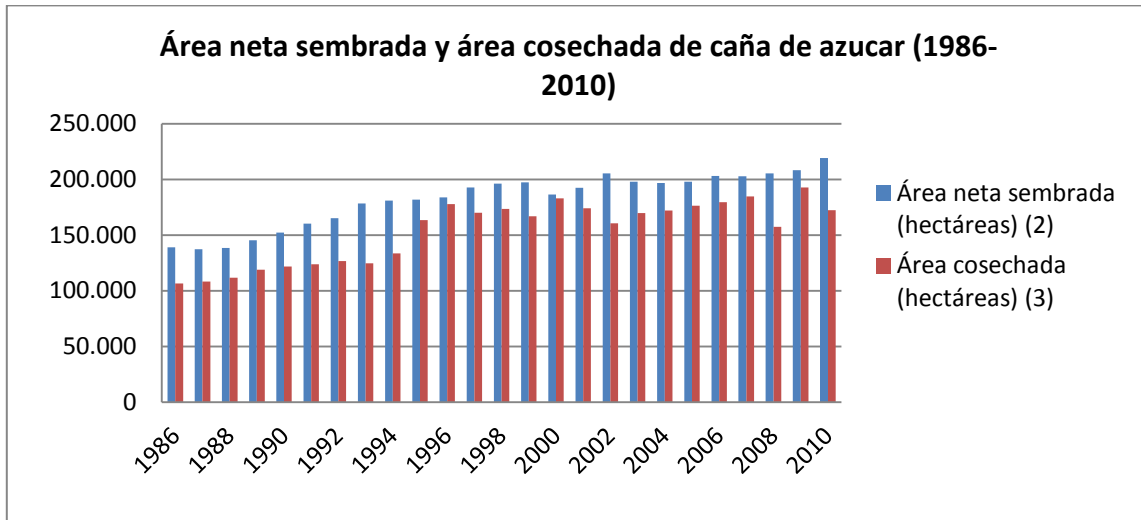


Gráfico 3: Hectáreas de caña de azúcar sembradas y cosechadas en el periodo de 1986-2010.

Fuente de datos: Asocaña.

En cuanto a las exportaciones del mes de febrero de 2012 se registraron en 73.018 TMVC, lo que representó un aumento de 67,58% frente al mes anterior y de 20,22% respecto a febrero de 2011 donde se produjeron 60.735 TMVC. El volumen de exportaciones de azúcar durante lo corrido del año fue de 116.588 TMVC, lo que representó un aumento de 2,4% frente al mismo periodo de 2011 (Asocaña, sector azucarero Colombiano, 2012)

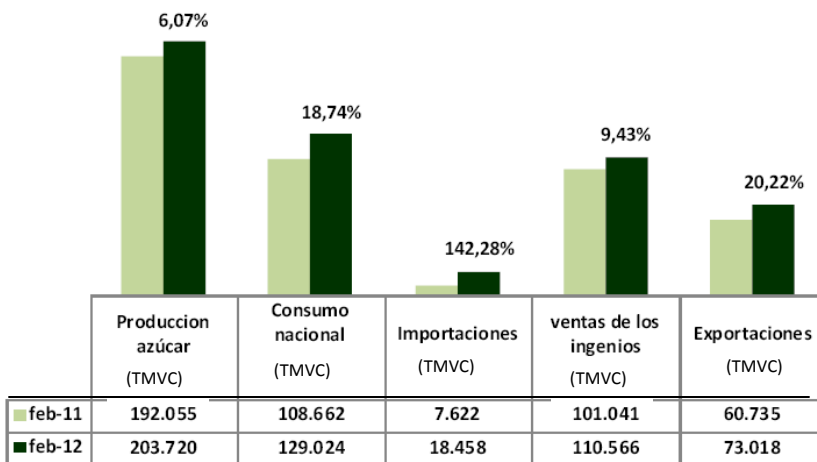


Gráfico 4: Comparación del balance azucarero entre febrero 2011 y febrero 2012.

Fuente: Asocaña.

La Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia, Asocaña, es una entidad gremial sin ánimo de lucro, cuya misión es representar al sector azucarero colombiano y promover su evolución y desarrollo sostenible. Esta entidad plantea una estrategia para incrementar la eficiencia del sector, teniendo como factor fundamental la sostenibilidad (Asocaña, sector azucarero Colombiano).

La sostenibilidad consiste en “satisfacer las necesidades de la actual generación sin sacrificar la capacidad de las futuras generaciones de satisfacer sus propias necesidades”. Para lo cual se debe mantener un equilibrio entre el desarrollo económico, el cual garantiza una variabilidad financiera y rentabilidad en la actividad, esto implica contar con procesos eficientes, productivos, reducir pérdidas y aprovechar al máximo los recursos; así mismo la incorporación de nuevos productos y nuevos mercados. El desarrollo social, teniendo en cuenta que el desarrollo y evolución de la empresa se debe en gran medida a las personas que la integran y a la labor que realizan. Y el desarrollo amigable con el medio ambiente, se debe buscar y promover la conservación de la biodiversidad y de los ecosistemas (IDEM 734, 2011).

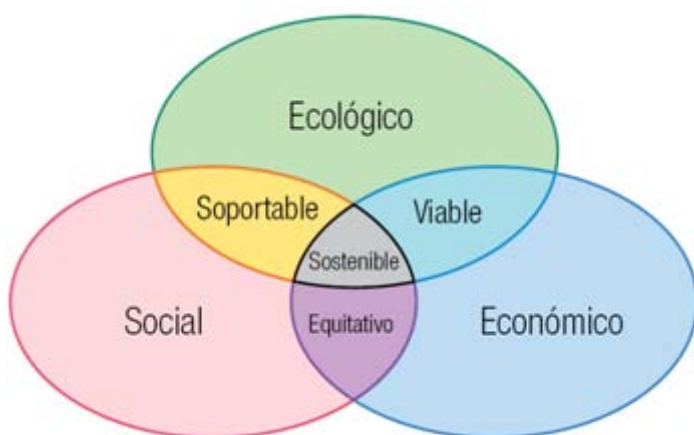


Gráfico 5: Modelo de sostenibilidad

Fuente: Asocaña

Según la FAO, los cultivadores de caña en Colombia tienen la mayor productividad (122,47 TON/ha) entre los principales productores de caña de azúcar, superando a Brasil (79,2 TON/ha), India (68,7 TON/ha) y China (71,2 TON/ha). De igual forma es el más eficiente productor de azúcar con una tasa de 14,6 ton/ha, seguido por Australia con 11,5 TON/ha y Brasil con 9,5 ton/ha. Finalmente Colombia tiene una de las mayores productividades de etanol con 9.000 Lt/ha/año, superando a Brasil

y Ecuador en un 50% y 55% respectivamente. Adicionalmente, Colombia se encuentra en el puesto 22 entre 223 países en donde se evalúa el potencial de expansión del área agrícola sin afectar el área de bosque natural. Este potencial de crecimiento se estima en 12,7 millones de hectáreas. (Proexport, 2012).

## 5.2 CAÑA DE AZÚCAR.

La caña de azúcar es una gramínea tropical, con el tallo leñoso, de aproximadamente dos metros de altura, hojas largas, lampiñas y flores purpúreas en panoja piramidal. El tallo está compuesto por un tejido esponjoso y dulce del que se extrae el azúcar (Procaña, asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar).

La caña de azúcar puede ser cultivada en todas las regiones tropicales y subtropicales. En Colombia se cultiva en forma productiva desde el nivel del mar hasta alturas superiores a los 2.000 metros en las más variadas condiciones de temperatura, luminosidad, precipitación y calidad de suelos (Procaña, asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar). El 70% de la caña de azúcar que se cultiva actualmente en Colombia es una especie que es un híbrido complejo de dos o más de las cinco especies desarrollada en el país, conocida como la cc8592.

## 5.3 PROCESO PRODUCTIVO DEL AZÚCAR.

El proceso descrito a continuación pertenece a Manuelita S.A., una empresa del Grupo Manuelita dedicada desde 1864 a la producción de azúcar de alta calidad y derivados de valor agregado que se comercializan en los sectores alimenticios, químico y farmacéutico. (Grupo Manuelita)

Etapas del proceso de producción de azúcar:

1. Recepción de caña: La caña que llega a la fábrica es pesada en básculas y descargada sobre mesas de alimentación al conductor de caña con grúas tipo hilo. Posteriormente, se somete a un proceso de preparación, en donde se rompe o desfibra las celdas de los tallos utilizando picadoras y desfibradoras. Una vez terminado este proceso, es llevada a través de bandas transportadoras al tándem de molinos (Grupo Manuelita).

2. Molienda: En el tándem de molinos se realiza el proceso de extracción de la sacarosa, el cual consiste en exprimir y lavar el bagazo. El lavado se realiza utilizando el jugo extraído del molino siguiente, el lavado del último molino se realiza con agua caliente, lo que facilita la desinfección y extracción de la sacarosa en el bagazo (Grupo Manuelita).

“El bagazo del último molino es utilizado como combustible en las calderas para generar vapor o como materia prima en la elaboración de papel” (Grupo Manuelita).

El jugo extraído en los molinos es pesado y llevado a tanques de alcalinización para regular el pH del mismo (Grupo Manuelita), este proceso se realiza utilizando cal, alrededor de 0.5kg por tonelada de caña, así se neutraliza la acidez del jugo, formando sales insolubles de calcio, principalmente fosfato de calcio (Chen, 2006).

3. Clarificación: El jugo una vez alcalinizado se bombea hacia calentadores, donde se eleva la temperatura hasta un nivel cercano al punto de ebullición (Grupo Manuelita), este proceso coagula la albúmina y algunas grasas, ceras y gomas; así, el precipitado formado atrapa sólidos en suspensión y partículas finas (Chen, 2006). Posteriormente, los jugos se pasan a clarificadores continuos donde se sedimentan las impurezas, el jugo claro es extraído por la parte superior (Grupo Manuelita).

Las impurezas sedimentadas pasan a filtros rotatorios al vacío, los cuales filtran el jugo y retienen la cachaza (utilizada como abono en la plantación) por medio de finas mayas metálicas (Grupo Manuelita).

4. Evaporación y cristalización: Durante la evaporación del jugo clarificado se extrae hasta el 80% del agua hasta obtener un jarabe (Grupo Manuelita).

La cristalización de la sacarosa se realiza en tachos al vacío, un equipo donde el jarabe se evapora hasta quedar saturado de azúcar (Chen, 2006), en éstos se introduce polvillo de azúcar molido para controlar y acelerar el proceso de cristalización, obteniendo como resultado una mezcla de cristales de sacarosa y miel. Para realizar la separación de estos cristales se realiza centrifugación. Las mieles obtenidas se vuelven a cristalizar para ser agotadas y finalmente son utilizadas como materia prima en la producción de alcohol etílico (Grupo Manuelita).

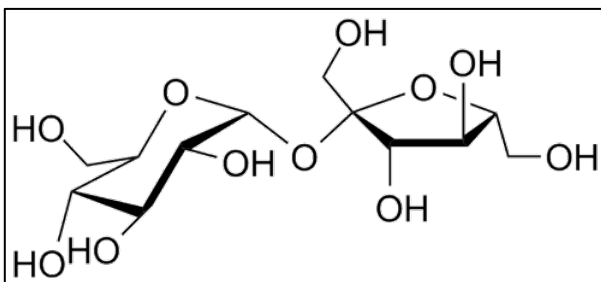
Los cristales de azúcar retenidos en las mallas de las centrifugas son disueltos con agua caliente, este jarabe recibe el nombre de licor, el cual es enviado a la refinería (Grupo Manuelita).

