

Implementación de un método cromatográfico para la determinación de azúcares, etanol y glicerol en hidromiel.

Juan Fernando Rojas¹, Marta Quicazán², Andrea Mojica³

RESUMEN

Se implementó un método por cromatografía líquida HPLC para la determinación de etanol, glicerol y azúcares en muestras de hidromiel provenientes de un proceso de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. La implementación se hizo usando como fase estacionaria una columna de intercambio catiónico, como fase móvil agua Tipo I y un detector de índice de refracción, pues presenta una alta sensibilidad a los compuestos estudiados. Se evaluaron los porcentajes de recuperación en un rango de concentraciones entre 0,27 y 6,10 mg/mL estuvieron entre 96,1 y 101%. Los LOD del método estuvieron entre 0,01 y 0,20% y los LOQ entre 0,03 y 0,31%. En el estudio de linealidad y precisión se encontraron resultados adecuados para los rangos de concentración evaluados. Para las muestras analizadas el contenido de glucosa estuvo entre 0,31 y 11,18 %, el de fructosa estuvo entre 0,15 y 13,01 %, el de glicerol osciló entre 0,51 y 0,75% y el contenido de etanol varió entre 5,29 y 11,68%.

Palabras clave: azúcares, etanol, hidromiel, HPLC.

INTRODUCCIÓN

Una de las bebidas alcohólicas más tradicionales a nivel mundial es la hidromiel la cual se obtiene por medio de un proceso de fermentación, empleando miel y agua principalmente[1]-[2], algunos autores han reportado la adición de hierbas, extractos de frutas, nueces y almendras durante los procesos de obtención de hidromiel ya que estas especies le proporcionan ciertos aromas y sabores característicos a la bebida fermentada.[3]-[4].

Para lograr el proceso de fermentación de hidromieles los monosacáridos glucosa y fructosa juegan un papel importante ya que representan la fuente de energía para que los microorganismos responsables de la fermentación

actúen y produzcan etanol y CO₂[5]-[6]-[7]. Por su parte, los disacáridos maltosa y sacarosa, presentes en la miel, no son fuente de alimento para las levaduras de fermentación.

El principal compuesto que se produce durante el proceso fermentativo es etanol y varios autores reportan concentraciones entre 7 y 18%, al finalizar el tiempo de fermentación[8]-[9]. Frecuentemente, no se alcanza el contenido de alcohol apropiado durante el tiempo que dura la fermentación ya que influyen varios aspectos tales como: las características de la hidromiel de partida[10], los procesos térmicos, [11], los métodos de preparación de los mostos así como los procesos de su fermentación y maduración [12].

Otro de los compuestos que se produce durante el proceso de fermentación es el glicerol, el cual es considerado uno de los principales componentes químicos de importancia sensorial en hidromieles[13].

En el presente estudio se determinaron azúcares, metanol y glicerol en muestras obtenidas en diferentes etapas de un proceso de fermentación de hidromiel con *Saccharomyces cerevisiae*. Los compuestos estudiados, frecuentemente han sido analizados empleando diversas técnicas de separación, identificación y cuantificación. Uno de los métodos más empleados es la cromatografía líquida HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con detección de índice de refracción [14]-[15]-[16]-[17].

Esta técnica analítica permitiendo tanto la identificación del compuesto como determinar la concentración en la que se encuentra, logrando identificarla producción de etanol y glicerol así como el consumo de glucosa y fructosa, a lo largo del proceso de fermentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos.

Los estándares empleados fueron obtenidos de las siguientes fuentes: D(+)-glucosa (pureza >98%) marca Panreac, D(-)-fructosa (pureza >98%) y D-(+)- maltosa (pureza min.99%) marca Sigma; Glicerol (pureza >98%) marca Mallinckrodt y Etanol (pureza >98%) marca J.T. Baker.

Estos estándares fueron disueltos en agua grado Tipo I (ASTM D-1193), producida por un equipo Barnstead Easy Pure II marca Thermo Scientific, para obtener soluciones

¹Juan Fernando Rojas.jfrojasd@unal.edu.co. Estudiante de Química Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA.

