

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA

***Implementación del método para la determinación de Lactulosa
(4-O-β-D-Galactopiranosil-D-Fructuofuranosa) y HMF (5-
Hidroximetil-2-Furaldehído) en leches ultra-pasteurizadas (UHT)
por espectrofotometría ultravioleta-visible.***

Trabajo Final de Graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Química

Jeisson Alberto Cárdenas Miranda

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2015

DEDICATORIA

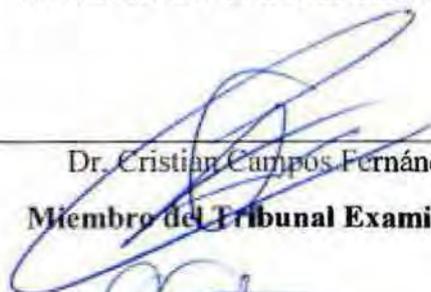
Dedico este trabajo en primera instancia a Dios por darme la vida, la fuerza y personas a mi alrededor que me han ayudado a llegar a este momento en mi vida. A mi madre por su sacrificio para brindarme todo lo necesario durante mi vida, así como a toda mi familia que de una u otra manera ha estado presente en todas las etapas de mi vida, ayudando y motivándome a seguir adelante. A mis amigos que al tenerlos alrededor han ayudado a forjar mi personalidad y han sido pilares en toda mi carrera.

Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado por la Escuela de Química, como requisito parcial para optar al grado y título de Licenciatura en Química.



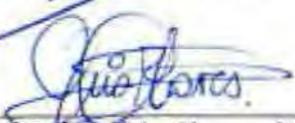
Dr. Javier Trejos Zelaya

Presidente del Tribunal Examinador



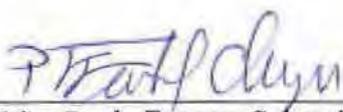
Dr. Cristian Campos Fernández

Miembro del Tribunal Examinador



Licda. Iris Chaves Salazar

Directora del Trabajo Final de Graduación



M.Sc. Paola Fuentes Schweizer

Lectora del Trabajo Final de Graduación



Licda. Susana Rodríguez Román

Lectora del Trabajo Final de Graduación



B.Q. Jeisson Alberto Cárdenas Miranda

Candidato

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana, gracias por su constante e incondicional apoyo emocional y además, por el aporte económico necesario que me permitió llevar a cabo este proyecto. La motivación de no defraudar su confianza ha sido pilar durante todo el tiempo de realización del proyecto. Gracias por haberme brindado todo, la vida, educación, formación intelectual y por hacerme la persona que soy hoy en día.

A la Licenciada en Química Iris Chaves por ser mi directora de tesis. Por brindarme todo lo necesario para llevar a cabo la investigación, por sus conocimientos su guía, dedicación y por la buena relación que mantenemos.

A la M.Sc. Paola Fuentes Schweizer por su incondicional apoyo, orientación y ayuda. Por su oportuna e invaluable colaboración siendo ficha clave y esencial en la realización de esta investigación, además, por la amistad brindada durante mis estudios, permitiendo ser una persona a quien acudir en momentos en que los he necesitado.

A la Licda. Susana Rodríguez Román por todos sus conocimientos, orientación, apoyo y respaldo durante el tiempo de realización de este proyecto.

A los compañeros de la Proveeduría de Química por ser una segunda familia. Un personal que me han apoyado, aconsejado y brindado la ayuda necesaria para mantener la motivación en mis estudios y en la finalización de este proyecto.