5. Refinería: El licor es clarificado por flotación (Grupo Manuelita), en este proceso se añade al jarabe cal y ácido fosfórico, y luego se aérea junto con la adición de un polímero floculante, poliacrilamida. El jarabe floculado pasa a un clarificador (Chen, 2006). Posteriormente el jarabe es decolorado en cisternas que contienen carbón orgánico granulado, el cual remueve por adsorción los compuestos coloreados. El licor decolorado es filtrado a presión para obtener un licor fino (Grupo Manuelita).
6. Cristalización y secado: El licor fino es cristalizado y centrifugado para separar las posibles mieles. Al azúcar refinado se le realiza un lavado con vapor y agua caliente y se seca con aire. Posteriormente se realiza una clasificación según el tamaño del cristal y se almacena en silos para su posterior empaque (Grupo Manuelita).

## SACAROSA

La sacarosa,  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranosa, es el disacárido más abundante; se encuentre en las frutas y, comercialmente, es obtenida a partir de la caña de azúcar o de la remolacha. Está formada por una unión  $\alpha$ -D-glucosa y una  $\beta$ -D-fructosa a través de un enlace (1-2). (Gómez, 2011)

En la sacarosa, el enlace glicosídico  $\alpha$ (1-2) está formado por la unión de los carbonos anoméricos de cada monosacárido, por lo tanto, la sacarosa es un azúcar no reductor. (Gómez, 2011)



Estructura de la Sacarosa

## 5.4 ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos representan un porcentaje significativo de los compuestos no- azúcares solubles en la caña de azúcar; son responsables en mayor medida de la acidez valorable del jugo de la caña (Zapata, 2007).

El pH en el jugo de una planta madura puede variar entre 4,73 y 5,63, sin embargo el valor comúnmente encontrado oscila entre 5,2 y 5,4. El valor de pH en los jugos es considerado como un indicador indirecto de calidad, si este se encuentra muy por debajo, posiblemente la caña utilizada estaba dañada (Clarke, 2006)

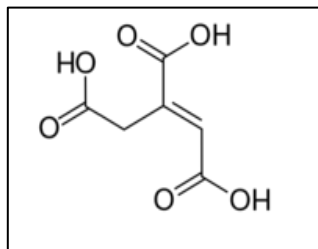
Los ácidos orgánicos se encuentran de forma natural en la planta ya que tienen un papel importante en procesos metabólicos. El TAA, ácido oxálico y ácido cítrico son productos secundarios en el ciclo de Krebs. De ellos, el TAA representa un promedio de 1,54% de los sólidos del jugo, así, presenta una concentración 3 veces mayor que otros ácidos presentes en el jugo como ácido cítrico, oxálico, glicólico, mesacónico, tartárico, succínico, fumárico y siríngico. Por lo que tiene un mayor interés comercial (Clarke, 2006).

La temperatura debe ser un parámetro a tener en cuenta durante la extracción de los ácidos orgánicos, debido a que la solubilidad de éstos y sus sales alcalinas aumenta a medida que aumenta la temperatura, y es mayor en soluciones de sacarosa que en agua (Zapata, 2007).

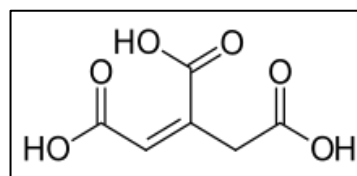
Durante la fabricación del azúcar, el jugo de caña ácido debe ser alcalinizado para la continuación del proceso, esto se debe a que los ácidos orgánicos afectan el proceso de clarificación. Estos ácidos compiten por la cal con ácido fosfórico, y debido a su capacidad tampón aumentan la cantidad de cal requerida para realizar el proceso. Adicionalmente, los ácidos son capaces de participar en reacciones complejas con azúcares y otros componentes orgánicos del jugo, por lo que están asociados con la formación de compuestos melasigénicos durante la elaboración de azúcar, estos compuestos disminuyen la productividad del proceso de obtención del azúcar pues se hace referencia a que se genera una mayor cantidad de mieles que de cristales. Los ácidos oxálico y aconítico se han asociado con la formación de incrustaciones en los calentadores y evaporadores (Zapata, 2007).

a. Ácido aconítico

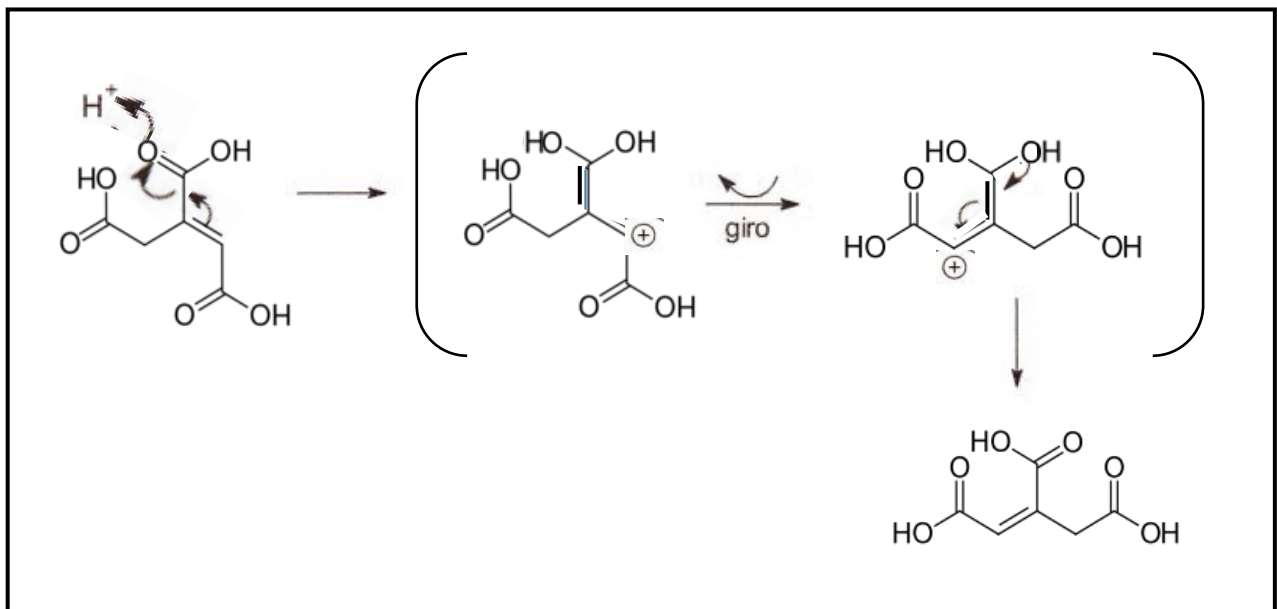
TAA, ( $C_6H_6O_6$ ), MW 174g/mol, es un ácido alifático tribásico insaturado el cual existe en dos formas geométricas distintas, el isómero trans y el isómero cis. Su apariencia es de cristales blancos o amarillentos, con un punto de fusión de  $195^{\circ}C$ . Su solubilidad en agua incrementa de 18.6 g/100 mL a  $13^{\circ}C$  hasta 110.7 g/100 mL a  $90^{\circ}C$ ; también es soluble en alcohol (Zapata, 2007).



Ácido trans-aconítico



Ácido cis-aconítico



Mecanismo de isomerización trans-cis



El isómero cis-aconítico es utilizado durante el ciclo de Krebs en la planta, por lo que la concentración de éste en la caña de azúcar es bajo, por el contrario, el isómero trans-aconítico se encuentra disponible en la planta ya que se acumula. La cinética de isomerización de trans a cis fue estudiada por Walford (1998), llegando a la conclusión que esta es más factible que se produzca a altas temperaturas entre 70°C – 90°C y a pH ácidos, por el contrario, si el medio presenta cationes divalentes como calcio o magnesio, decrece la tasa de isomerización y la descarboxilación del trans-aconítico a ácido itacónico (Zapata, 2007).

## 5.5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA POR INTERCAMBIO IÓNICO

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de tratamiento de muestra que permite la concentración y purificación de analitos en solución por adsorción de éstos en una fase sólida. (Camel, 2003). El principio básico consiste en hacer pasar una muestra líquida a través de un cartucho que contiene una resina de intercambio iónico, la cual retiene los analitos cargados. Después, se realizan diferentes lavados para eliminar compuestos que no son de interés y posteriormente recuperar el analito retenido realizando una elución con un disolvente apropiado. En la SPE los analitos a extraer deben tener una mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (Berrueta, Gallo, & Vicente, 1995).

Un método SPE siempre se compone de cuatro etapas sucesivas, como se ilustra en el gráfico 6. En primer lugar, se debe acondicionar el cartucho utilizando un solvente apropiado. Este paso es crucial, ya que permite la humectación del material de empaque y la solvatación y organización de los grupos funcionales, además, elimina las posibles impurezas inicialmente contenidas en el cartucho. Adicionalmente, este paso quita el aire presente en la columna y el volumen vacío se llena con disolvente. La naturaleza del disolvente de acondicionamiento depende de la naturaleza de la resina del cartucho. Se debe tener cuidado de no permitir que el cartucho se seque entre el acondicionamiento y las etapas de tratamiento de muestra, de lo contrario los analitos no serán eficazmente retenidos y las recuperaciones serán pobres. Si el cartucho se seca por varios minutos, debe ser reacondicionado (Camel, 2003).

El segundo paso es la carga de la muestra. La muestra puede ser aplicada a la columna por gravedad, bombeo, aspiración por vacío o por un sistema automatizado. El flujo de la muestra a través del cartucho debe ser lo suficientemente bajo para permitir una retención eficiente de los analitos, y lo suficientemente alto como para evitar excesiva duración. Durante este paso, los analitos se concentran en el cartucho (Camel, 2003).

El tercer paso es el lavado del cartucho con un solvente apropiado, éste debe tener una resistencia baja de elución, para eliminar los componentes que no son de interés de la matriz sin desplazar el analito de interés. Posterior a esto, se puede realizar una etapa de secado, especialmente para las matrices acuosas, de este modo se eliminan trazas de agua del cartucho y por tanto en la fracción de elución (Camel, 2003).

El paso final consiste en la elución de los analitos de interés, lo cual se consigue utilizando un solvente apropiado. El volumen de solvente debe ajustarse de modo que la recuperación cuantitativa de los analitos se consiga con la menor cantidad posible. Además, la tasa de flujo debe ser ajustada correctamente para asegurar una elución eficiente, de este modo el solvente debe tener un contacto adecuado con el cartucho para poder extraer los analitos de interés del mismo. Así, la tasa de flujo no debe ser muy rápida.