²Marta Quicazán.mcquicazand@unal.edu.co. Profesora. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA. edu.co

³Andrea Mojica. admojicac@unal.edu.co. M. Sc. Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Profesional Especializado. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA

madre de 25 mg/mL. Estas soluciones fueron almacenadas en frascos ámbar y guardadas en refrigeración a 8°C. Las soluciones de calibración fueron preparadas por dilución de las soluciones madre en un rango de concentración de 0,02 mg/mL a 6,10 mg/mL. Las soluciones fueron filtradas a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm, antes de inyectarse en el sistema cromatográfico.

Muestras de hidromiel.

Las muestras evaluadas provienen de un proceso de fermentación de hidromiel con *Saccharomyces cerevisiae*, realizado en la planta de vegetales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia. El proceso de fermentación se realizó durante 22 días y se tomaron muestras para análisis al inicio de la fermentación (día 0), en el intermedio del proceso (día 12) y al finalizar el mismo (día 22).

Las muestras recolectadas fueron diluidas con agua Tipo I, en una proporción de 1:25, luego se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min. La limpieza de la matriz de las muestras se realizó empleando extracción en fase sólida (SPE) con C₁₈, después de éste proceso las muestras fueron filtradas a través de una membrana de acetato de celulosa 0,2 µm e inyectadas en el sistema cromatográfico.

Condiciones cromatográficas.

Se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) con detector de Índice de Refracción marca JASCO LC-2000, utilizando una columna de intercambiación Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm d.i.), marca Waters. La elución de los analitos se realizó con agua tipo I, en modo isocrático a un flujo de 0,47 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL tanto para los estándares como para las muestras.

Evaluación de parámetros de validación.

Se evaluó la selectividad de la metodología por medio de la comparación entre las señales cromatográficas que presentaba un blanco de matriz y las señales que presentaba el blanco de matriz fortificado, con una mezcla de los compuestos de interés.

Para evaluar exactitud y precisión se realizaron fortificaciones a tres niveles de concentración, para cada uno de los compuestos de interés y se realizaron siete réplicas para cada nivel de concentración.

El parámetro de linealidad de rango fue evaluado por medio de la preparación de una curva de calibración con siete niveles de concentración. Se establecieron las respuestas cromatográficas por triplicado para cada nivel de concentración.

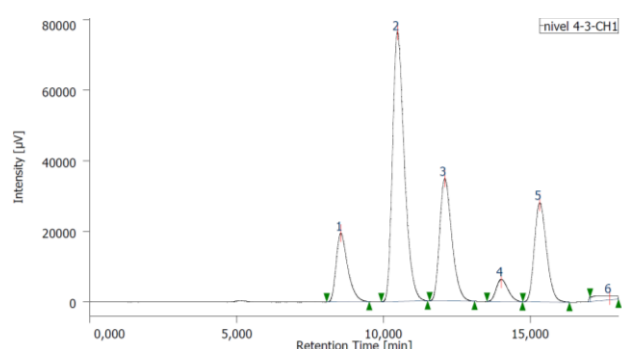
Finalmente, para la estimación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se utilizó el método propuesto por la IUPAC (unión internacional de Química pura y aplicada).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selectividad.

En el sistema cromatográfico se observó que el blanco de matriz no presentó señales que interfirieran con los analitos estudiados. La identificación de ellos se realizó por medio de la comparación de los tiempos de retención entre el compuesto desconocido y su correspondiente estándar.

De otra parte, se encontró que la metodología analítica es selectiva ya que no se presentó solapamiento entre las señales cromatográficas de los compuestos de interés y la resolución entre ellas presentó valores superiores a 1,5. En la Fig. 1 se presenta un cromatograma característico para los compuestos estudiados.



Tiempos de retención (min): maltosa 8,55 (1); glucosa 10,48 (2); fructosa 12,09 (3); glicerol 14,02 (4) y etanol 15,33 (5)

Fig 1. Cromatograma característico del método cromatográfico

Exactitud y precisión.

En la tabla 1 se presentan las concentraciones que fueron evaluadas, para determinar la exactitud y precisión del método. Dichas concentraciones corresponden a los niveles 2, 4 y 7 de la curva de calibración.