A los compañeros del Laboratorio de Calidad en el Coyo de la Cooperativa de Productos de Leche Dos Pinos R.L. por brindarme el espacio y facilitarme de manera inmediata los recursos que he necesitado para realizar la parte experimental del proyecto, así como su amistad.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	xi
CAPITULO 1: ANTECEDENTES	1
1.1. Producción de leche	1
1.2. Propiedades físicas de la leche	2
1.2.1. Apariencia	2
1.2.2. Densidad	2
1.2.3. Punto de congelación	2
1.2.4. Acidez	3
1.3. Componentes de la leche	3
1.3.1. Grasa	3
1.3.2. Proteínas	3
1.3.3. Enzimas	4
1.3.4. Lactosa	5
1.3.5. Vitaminas	5
1.3.6. Minerales y sales en la leche	5
1.4. Efectos del tratamiento térmico	6
1.4.1. Grasa	6
1.4.2. Proteínas	6
1.4.3. Enzimas	7
1.4.4. Lactosa	7
1.4.5. Vitaminas	8

1.4.6. Sales minerales	8
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO.....	9
CAPITULO 3: OBJETIVOS	14
3.1. <i>Objetivo general</i>	14
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	14
CAPITULO 4: SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	15
4.1. <i>Lactulosa</i>	16
4.1.1. Equipo, materiales y reactivos.....	16
4.1.2. Personal.....	16
4.1.3. Procedimiento	17
4.2. <i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i>	18
4.2.1. Equipo, materiales y reactivo.....	18
4.2.2. Personal.....	18
4.2.3. Procedimiento	18
4.3. <i>Validación de métodos</i>	20
4.3.1. Lactulosa.....	20
4.3.2. Hidroximetilfurfural.....	22
CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1. <i>Determinación de lactulosa en leche</i>	25
5.2. <i>Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en leche</i>	39
CAPITULO 6: CONCLUSIONES	53
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA	55
CAPITULO 8: ANEXOS	63
8.1. <i>Datos de validación</i>	63
8.1.1. Hidroximetilfurfural (HMF).....	63
8.1.2. Lactulosa.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro I: Composición de la leche en los diferentes seres vivos.

Cuadro II: ANOVA de dos vías para la concentración de lactulosa con respecto al tiempo y los lotes.

Cuadro III: ANOVA de dos vías para la concentración de HMF con respecto al tiempo y los lotes.

Cuadro IV: Datos para la primera curva de calibración de HMF.

Cuadro V: Datos para la segunda curva de calibración de HMF.

Cuadro VI: Datos para la exactitud en la determinación de HMF.

Cuadro VII: Datos para la precisión en la determinación de HMF.

Cuadro VIII: Datos para comparación de analistas en la determinación de HMF.

Cuadro IX: Datos para la primera curva de calibración de lactulosa.

Cuadro X: Datos para la segunda curva de calibración de lactulosa.

Cuadro XI: Datos para la exactitud en la determinación de lactulosa.

Cuadro XII: Datos para la precisión en la determinación de lactulosa.

Cuadro XIII: Datos para comparación de analistas en la determinación de HMF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del HMF (Tsao, 2014).

Figura 2: Estructura de la lactulosa (Hervas, 1993).

Figura 3: Formas anoméricas de la lactulosa presentes en la leche (Hervas, 1993).

Figura 4: Espectro de absorción de la lactulosa.

Figura 5: Curva de calibración de lactulosa.

Figura 6: Concentración de lactulosa para el lote #1 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 7: Concentración de lactulosa para el lote #2 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 8: Concentración de lactulosa para el lote #3 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 9: Concentración de lactulosa para el lote #3 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 10: Concentración de lactulosa al tiempo de 0 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 11: Concentración de Lactulosa al tiempo de 30 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 12: Concentración de lactulosa al tiempo de 60 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 13: Concentración de lactulosa al tiempo de 90 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 14: Concentración de lactulosa al tiempo de 120 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 15: Gráficas de residuales para la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

Figura 16: Interacción principal de las medias de la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

Figura 17: Interacción de las medias de la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

Figura 18: Límites en la homogeneidad de la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

Figura 19: Espectro de absorción del HMF.

Figura 20: Curva de calibración para el HMF.