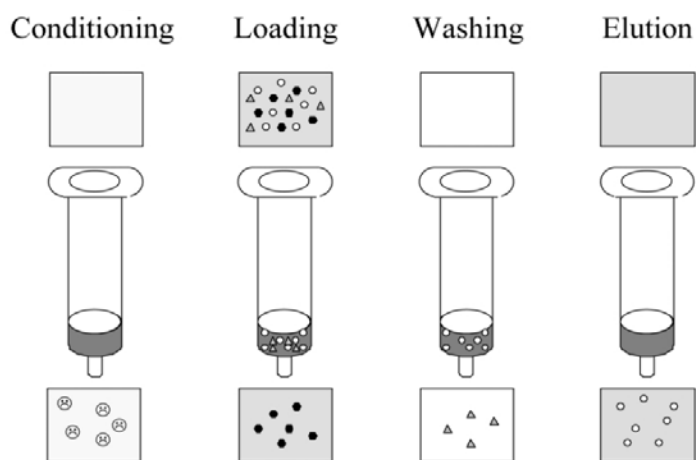


Gráfico 6. Fases de la extracción en fase sólida

Fuente: V. Camel / Spectrochimica Acta Part B 58 (2003) 1177–1233.

De acuerdo con el carácter químico del grupo funcional unido químicamente a la sílice o el copolímero del cartucho, las fases sólidas se clasifican como intercambiadoras no-polar, polares, o de intercambio iónico (Berrueta, Gallo, & Vicente, 1995).

En la SPE de intercambio iónico, se utilizan resinas que contienen grupos funcionales catiónicos o aniónicos que son capaces de retener el analito cargado por fuerzas electrostáticas. Pueden haber resinas con grupos funcionales fuertes o débiles, referentes al hecho de que los grupos fuertes son siempre sitios de intercambio iónico en cualquier pH, mientras que los grupos débiles podrán realizar intercambio iónico a valores de pH mayores o menor que el pKa. Algunos ejemplos de estos grupos funcionales pueden ser: grupos fuertes, son grupos de ácido sulfónico (de intercambio catiónico) y aminas cuaternarias (intercambio de aniones), mientras que los grupos funcionales débiles consisten en grupos ácido carboxílico (de intercambio catiónico) o aminas primarias, secundarias y terciarias (intercambio aniónico) (Camel, 2003).

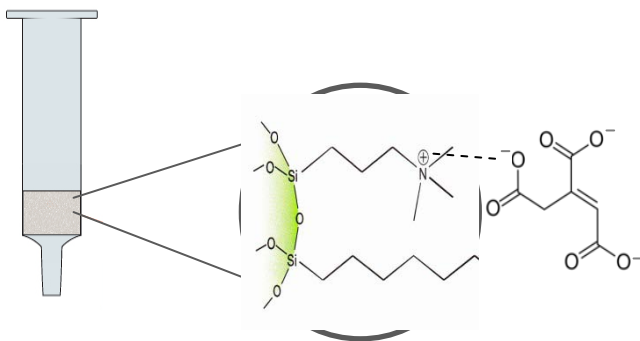


Gráfico 7: Interacción entre el cartucho de SPE y el TAA.

## 5.6 ANTECEDENTES

Regna y Bruins (1956) extrajeron TAA pasando a través de columnas que contenían Amberlite 1R-4B, un intercambiador débil, muestras de melaza diluidas. La resina saturada se eluyó con ácido sulfúrico obteniendo tres fracciones diferentes; en la primera, se obtuvo una fracción de color que contenía una poca cantidad de TAA, en la segunda, se obtuvo una fracción con un alto contenido de ácido, y en la tercera y última fracción, se obtuvo igualmente, una poca cantidad de TAA. La fracción rica en TAA se concentró bajo vacío y después se centrifugó.

El TAA de la primera fracción se diluyó a 20%, posteriormente se trató con bentonita para eliminar algunos cuerpos de color. La solución clarificada fue bombeada a través de un lecho de resina decolorante y se concentró mediante vacío. Finalmente, la suspensión producida se centrifugó, y el TAA obtenido se secó. Se obtuvieron cerca de 64 Kg TAA por metro cúbico de resina. Sin embargo, los autores no realizaron un proceso de recuperación y rendimiento, pero estiman que éste fue de aproximadamente de 97%.

Hanine et al. (1992) combinó intercambio iónico y tecnología de precipitación para realizar la recuperación de TAA del jugo de la caña de azúcar. Para esto, realizó una desmineralización de un jarabe de azúcar de caña diluido a 30°Bx utilizando una resina absorbente de poliestireno, gel de tipo estireno-DVD, resina de copolímero catiónico fuertemente ácida, y finalmente por resina de poliestireno de forma aniónica hidroxilo. Se produjo un efluente de regeneración muy contaminado. La recuperación de TAA originó una reducción de la contaminación causada por dichos efluentes y proporcionó una materia prima útil para la industria química. El eluato de regeneración de resinas aniónicas se concentró para aumentar su contenido de TAA a 3,4%, y el ácido se precipitó como aconitato tricálcico, con un rendimiento del 92%. El efecto del pH demostró que a pH 7 como anteriormente se menciona se obtiene la máxima recuperación, sin embargo, al aumentar el pH a 13, en donde el TAA es casi 100 ionizado, la eficiencia de la recuperación era de 68%, debido a la probable formación de cal y la presencia de inhibidores de la cristalización.

## 5.7 UPLC-ELSD

La Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) aprovecha avances tecnológicos realizados en la química de partículas, optimización del rendimiento del sistema, diseño de detectores, y en el procesamiento de datos y control. Utiliza partículas inferiores de 2 micras, fases móviles a altas velocidades lineales e instrumentación que funciona a presiones mayores que las utilizadas en HPLC. Una de las grandes ventajas de esta tecnología mejora la resolución, sensibilidad y velocidad del análisis. (Swartz, 2005). Esta nueva categoría de ciencia de separación analítica conserva la viabilidad y principios de HPLC. (Swartz, 2005).

Un detector de luz por evaporación (ELSD) nebuliza el solvente del UPLC para eliminar la fase móvil y se mide la radiación dispersada de un haz de láser por la corriente de partículas de todos los analitos no volátiles. Su gran ventaja en comparación con la detección de índice de refracción (RI) son la mayor sensibilidad y compatibilidad con gradiente de elución. El ELSD se utiliza para analitos de baja absorbancia en UV, GPC, y tamizaje de alto rendimiento de bibliotecas combinatorias. (Dong, 2006)

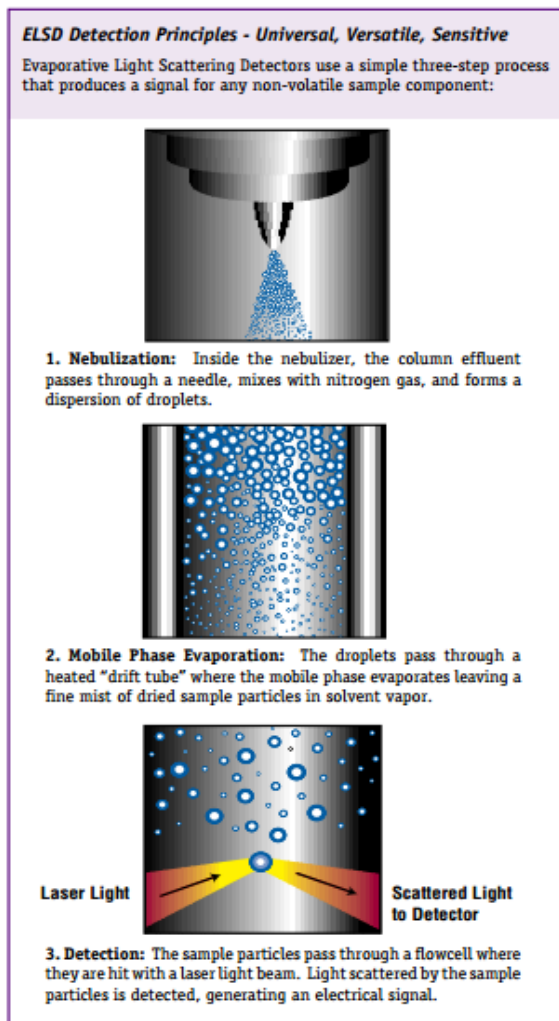


Gráfico 8: Pasos del ELSD

Fuente: Improving HPLC Performance with Alltech's Evaporative Light Scattering Detector (ELSD), Alltech

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar y estandarizar una metodología de tratamiento de muestra por extracción en fase sólida (SPE) que permita la valoración del TAA en jugo de caña de azúcar en diferentes etapas del proceso de producción del azúcar.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Establecer un método de tratamiento de muestra a través de la extracción en fase sólida por intercambio iónico.
2. Establecer parámetros cromatográficos óptimos para la valoración del TAA.
3. Valorar el contenido de TAA en jugos de caña de azúcar.

## 7. METODOLOGÍA

Se implementó una metodología que permite un tratamiento de la muestra rápida, usando extracción en fase sólida (SPE) de intercambio iónico, seguida de determinación por UPLC-ELSD.

### 7.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR

Se utilizó un estándar de ácido trans aconítico 98% de pureza de Zigma-Aldrich. Para la preparación del estándar, pesar la cantidad de estándar requerida dependiendo de la concentración que se quiera alcanzar, diluir en agua tipo 1.

Ejemplo: Estándar 1000 ppm

- a. Pesar 10 mg del TAA y llevar a 10mL volumétricos de agua tipo 1
- b. Alícuotar en 3 viales, cada uno con 1mL.
- c. Rotular cada vial con stock 1000 ppm 1-3.

### 7.2 TRATAMIENTO DE MUESTRA

Para el tratamiento de la muestra, fueron necesarios cartuchos de SPE de intercambio iónico Phenomenex Screen A, los cuales presentan una resina amino cuaternaria, garantizando de esta manera que a pesar de los cambios del pH del medio la resina se encuentre cargada positivamente.

Tabla 1: pKa del TAA

<b>Compuesto</b>	<b>pKa</b>
TAA	2.8- 4.46- 6.3

### 7.2.1 MONTAJE

Realizar el montaje que se presenta a continuación



### 7.2.2 ACONDICIONAMIENTO DEL CARTUCHO:

- a. Adicionar 1mL de agua tipo 1 (W) al cartucho de SPE, abrir la llave y dejar desplazarla por el cartucho. Cerrar la llave
- b. Adicionar 1mL de Metanol grado HPLC de Merck (MetOH) al cartucho de SPE, abrir la llave y dejar desplazarlo por el cartucho. Cerrar la llave

### 7.2.3 CARGA DEL CARTUCHO:

- a. Garantizar que las muestras se encuentren en un pH aproximado de 8.0, con el fin de que el TAA se encuentre un 99% desprotonado. Posiblemente no se deba ajustar el pH debido a que el pH del agua tipo 1 se encuentra alrededor de este valor.



- b. Si se va a trabajar con muestras de jugo de caña, adicionar 3 mL de muestra. Si se realizará con estándar de TAA, adicionar 1 mL de estándar al cartucho, teniendo en cuenta que la llave se encuentre cerrada.

Al agregar la muestra en todos los cartuchos, abrir las llaves y dejar pasar la muestra por los cartuchos, en este paso puede hacer uso de una pequeña cantidad de vacío para agilizar el proceso, la velocidad de goteo debe ser de 1 gota por segundo, para garantizar que la muestra tiene contacto con la resina. Cierre las llaves del equipo.

#### 7.2.4 LAVADO DEL CARTUCHO:

- a. Agregar 3 mL de una solución 90:10 MetOH/W a los cartuchos, abrir la llave y dejar correr. Cerrar las llaves.

Puede utilizar vacío para agilizar el proceso, realizar este proceso por triplicado.

#### 7.2.5 ELUCIÓN:

- a. Adicionar 1 mL de una solución 20:80 MetOH/W a pH 0,5 en los cartuchos. Utilizar una solución de HCl al 5% para disminuir el pH.