Tabla 1. Concentración de los niveles de calibración.

Nivel	Maltosa	Fructosa	Glucosa	Etanol	Glicerol
Concentración	[] (mg/mL)	[] (mg/mL)	[] (mg/mL)	[] (mg/mL)	[] (mg/mL)
Nivel 1	0,02	0,02	0,10	0,10	0,02
Nivel 2	0,27	0,51	1,10	1,10	0,12
Nivel 3	0,52	1,00	2,10	2,10	0,22
Nivel 4	0,77	1,49	3,10	3,10	0,32
Nivel 5	1,02	1,98	4,10	4,10	0,42
Nivel 6	1,27	2,47	5,10	5,10	0,52
Nivel 7	1,52	2,96	6,10	6,10	0,62

En la Fig. 2 se observa que los porcentajes de recuperación se encontraron por encima del 96%, para los niveles de concentración evaluados y para todos los compuestos estudiados.

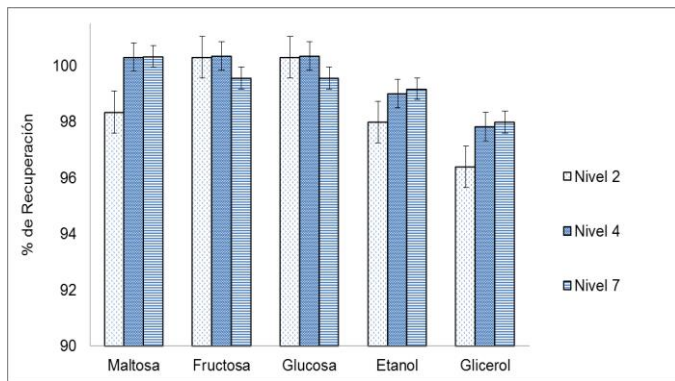


Fig.2. Resultados del estudio de exactitud y precisión.

Por medio del estadístico t-student, se estableció que los porcentajes de recuperación obtenidos no son significativamente diferentes de 100%, a un nivel de confianza del 95%. Por lo que es posible establecer que en el proceso de preparación de la muestra, las pérdidas de los analitos de interés no son representativas [18].

Con respecto a la precisión de la metodología, se encontró que a los niveles de concentración evaluados, los coeficientes de variación (%CV) se encontraron en un rango entre 0,4% a 0,9% (Tabla 2). A partir de estos resultados, es posible establecer que el método analítico implementado es preciso ya que la variación entre réplicas, en términos de repetibilidad, no supera el 1%.

Tabla 2. %CV para las concentraciones evaluadas.

Nivel Concentración	Maltosa	Fructosa	Glucosa	Etanol	Glicerol
% C.V (n=7)	% C.V (n=7)	% C.V (n=7)	% C.V (n=7)	% C.V (n=7)	% C.V (n=7)
Nivel 2	0,62	0,53	0,62	0,74	0,43
Nivel 4	0,84	0,85	0,80	0,89	0,78
Nivel 7	0,68	0,74	0,69	0,73	0,65

Linealidad de rango.

Las concentraciones de los compuestos para los diferentes niveles de la curva de calibración fueron establecidas de acuerdo a los contenidos esperados en las muestras. Las curvas de calibración para todos los compuestos contienen 7 niveles. Cada punto de la curva de calibración fue medido por triplicado y el promedio de los valores fueron empleados para la construcción de las ecuaciones de regresión.

Para el análisis de regresión lineal se realizó la estimación del coeficiente de correlación lineal y el coeficiente de determinación. El criterio de aceptación empleado para éste estadístico fue el siguiente: coeficiente de correlación lineal (r) > 0,99 y de determinación (r^2) > 0,98.

Con el fin de establecer si la pendiente y el intercepto de la curva de calibración, son significativamente diferentes de cero, se realizó la prueba t-student. Los criterios que se tuvieron en cuenta para éste estadístico fueron los siguientes: la pendiente es significativamente diferente de cero si $t_{exp} > t$ [0,05, n-2], el intercepto es significativamente diferente de cero si $t_{exp} > t$ [0,05, n-2].