Al agregar la solución en todos los cartuchos, abrir las llaves y dejar pasar la muestra por los cartuchos, en este paso puede hacer uso de una pequeña cantidad de vacío para garantizar que la velocidad de goteo sea de 1 gota por segundo o menor, esto con el fin de protonar el TAA y romper las interacciones electrostáticas que se presentaban entre el ácido y la resina. Cierre las llaves del equipo.

### 7.3 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TAA

Se realizó una cinética de degradación del TAA estándar 500ppm a pH 0.5, 1, 2 y 8, con el fin de evaluar a qué pH debe permanecer la muestra sin que se vea afectada significativamente. La preparación de las muestras se efectuó del siguiente modo:

### 7.3.1 TAA estándar 500ppm pH 2

- a. Pesar 5 mg del TAA en un vial ámbar, reservar hasta que se realice la medición en el UPLC-ELSD.
- b. En un beaker de 25mL, adicionar aproximadamente 20mL de agua tipo 1 y llevar a pH 2, utilizar una solución de HCl 5% para disminuir el pH del agua.
- c. En el momento de realizar el corrido en el equipo, tomar 10mL volumétricos del agua a pH 2 y agregarlos al vial en donde se encuentran los 5 mg de TAA. Mezclar hasta una completa solubilización.
- d. Alicuotar en 3 viales previamente identificados de 1.5 mL, cada uno con 1 mL.
- e. Tomar lecturas cada 10 minutos.

Nota 1: Realizar el mismo procedimiento para los diferentes pH, se debe tener en cuenta que antes de hacer la lectura en el equipo deben estar listos los pasos 7.3.1.1 y 7.3.1.2 de todos los experimentos. Dado que los pasos 7.3.1.3 y 7.3.1.4 se deben efectuar simultáneamente.

Nota 2: Todos los beakers e instrumentos volumétricos utilizados deben ser purgados con agua tipo 1 antes de ser utilizados.

## 7.4 RECUPERACIÓN DEL TAA EN JUGOS DE DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE AZUCAR

Se realizó un experimento para evaluar el rendimiento de los cartuchos y determinar qué cantidad de TAA quedaba en éstos después de realizar todo el tratamiento de la muestra. Para esto, se efectuó la recuperación de TAA estándar 500ppm por triplicado. y cada muestra fue inyectada en el UPLC-ELSD tres veces, teniendo un total de nueve datos.

- a. Pesar 5 mg del TAA y llevar a 10mL volumétricos de agua tipo 1.
- b. Realizar por triplicado todo el procedimiento de tratamiento de la muestra.
- c. El volumen de elución (1mL) verterlo en viales de 1.5 mL.
- d. Rotular cada vial con stock 500 ppm 1-3.
- e. Realizar el corrido inyectando 3 veces por vial.
- f. Realizar una curva de calibración con concentraciones de 100ppm, 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm y 1000ppm.
- g. Interpolan las áreas obtenidas en cada pico de los cromatogramas y determinar la concentración de TAA.

- h. Determinar el porcentaje de recuperación, teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$\%Recuperación = \left( \frac{\text{Concentración obtenida de TAA ppm}}{\text{Concentración teórica de TAA ppm}} \right) \times 100$$

## 7.5 ANÁLISIS POR UPLC-ELSD

Se realizó el análisis del TAA por UPLC-ELSD teniendo en cuenta que el metabolito presenta una baja absorción molar, por lo tanto, su capacidad de absorber radiación ultravioleta (UV) es baja. De este modo, no es factible utilizar como detector un Espectrofotómetro UV o un detector de arreglo de fotodiodos (PDA).

Para la determinación por UPLC-ELSD, se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm.

El método UPLC se estableció de la siguiente forma, como fase móvil se utilizaron dos solventes:

Solvente A: Agua 0,6% ácido fórmico.

Solvente B: ACN 1% ácido fórmico.

Tabla 2: Método UPLC establecido

	Flujo	%A	%B
Inicial	0.500	99.0	1.0
2,50	0.500	99.0	1.0

Tabla 3: Condiciones del ELSD establecidas

Parámetros		
Presión del gas	30.0	psi
Modo del nebulizador	Cooling	-
Gain	200	-
Temperatura del tubo deriva	40.0	°C

## 8 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la estandarización del método, se realizaron diferentes experimentos con el fin de determinar cuáles eran las condiciones y soluciones necesarias para generar los resultados esperados dependiendo del objetivo de cada etapa del tratamiento de la muestra. En primer lugar, se analizó la etapa de acondicionamiento de cartucho, para esta, se buscaba que las cadenas alifáticas con grupos amino cuaternarios que conforman la resina del cartucho se alinearan para generar un mayor área de contacto entre el TAA y la resina. Adicionalmente se busca preparar el cartucho para la carga de la muestra. Para esta etapa se utiliza como acondicionador el solvente en el cual se encontrará la muestra o aquel que será utilizado en mayor proporción durante la SPE. Para este caso en concreto, los solventes utilizados fueron agua y metanol, teniendo en cuenta los criterios mencionados anteriormente.

La segunda etapa a evaluar fue la carga de la muestra, para esta etapa se buscaba generar una interacción entre la resina del cartucho y el TAA, por tal razón se necesitaba que el analito se encontrara desprotonado y de esta manera formar una interacción electrostática entre las cargas opuestas de los grupos amino cuaternarios del cartucho y la carga negativa del TAA. Esto se logra a través de la modificación del pH de la muestra. El TAA presenta su mayor pKa en 6.3, por lo tanto, para garantizar que la muestra se encuentra en un porcentaje mayor al 99% desprotonada, se debe aumentar el pH del medio en dos unidades. Así, para la realización de esta etapa se debía garantizar un pH mínimo de 8,0.

La tercera etapa es el lavado de la muestra, esta etapa busca eliminar toda aquella sustancia o metabolito que pueda causar interferencias en la lectura del TAA, por tanto toda molécula que no se encuentre adherida a la resina será eliminada por la solución de lavado. Esta solución debe estar en un pH mínimo de 7,0 para garantizar que el TAA no sea desprendido de la fase sólida. La solución de lavado se determinó realizando el siguiente experimento:

Se evaluaron cuatro soluciones: 100% MetOH, 90:10 MetOH/W, 50:50 MetOH/W y 10:90 MetOH/W. Tras realizar el lavado del cartucho, se realizó la elución del mismo para evaluar la cantidad de ácido retenido por la resina. De este modo se comparó la cantidad de ácido recuperado en cada una de los cartuchos. Para esto, se realizó una curva de calibración a concentraciones de 100 ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm y 1000ppm; se interpolaron los resultados de áreas obtenidas para cada evaluación. Los resultados fueron los siguientes:

Gráfico 9: Curva de calibración del TAA

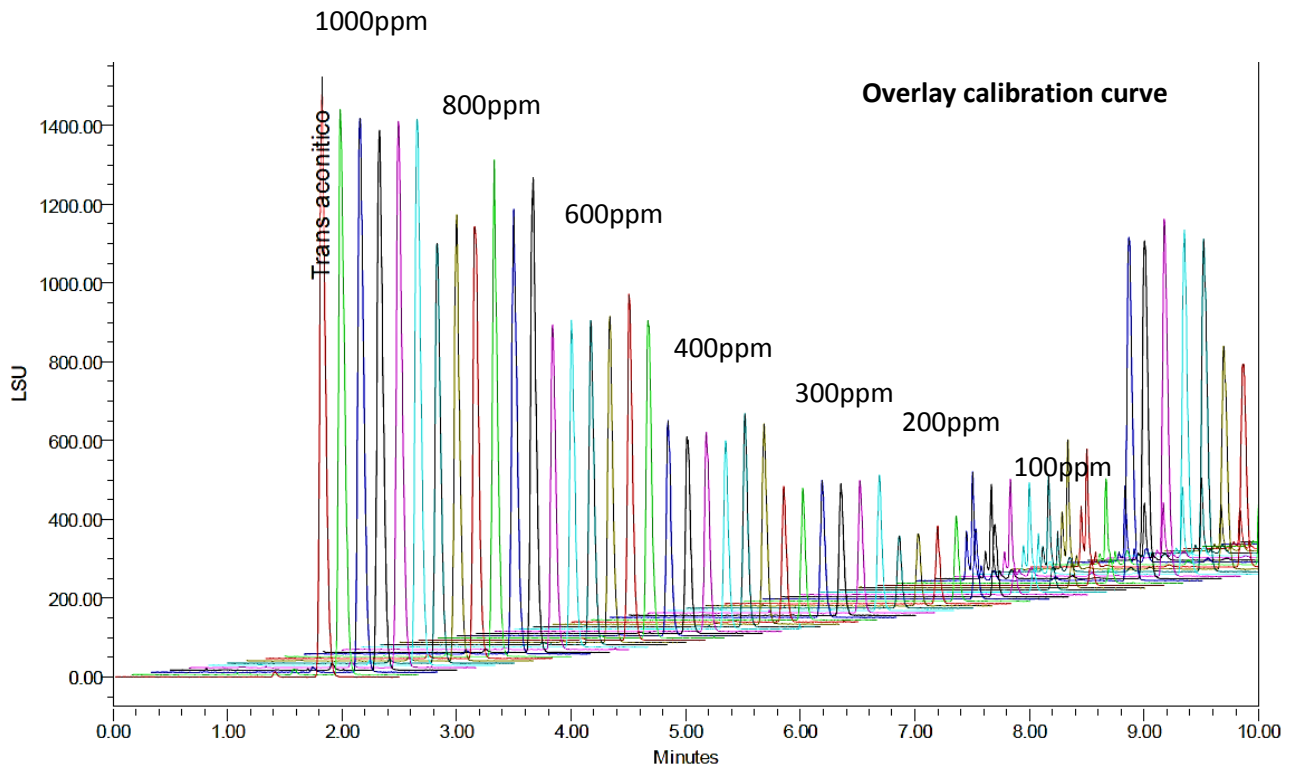
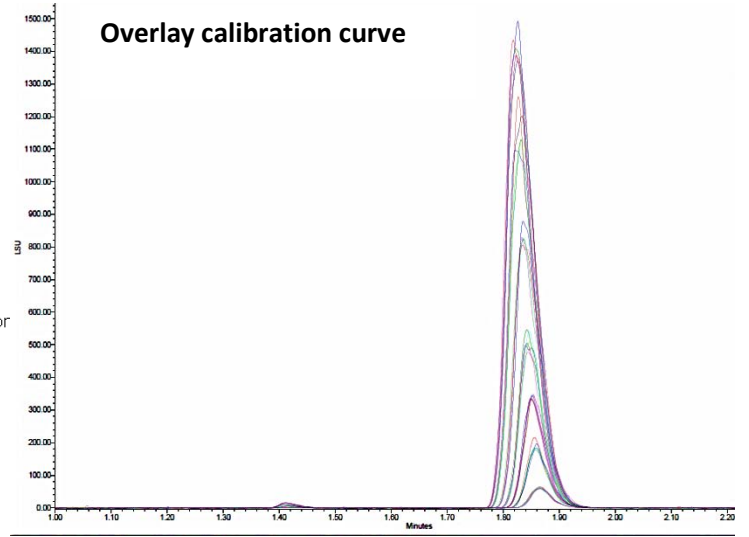
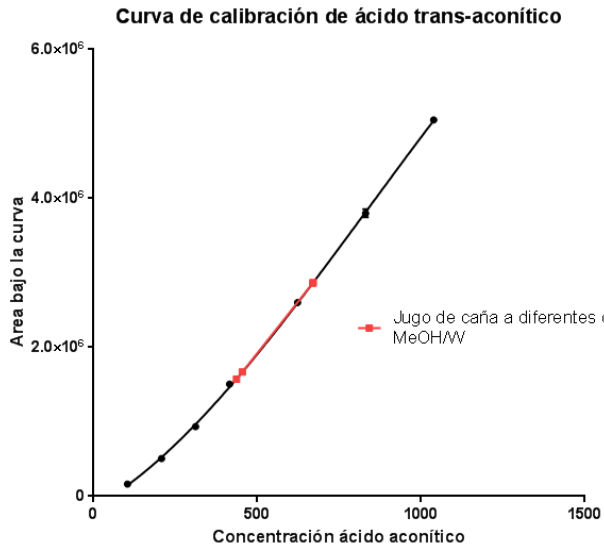


Tabla 4: Resultados de la curva de calibración.

Second order polynomial (quadratic)	
<b>Best-fit values</b>	
B0	-297653
B1	3747
B2	1,376
<b>Std. Error</b>	
B0	39607
B1	172,5
B2	0,1478
<b>95% Confidence Intervals</b>	
B0	-377782 to -217523
B1	3398 to 4096
B2	1,077 to 1,675
<b>Goodness of Fit</b>	
Degrees of Freedom	39
R square	0,9980
Absolute Sum of Squares	2,367e+011
Sy.x	77899
<b>Number of points</b>	
Analyzed	42

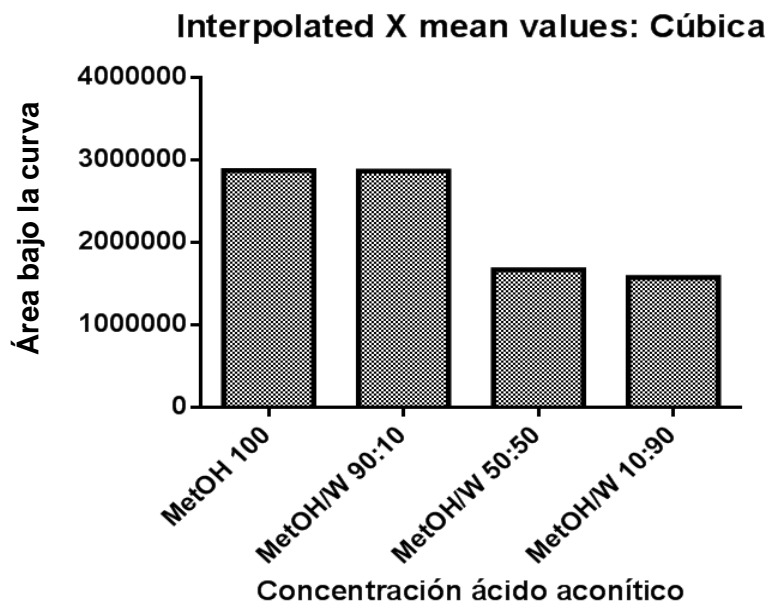


Gráfico 10: Área bajo la curva vs concentración de TAA por interpolación.

Tabla 5: Concentración de TAA por interpolación.

	Concentración ácido acético (Interpolated)			Área bajo la curva (Entered)
	Promedio	Límite mayor	Límite menor	
<b>MetOH 100</b>	677	686	668	2870155
<b>MetOH/W 90:10</b>	676	685	666	2863481
<b>MetOH/W 50:50</b>	450	460	440	1666936
<b>MetOH/W 10:90</b>	431	441	422	1573742

Área bajo la curva

MetOH 100  
MetOH/W 90:10  
MetOH/W 50:50  
MetOH/W 10:90

Gráfico 11: Curva de calibración y datos interpolados.

La curva de calibración utilizada para este experimento presentó un  $R^2$  de 0,9980, un valor que garantiza una relación lineal entre la concentración y el área bajo la curva el pico obtenido. El objetivo es obtener un modelo que describa con

precisión la relación de concentración en función de la respuesta, en este caso, se utilizó una transformación matemática, obteniendo una curva polinomial de segundo orden (cuadrática).

Los resultados con estos lavados permitieron concluir que la permanencia de los analitos ionizados en la resina amino cuaternaria del cartucho no se ve afectada por la fuerza de la solución de lavado. Las mejores soluciones fueron MetOH 100% y MetOH/W 90:10. Debido a que no se presenta una diferencia significativa entre ambas, se optó por utilizar MetOH/W 90:10, pues se generaron muestras más traslucidas en comparación con MetOH. De este modo se evita realizar un método de lavado de columna después de realizar el análisis por UPLC-ELSD.

La cuarta etapa a evaluar fue la elución, el objetivo de esta es romper el enlace electrostático que se generó anteriormente entre el TAA y la resina, esto se obtiene protonando el TAA y teniendo en cuenta que su pKa más bajo es de 2,8. Para eso, se realizaron experimentos con soluciones 20:80 MetOH/W a diferentes pH. Se ejecutaron ensayos a pH 3.0, 2.0 y 0,5. Los resultados obtenidos fueron acordes a la teoría, por debajo de dos unidades del pKa se encuentra protonado y en su forma molecular el TAA, por tanto, en la única fracción que se logró obtener un desprendimiento de TAA de la resina fue con la solución 20:80 MetOH/W a pH 0,5.



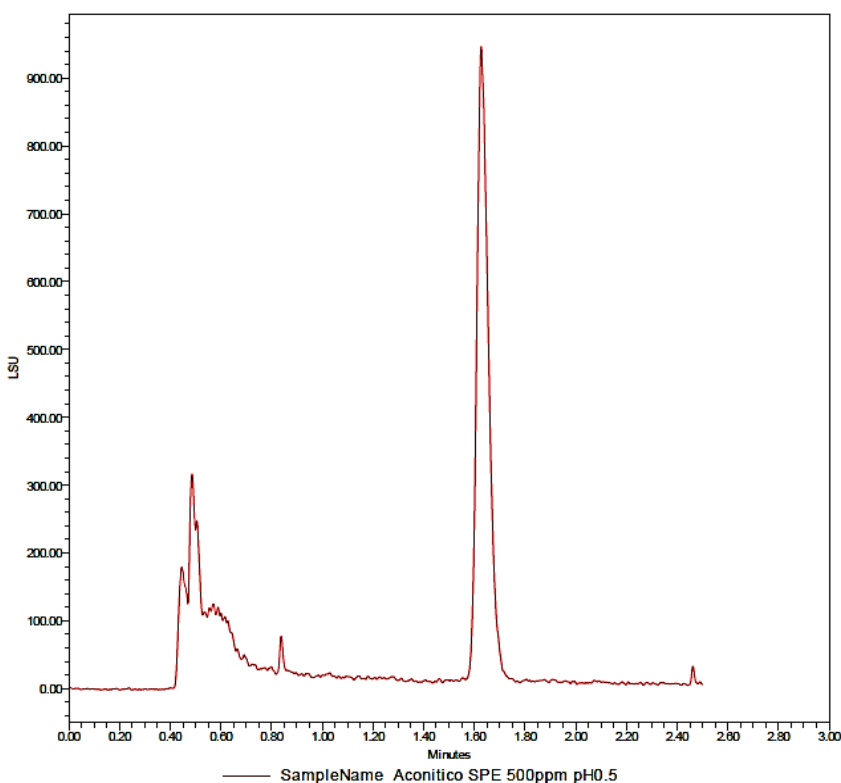


Gráfico 12: Cromatograma de estándar TAA después de realizar elución a pH 0,5.

Sin embargo, según Walford (1998), se favorece la isomerización de TAA a cis aconítico con altas temperaturas y pH ácidos. Por tanto, al eluir el TAA a pH 0,5 es más susceptible a degradarse y/o isomerizarse. De este modo, se realizó una cinética de degradación del ácido a pH 2, 1, 0,5 y neutro, para evaluar a qué pH debe permanecer la muestra sin que se vea afectada significativamente.

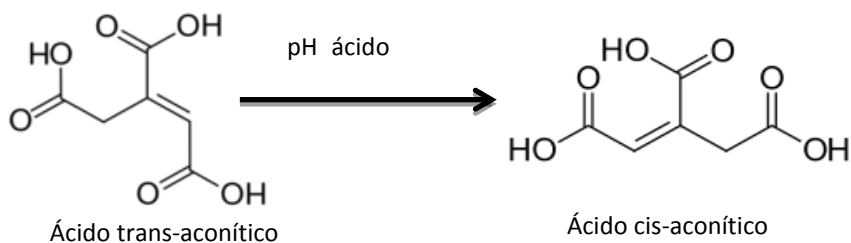


Gráfico 13: Isomerización del TAA a cis-aconítico.

El experimento se realizó durante 1 hora 10min, y se tomaron lecturas cada 10 min, los resultados fueron los siguientes:

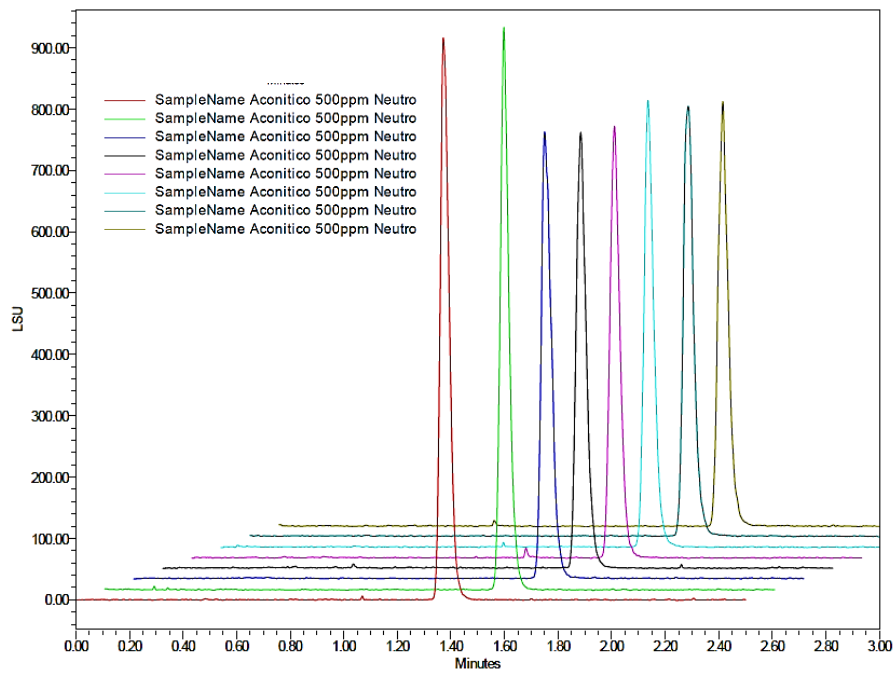


Gráfico 14: Degradación del TAA a pH neutro.