Finalmente, los datos de la curva de calibración fueron tratados con la prueba de Fisher para establecer si la regresión entre variables es significativa, con el siguiente criterio: $F_{exp} > F$ [0,05; K - 2; n-K].

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para las pruebas estadísticas aplicadas.

Tabla 3. Resultados de los análisis estadísticos realizados para la evaluación del parámetro de linealidad.

Estadístico	Maltosa	Glucosa	Fructosa	Etanol	Glicerol
Coefficiente de correlación (r)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9998	0,9998	0,9998	0,9998	0,9997
t-student intercepto	109,9	0,6	50,8	60,4	149,2
t-student pendiente	305,6	301,9	289,3	286,8	237,5
Prueba Fisher (regresión)	93371	91150	83698	82274	56422

Valor para t student=2,093; valor para F de Fisher=4,6

Para todos los compuestos evaluados se encontró que los coeficientes de correlación y de determinación presentaron valores mayores a 0,99 y 0,98, lo que indica que los datos obtenidos para la curva de calibración obedecen a un modelo de regresión lineal.

Al evaluar el intercepto de las curvas de calibración con el estadístico t-student se encontró que al realizar la cuantificación de las concentraciones empleando la curva de calibración, se debe tener en cuenta el valor del intercepto ya que éste no es significativamente igual a cero. En el caso de la glucosa, el valor del intercepto puede ser tomado como cero ya que al comparar estos valores estadísticamente son iguales.

Para todos los compuestos la pendiente es diferente de cero, lo que indica que la respuesta cromatográfica depende de la concentración de cada nivel de la curva de calibración.

Por último, la prueba de Fisher indica que las respuestas cromatográficas son directamente proporcionales a la concentración de los niveles de la curva de calibración, ya que se presenta una regresión de tipo lineal entre estas variables.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Se realizó la estimación de los límites de detección y cuantificación instrumentales empleando el método establecido por IUPAC [19], en el cual se toma la desviación estándar del intercepto S_B y la sensibilidad analítica m para obtener el valor:

$$C_L = \frac{(k * S_B)}{m} \quad (1)$$

En donde $k = 3$ permite un nivel de confianza de 99.86% para el límite de detección, si los valores trabajados siguen

una distribución normal. Para el límite de cuantificación $k = 10$

Los valores estimados para límites de detección y cuantificación se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) instrumentales y de la metodología.

	LD inst. (ug/mL)	LC inst. (ug/mL)	LD método (% p/v)	LC método (%p/v)
Maltosa	5,0	18,0	0,013	0,045
Glucosa	37,0	122,0	0,093	0,305
Fructosa	18,0	59,0	0,045	0,148
Glicerol	1,0	4,0	0,010	0,030
Etanol	78,0	23,0	0,058	0,195

Por su parte, los límites de detección y de cuantificación de la metodología, se calcularon teniendo en cuenta todas las etapas involucradas en el proceso de la preparación de la muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos es posible establecer que los compuestos que presentan mayor sensibilidad, con el método cromatográfico implementado, son maltosa y glicerol.

Evaluación de muestras de hidromiel.

Se realizó la evaluación de muestras de hidromiel, representativas de las tres principales etapas de un proceso de fermentación como son al inicio del proceso, al intermedio y al final del mismo.

El contenido de los compuestos analizados en las muestras de hidromiel, fue determinado empleando el método de la curva de calibración. En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos en las muestras evaluadas.

Tabla 5. Resultados de las muestras de hidromiel estudiadas.

	Maltosa (%p/v)	Glucosa (%p/v)	Fructosa (%p/v)	Glicerol (%p/v)	Etanol (%p/v)
Inicio Día 0	2,371	11,175	13,005	<LD	<LD
Intermedio Día 12	2,293	4,149	7,774	0,507	5,290
Final Día 22	2,287	<LD	<LD	0,754	11,684

De acuerdo a la tabla anterior es posible establecer que durante el proceso de fermentación la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, toma como fuente de energía para realizar el proceso de fermentación los monosacáridos presentes en la miel como son glucosa y fructosa. Ya que los contenidos de estos azúcares se reducen a un 37,05% para glucosa y 59,76% para fructosa, al día 12 de fermentación, lo que corresponde a la etapa intermedia del proceso de fermentación. Al final del proceso de fermentación las concentraciones de estos azúcares presentaron valores inferiores al límite de detección de la metodología.

Por su parte, el disacárido maltosa que se encuentra disponible en la miel, no representa fuente de energía para la levadura empleada ya que la concentración de éste

compuesto permanece constante a lo largo del proceso de fermentación.

Fue posible evidenciar la producción de glicerol y etanol, a lo largo del proceso de fermentación ya que se aprecia un aumento en la concentración del glicerol y del etanol; desde la etapa intermedia de la fermentación hasta el final de la misma. El contenido final de etanol que corresponde al 11,68%, se encuentra acorde por lo reportado en literatura por varios autores [8]-[9].

CONCLUSIONES

Se encontró que el método cromatográfico implementado es selectiva y presenta una exactitud entre 96,1% y 101%. En los estudios de repetibilidad se encontró que los compuestos evaluados presentan porcentajes de coeficientes de variación menores al 1%. De otra parte, se encontró que los LD de la metodología se encuentran entre 0,010 %p/v y 0,093%p/v; y los LC se encuentran entre 0,030%p/v y 0,195%p/v.

En la evaluación de las muestras provenientes del proceso de fermentación de hidromiel se evidenció la producción de etanol y glicerol. También se encontró que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aprovecha los azúcares glucosa y fructosa, presentes en la miel para llevar a cabo el proceso de fermentación.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación del proyecto "Establecimiento De Procesos De Conservación Y Transformación De Polen Apícola Para La Obtención De Alimentos Con Características Funcionales"

REFERENCIAS

- [1]Kahoun, D., Rezkova, S., Veskrnova, K., Kralovsky, J., Holcapek, M. (2008). Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A* 1202, 19–33.
- [2]Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, F., Ines, A., Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology* 144, 193–198.
- [3]Katoh, T., Koguchi, M., Saigusa, N., Teramoto, Y. (2011) Production and antioxidative activity of mead made from various types of honey and black rice (*Oryza sativa* var. Indica cv. Shiun). *Food Science and Technology Research* 17, 149–154.
- [4]Sroka, P., Tuszyński, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry* 104, 1250–1257.
- [5]Cavia, M.M., Fernandez-Muino, M.A., Gómez-Alonso, E., Montes-Perez, M.J., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2002). Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chemistry* 78, 157–161.
- [6]Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., BachirBey, M., Djoudad-Kadji, H., Louaileche, H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry* 121, 561–568.
- [7]Tewari, J., Irudayaraj, J. (2004). Quantification of saccharides in

multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 3237–3243.

[8] Paweł Sroka, Tadeusz Tuszynski, *Food chemistry* 104 (2007) 1250-1257

[9] Blanka Svecová, Miroslava Bordovská, Dagmar Kalvachová, Tomáš Hájek. (2015). Analysis of Czech meads: sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 38 80-88.

[10] Kime, R. W., McLellan, M. R., & Lee, C. Y. (1991). An improved method of mead production. *American Bee Journal*(June), 394–395.

[11] Winstetersteen, C.L., Andrae, L.M., & Engeseth, N.J. (2005). Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *Journal of Food Science*, 70(2), C119–C126

[12] Wzorek, W., Konieczna, E., Szymanowska, K., & Bugajewska, A. (1983). Optimization of honey wort fermentation in double mead technology. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2(1), 57–65.

[14] Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63, 549–562.

[15] Chavez-Servin, J.L., Castellote, A.I., López-Sabater, (2004). M.C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A* 1043, 211–215.

[16] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Gomes, A.M.P., Ferreira, M.A. (1998). Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydrate Polymers* 37, 225–229.

[17] Yuan, J.-P., Chen, F. (1999). Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection. *Food Chemistry* 64, 423–427.

[18] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

[19] J. Corley. (2003). Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. 60 – 74.