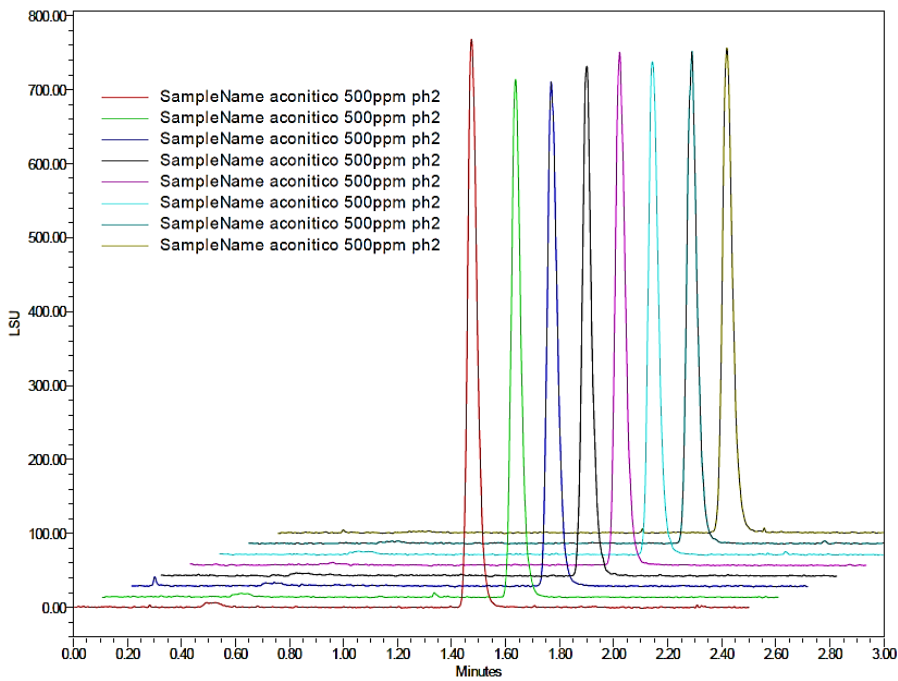


Gráfico 15: Degradación del TAA a pH 2.0

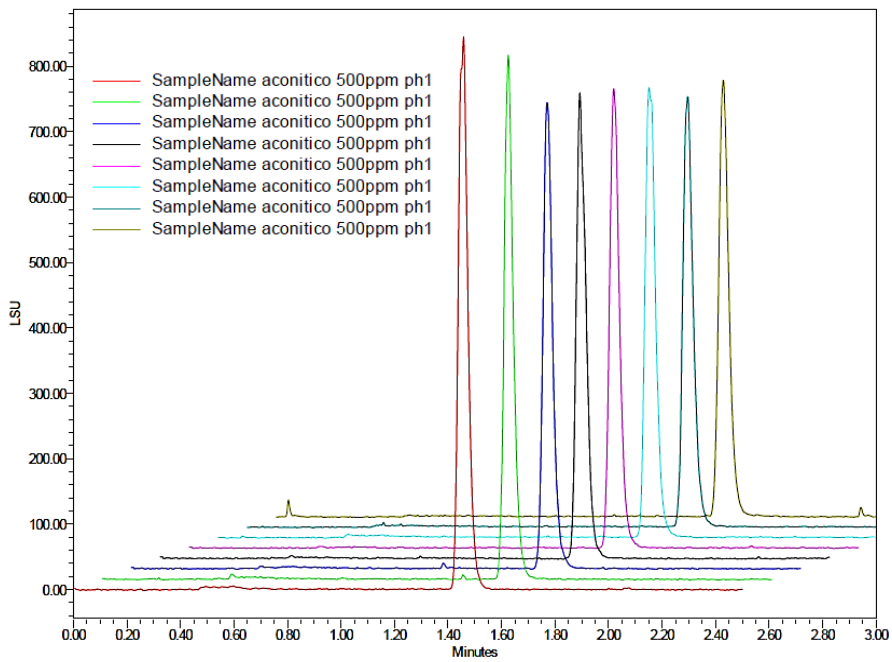


Gráfico 16: Degradación del TAA a pH 1.0

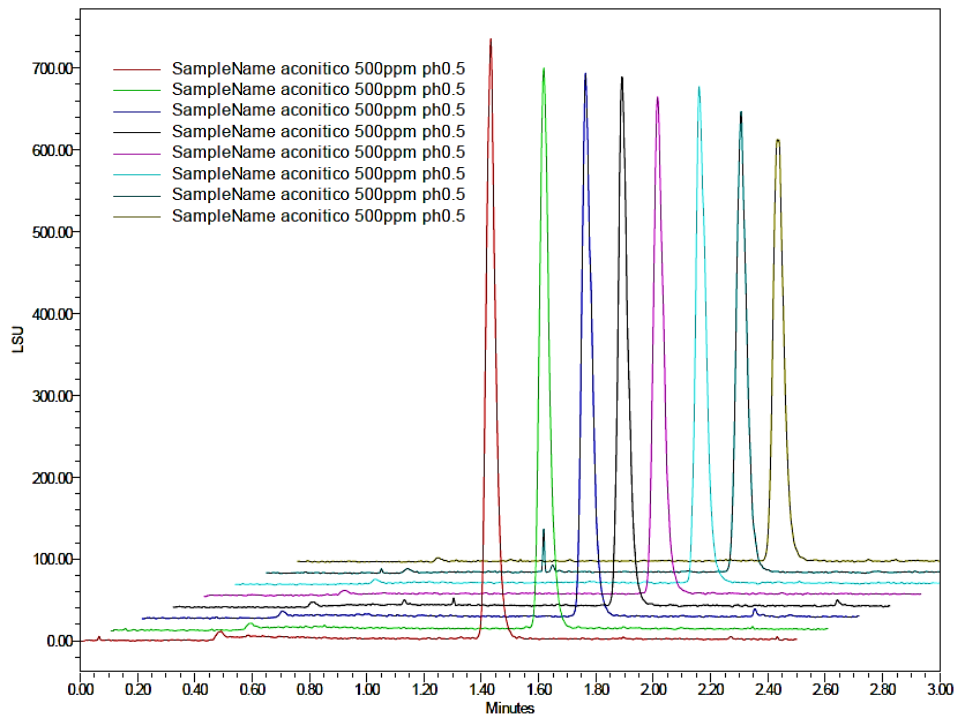


Gráfico 17: Degradación del TAA a pH 0.5

Tabla 5: Áreas de la cinética de TAA en el tiempo

	0min	10min	20min	30min	40min	50min	60min	70min
<b>pH 8.0</b>	1860007	2139668	2076830	1828884	1818128	1865609	1905834	1919311
<b>pH 2.0</b>	1907866	1735466	1779340	1743696	1817571	1764918	1761704	1697022
<b>pH 1.0</b>	1910893	2099381	1785346	1754273	1824792	1895297	1776611	1814839
<b>pH 0.5</b>	1665118	1625517	1610445	1388958	1535552	1521976	1424181	1540503

Para este experimento, se realizó una segunda curva de calibración a concentraciones de 100ppm, 300ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm y 1000ppm, y se interpolaron las áreas en cada uno de los pH evaluados, con el fin de conocer las concentraciones obtenidas de TAA para cada experimento. De esta forma se evidencia de una mejor manera la degradación del ácido en el tiempo dependiendo de las condiciones en las que se encuentre.

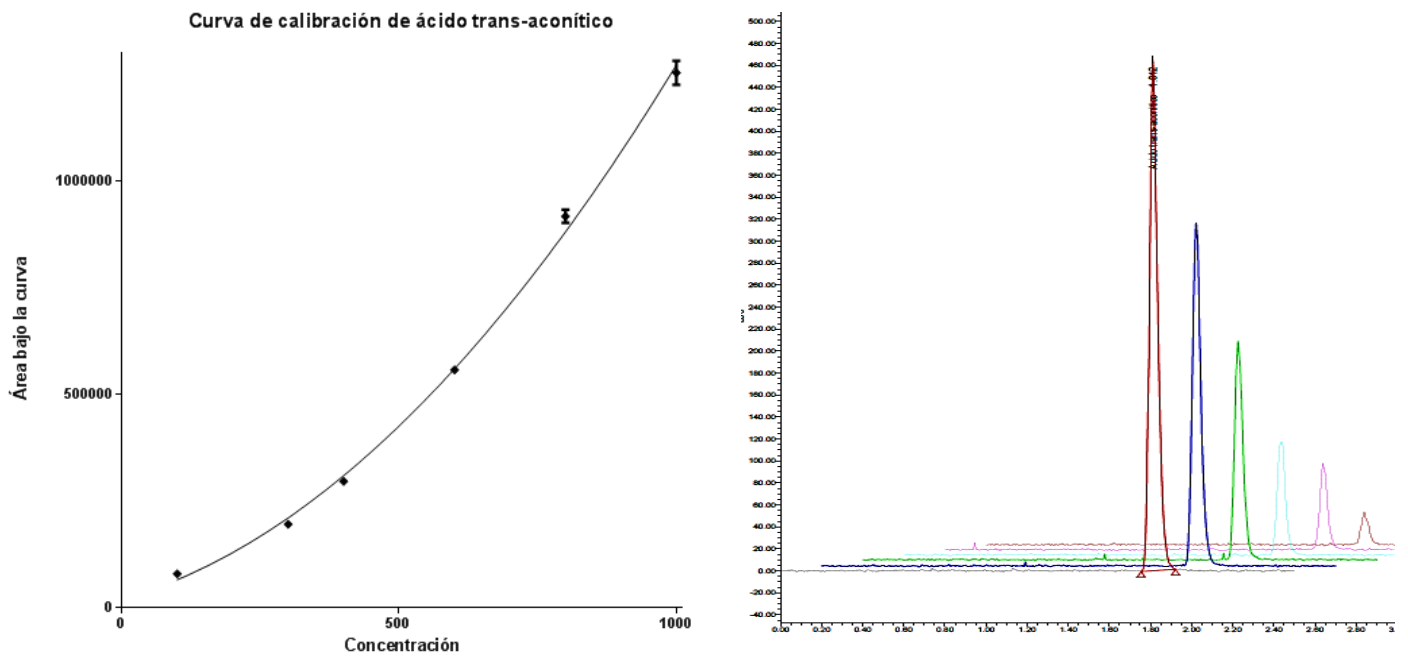
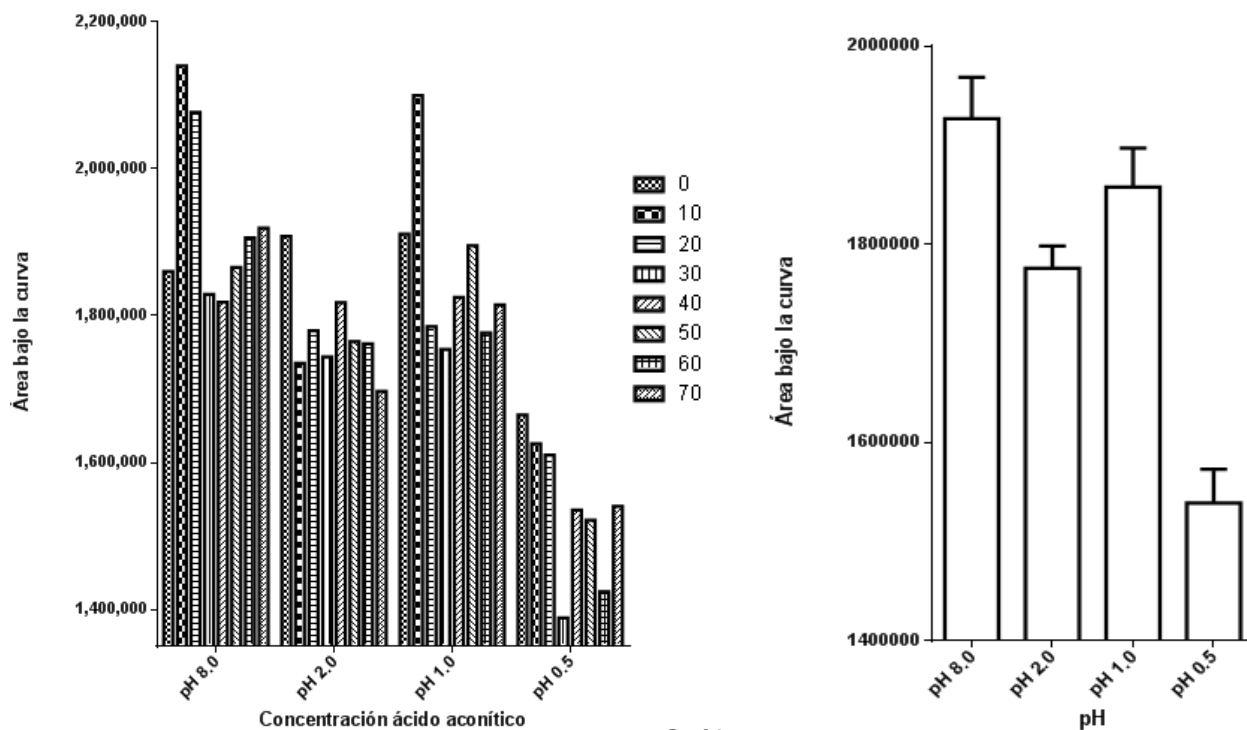


Gráfico 18: Curva de calibración TAA

Tabla 6: Resultados curva de calibración

<b>Second order polynomial (quadratic)</b>	
<b>Best-fit values</b>	
<b>B0</b>	19879
<b>B1</b>	373,0
<b>B2</b>	0,8797
<b>Std. Error</b>	
<b>B0</b>	23812
<b>B1</b>	100,6
<b>B2</b>	0,08809
<b>95% Confidence Intervals</b>	
<b>B0</b>	-30864 to 70623
<b>B1</b>	158,6 to 587,4
<b>B2</b>	0,6920 to 1,067
<b>Goodness of Fit</b>	
<b>Degrees of Freedom</b>	15
<b>R square</b>	0,9957
<b>bsolute Sum of Squares</b>	1,360e+010
<b>Sy.x</b>	30107
<b>Number of points</b>	
<b>Analyzed</b>	18

Teniendo en cuenta la curva del gráfico 18 la cual presentó un  $R^2$  de 0,9957, garantizando que existe una relación lineal entre la concentración y la medida de valoración, se interpolaron las áreas obtenidas en cada una de las mediciones a pH diferentes y se determinaron las concentraciones correspondientes a cada una de ellas. Así, se realizó un gráfico de barras para poder identificar de una mejor forma el comportamiento del ácido en el tiempo.



Gráfico

co 19: Estabilidad del TAA Vs. pH en el tiempo y estabilidad promedio.

En los resultados obtenidos con la cinética de degradación se evidencia una mayor degradación y/o isomerización del TAA a medida que el pH del medio disminuye. Por tal razón, se decidió aumentar el pH aproximadamente a 8 inmediatamente después de realizar la elución del ácido. De esta forma se garantiza que se logra desprender el ácido de la resina en el momento de eluir a pH 0,5 y se aumenta la estabilidad del mismo al aumentar el pH antes de realizar su detección por UPLC-ELSD.

Posteriormente, se realizó un experimento para evaluar el rendimiento de los cartuchos y evaluar qué cantidad de TAA quedaba en éstos después de realizar todo el tratamiento de la muestra. Se efectuó la recuperación de TAA estándar 500ppm por triplicado y cada muestra fue inyectada en el UPLC-ELSD tres veces, teniendo un total de nueve datos. Para este experimento se tomó la curva de calibración mostrada anteriormente.

Tabla 6: Datos de área y concentración Recuperación 500ppm

		Concentración interpolada ppm	Área	Promedio	%Recuperación
	Curva 100ppm	100	86935	-	-
	Curva 300ppm	300	182195	-	-
	Curva 400ppm	400	293264	-	-
	Curva 600ppm	600	549382	-	-
	Curva 800ppm	800	943574	-	-
	Curva 1000ppm	1000	1257066	-	-
<b>Muestra 1</b>	Recuperación 500 ppm SPE	494	419022		
<b>Muestra 1</b>	Recuperación 500 ppm SPE	506	433610	493	99
<b>Muestra 1</b>	Recuperación 500 ppm SPE	480	401119		
<b>Muestra 2</b>	Recuperación 500 ppm SPE	570	518004		
<b>Muestra 2</b>	Recuperación 500 ppm SPE	586	540959	579	116
<b>Muestra 2</b>	Recuperación 500 ppm SPE	580	532584		
<b>Muestra 3</b>	Recuperación 500 ppm SPE	558	502417		
<b>Muestra 3</b>	Recuperación 500 ppm SPE	586	541100	574	115
<b>Muestra 3</b>	Recuperación 500 ppm SPE	576	526578		
<b>Promedio %R</b>					110

La recuperación del método fue de 110%, valor al que se le atribuyen errores personales principalmente en el pesaje del estándar, pues es la actividad más crítica durante la preparación del estándar, la toma de las alícuotas aunque también es una actividad en donde se puede generar error, esta no es tan crítica dado que se utilizan micropipetas para la operación. Adicionalmente, debido a que no se tuvo un control constante de los pHs de las muestras, la respuesta del detector puede variar considerablemente. Sin embargo, también se puede evidenciar una variación del detector. Como ejemplo observar el gráfico 17, en el cual se evidencia cambios de concentraciones a diferentes inyecciones. Cabe resaltar que el gráfico muestra una cinética de degradación, y por tanto se espera que la concentración del ácido disminuya y genere una tendencia. No obstante, las concentraciones fluctúan aumentando y disminuyendo, lo que evidencia una posible variación en el equipo.

Teniendo el método de tratamiento de muestra estandarizado, y la curva de calibración con un  $R^2$  que sugiere linealidad del método, se procedió a evaluar la concentración de TAA en muestras reales de jugo de caña de azúcar provistas por el Ingenio Manuelita S.A. Las muestras analizadas corresponden a diferentes etapas del proceso de fabricación de caña de azúcar, siendo estos jugos de primera extracción (guarapo), jugo diluido, jugo alcalizado, jugo clarificado y jugo filtrado.

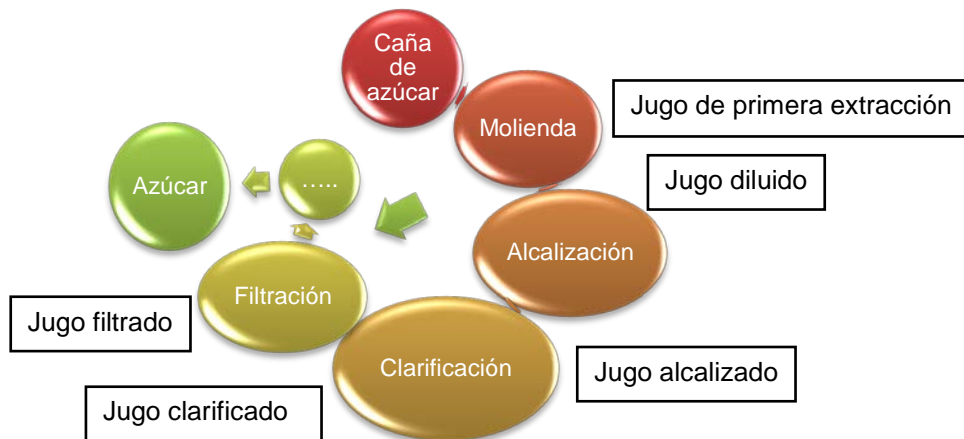


Gráfico 20: Etapas del proceso de fabricación de azúcar y clase de jugo extraído de cada una de ellas.

Se evaluó la concentración de TAA en cada una de las muestras, para esto, se compararon los cromatogramas de cada uno de los jugos, posteriormente se interpolaron y se determinó la concentración de TAA en promedio de cada uno. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron los siguientes:

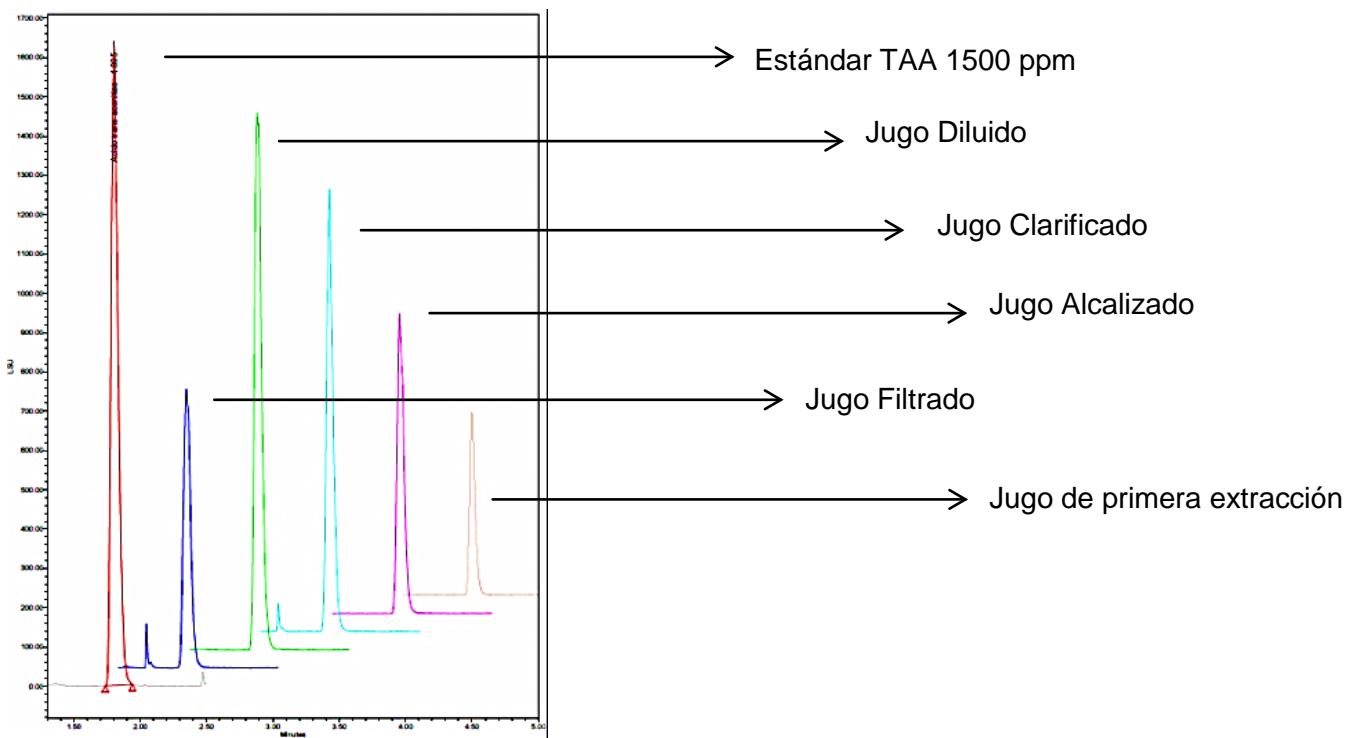


Gráfico 21: Cromatograma de comparación de jugos obtenidos en diferentes etapas de la fabricación de azúcar.



Tabla 7: Concentración de TAA en jugo de caña de azúcar.

Muestra	Concentración interpolada	Promedio Concentración (ppm)	Área
Filtrado	839		952848
Filtrado	808	807	895076
Filtrado	773		834648
Alcalizado	996		1264961
Alcalizado	1001	997	1275546
Alcalizado	993		1257292
Clarificado	1185		1698032
Clarificado	1191	1190	1712475
Clarificado	1193		1717101
Diluido	1141		1590409
Diluido	1294	1216	1975808
Diluido	1209		1756130
Inicial	768		825569
Inicial	758	775	808379
Inicial	798		877198

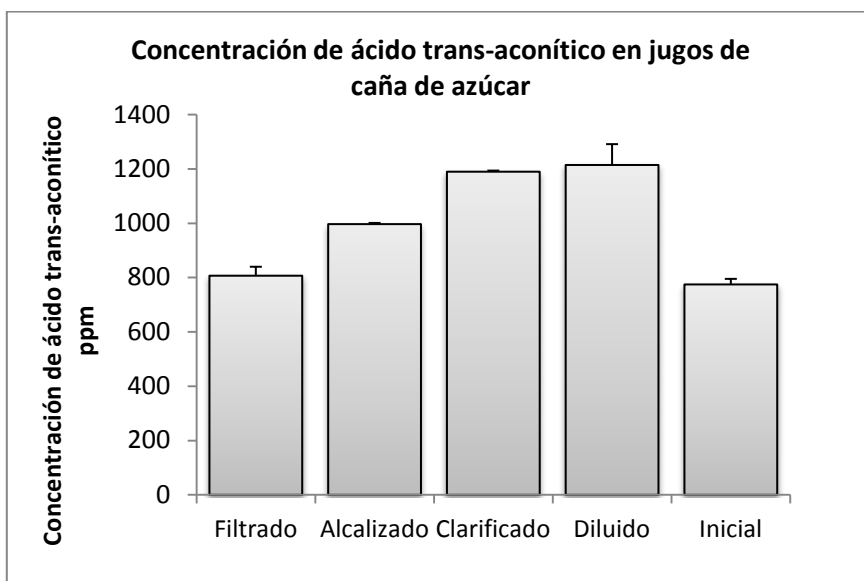


Gráfico 22: Concentración promedio de TAA en jugos de caña de azúcar

Es evidente que los análisis demuestran grandes concentraciones del ácido trans aconítico durante todo el proceso de fabricación del azúcar, los jugos analizados presentan concentraciones aprovechables de TAA. Se podría suponer teniendo en cuenta que los resultados son preliminares que la extracción del ácido es factible de ser llevada a cabo durante cualquier etapa del proceso de extracción de azúcar. Se debe tener en cuenta que aunque durante el proceso, los jugos son tratados con temperatura y sufren variaciones de pH, el ácido no es eliminado, pero como consecuencia, se evidencia que la concentración del mismo disminuye dependiendo del tratamiento que ha sufrido la muestra. El jugo diluido fue aquel que presentó una mayor concentración de TAA, obteniendo 135,12g/L. Este jugo se obtiene como resultado de la molienda de la caña en el tándem de molinos, donde después de realizar el primer lavado del bagazo utilizando el jugo extraído del molino siguiente, se efectúa un segundo lavado en el último molino con agua caliente. (Grupo Manuelita).

El pH de los jugos en el proceso de alcalización es aumentado con la adición cal con el fin de neutralizar la acidez del mismo formando sales insolubles de calcio, en esta etapa el TAA se encuentra desprotonado, por tanto sería una ventaja para realizar la extracción del ácido antes de seguir con los procesos de clarificación, filtración, etc.

El TAA claramente puede ser utilizado como una materia prima importante en la producción de bienes de alto valor comercial, como lo son cosméticos y plásticos biodegradables, por tanto, los resultados obtenidos durante la investigación y el trabajo en el laboratorio permiten proponer una nueva alternativa para el sector azucarero, aumentando de esta manera el portafolio de productos y presentando una opción de crecimiento económico.

## 9 CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar una metodología de tratamiento de muestra por extracción en fase sólida (SPE) para realizar la valoración del TAA en jugo de caña de azúcar en diferentes etapas del proceso de producción del azúcar.
2. La metodología de extracción en fase sólida por intercambio iónico implementada para el tratamiento de las muestras fue capaz de aislar el TAA y eliminar impurezas presente en la matriz del jugo de caña, dando como resultado una muestra limpia y traslucida.
3. Se determinó que durante todas las etapas evaluadas del proceso de fabricación del azúcar, los jugos presentan concentraciones aprovechables de TAA.
4. El jugo diluido fue aquel que presentó una mayor concentración de TAA, obteniendo 135,12g/L.
5. El método de detección por UPLC-ELSD permitió obtener resultados con una alta resolución, sensibilidad y en un tiempo de corrido de 2.5 min.

## 10 RECOMENDACIONES

1. Al realizar el tratamiento de la muestra se debe tener en cuenta la velocidad de goteo en las etapas de carga de la muestra y elución, pues de esta depende que en el primer paso el analito interactúe de manera favorable con la resina por intercambio iónico y en el segundo se genere una completa anulación de las fuerzas electrostáticas generadas anteriormente.
2. Todos los beakers e instrumentos volumétricos utilizados deben ser purgados con agua tipo 1 antes de ser utilizados, esto con el fin de eliminar solventes, partículas o iones que puedan taponar y dañar la columna del UPLC.
3. Todos los solventes, estántares, jugos, etc, que vayan a ser inyectados en el equipo UPLC-ELSD deben ser filtrados por una membrana de 0,22µm con el fin de eliminar cualquier partícula que pueda taponar la columna.
4. Se deben evitar al máximo cometer errores personales en el momento de realizar la curva de calibración y la recuperación del ácido, para esto se debe anotar exactamente el valor de estándar pesado, con el fin de poder conocer la concentración real del estándar y realizar un factor de corrección, igualmente la alícuota tomada debe garantizar un volumen específico, por lo tanto, se debe utilizar micropipetas o pipetas graduadas dependiendo del volumen. Este tipo de experimentos son de vital importancia para obtener resultados confiables por tal razón, se debe tener sumo cuidado en las operaciones mencionadas.
5. En el momento que se desee realizar una validación de la metodología de extracción de TAA de jugos de caña de azúcar para garantizar que los resultados obtenidos son veraces y verificar la reproducibilidad de los mismos ante variaciones como el personal, el clima, etc se deben evaluar parámetros de linealidad, especificidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación y robustez.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Asocaña, sector azucarero Colombiano. (2009). *El sector azucarero en la actualidad*. Recuperado el Febrero de 2012, de <http://www.asocana.org>
- Asocaña, sector azucarero Colombiano. (06 de Marzo de 2012). *Balance sector azucarero Colombiano 2000-2012*. Recuperado el 07 de Abril de 2012, de <http://www.asocana.org/>
- Asocaña, sector azucarero Colombiano. (2012). *Informe económico marzo 2012*. Cali. <http://www.asocana.org/>
- Asocaña, sector azucarero Colombiano. (s.f.). *Asocaña*. Recuperado el 05 de Abril de 2012, de <http://www.asocana.org/>
- Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (1995). A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. *Chromatographia*.
- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica*.
- Cenicaña. (s.f.). *cenicana*. Recuperado el 14 de Marzo de 2012, de [http://www.cenicana.org/pdf/documentos\\_no\\_seridados/libro\\_el\\_cultivo\\_cana/libro\\_p337-354.pdf](http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seridados/libro_el_cultivo_cana/libro_p337-354.pdf).
- Chen, J. P. (2006). Resumen del proceso de fabricación del azúcar de caña crudo. En J. P. Chen, *Manual del azucar de caña* (págs. 73 - 75). México: LIMUSA. S.A. DE C.V GRUPO NORIEGA EDITORES.
- Clarke, M. A. (2006). Parte (B) Azúcares y no azúcares. En J. C. Chen, *Manual del azúcar de caña* (págs. 58 -60). México: EDITORIAL LIMUSA, S.A. DE C.V. GRUPO NORIEGA EDITORES.
- Copoví, A., Díez-Sales, O., Herráez-Domínguez, J., & Herráez-Domínguez, M. (2006). Enhancing effect of alpha-hydroxyacids on "in vitro" permeation across the human skin of compounds with different lipophilicity. *International journal of pharmaceuticals*.

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación. (2012). *Convocatoria 543*. Bogotá.

Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientist*. New Jersey: Jhon Wiley & son, inc.

Earl W Gluesenkamp, e. a. (1959). *Patente nº 2,883,356*. United States.

EUGENE J. VAN SCOTT, M., CHERIE M. DITRE, M., & RUEY J. YU, P. O. (1996). Alpha-Hydroxyacids in the treatment of Signs of Photoaging. *Clinics in dermatology*.

Grupo Manuelita. (s.f.). *Grupo Manuelita*. Recuperado el 14 de Abril de 2012, de <http://www.manuelita.com/>

IDEM 734. (2011). *informe anual 2010-2011*. Cali. <http://www.asocana.org/>

Hanine, H., Mourgues J., and Conte, T. (1992) Recovery of calcium aconitate from effluents from cane sugar production with ion-exchange resins. *Bioresource Technology*, V. 39: 221- 227.

Irvine, J. E. (2006). Parte A. Caña de azúcar. En J. P. Chen, *Manual del azúcar de caña* (pág. 27). México: LIMUSA. S.A DE C.V GRUPO NORIEGA EDITORES.

Jesper Larsena, C. C. ( 2009). Reaction between drug substances and pharmaceutical excipients: Formation of citric acid esters and amides of carvedilol in the solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11–17.

MARGARET E. K. KRAELING and ROBERT L. BRONAUGH. (1997). In vitrop ercutaneouasb sorptiono f alpha hydroxya cids in. *j. Soc .Cosmet. Chem.48*, 187-197.

Lavker, R.M., Kaidbey, K., Leyden, J.J., 1992. Effects of topical ammonium lactate on cutaneous atrophy from a potent topical corticosteroid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 26.

Leyden, J.J., Lavker, R.M., Grove, G., Kaidbey, K., 1995. Alpha hydroxy acids are more than moisturizers. *J. Geriatr. Dermatol.* 3, 33A–37A.

Procaña, asociación Colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar. (s.f.). *Procaña*. Recuperado en Febrero de 2012, de <http://www.procana.org>

Proexport Colombia, promoción de turismo, inversión y exportaciones; Inversión en el sector de Biocombustibles en Colombia. Recuperado en Noviembre de 2012. <http://www.inviertaencolombia.com.co>

Regna, A.E. and Bruins, P.F. (1956) Recovery of aconitic acid from molasses. *Industrial and Engineering Chemistry*, V. 48, No. 8: 1268-1277.

República de Colombia. (2010). *Documento Conpes 3678*. Bogotá.

Rosa María Coro-Antich, N. S.-Á. (2000). Dermoabrasión con ácido glicólico sobre la piel facial. Histomorfometría. *IV CONGRESO VIRTUAL HISPANO AMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA*.

Swartz, M. E. ( 2005). UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Volume 28, Issue 7-8.

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