Figura 21: Concentración de HMF para el lote #1 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 22: Concentración de HMF para el lote #2 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 23: Concentración de HMF para el lote #3 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 24: Concentración de HMF para el lote #4 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 25: Concentración de HMF al tiempo de 0 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 26: Concentración de HMF al tiempo de 30 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 27: Concentración de HMF al tiempo de 30 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 28: Concentración de HMF al tiempo de 90 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 29: Concentración de HMF al tiempo de 120 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica #1; 2: réplica #2; 3: réplica #3).

Figura 30: Gráficas de residuales para la concentración de HMF al variar el tiempo y los lotes.

Figura 31: Interacción principal de las medias de la concentración de HMF al variar el tiempo y los lotes.

Figura 32: Interacción de las medias de la concentración de HMF al variar tiempo y lote.

Figura 33: Límites en la homogeneidad de la concentración de HMF al variar el tiempo y los lotes.

Figura 34: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de HMF.

Figura 35: Linealidad, LD y LC obtenidos para la segunda curva de calibración de HMF.

Figura 36: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con once datos.

Figura 37: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con diez datos.

Figura 38: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con nueve datos.

Figura 39: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con ocho datos.

Figura 40: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con siete datos.

Figura 41: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con seis datos.

Figura 42: Linealidad, LD y LC obtenidos para la segunda curva de calibración de lactulosa con todos los datos.

LISTA DE ABREVIACIONES

AOAC: Association of Official Analytical Chemists- Asociación Oficial de Químicos Analíticos.

CVC: Carrusel de Validación de Calibración.

ECA: Ente Costarricense de Acreditación.

HMF: 5-Hidroximetil-2-Furaldehído o Hidroximetilfurfural.

HPAEC-PAD: High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection – Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alto Desempeño Acoplado con Detección Amperométrica de Pulso.

IDF: International Dairy Federation – Federación Internacional de Leche.

IEC: International Electrotechnical Commission – Comisión Internacional de Electrotécnica.

INTE (INTECO): Instituto Nacional de Tecnologías en la Comunicación.

INTE-ISO/IEC 17025:2005: Requerimientos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

ISO: International Standardization Organization - Organización Internacional de Estandarización.

Laboratorio: Laboratorio de Calidad de la Cooperativa de Productos de Leche Dos Pinos R.L.

LC: Límite de Cuantificación.

LD: Límite de Detección.

UHT: Ultra High Temperature.

UV: Ultravioleta.

CAPITULO 1: ANTECEDENTES

1.1. Producción de leche

La producción de leche para consumo se utiliza desde hace más de 6 000 años. Los animales productores de leche de hoy en día han evolucionado a partir de animales salvajes que vivieron durante miles de años, en hábitats de diferentes latitudes y altitudes, expuestos a distintas condiciones naturales, muchas veces severas y extremas (Bylund, 1995).

El hombre empezó a domesticar animales herbívoros que pudieran satisfacer las necesidades de leche, carne, vestido, etc. Por encima de los animales carnívoros que eran más peligrosos y más difíciles de manejar. Además, los animales herbívoros no competían con el hombre en su alimentación ya que generalmente, ingerían plantas que el hombre no podía utilizar. Hoy en día, se utilizan los mismos animales de entonces para la producción de leche, que desde hace miles de años ha constituido uno de los componentes esenciales de la dieta humana (Bylund, 1995).

La leche posee diversas definiciones dependiendo de la etapa de producción en que se encuentre o también del tratamiento que se le haya hecho. Como ejemplo la leche cruda es la obtenida directamente del animal no ha sufrido ningún proceso de higienización. Se define “leche” como la secreción mamaria normal de animales bovinos obtenido mediante el ordeño, sin ningún tipo de adición o extracción, si se trata de otro animal se debería especificar su origen (Reglamento Técnico: RTCR: 401-2006. Leche cruda y Leche Higienizada, 2006). La leche es el único alimento de los animales mamíferos durante el primer período de sus vidas. Los componentes de la leche que se muestran en el cuadro I, les proveen de energía y materiales estructurales que serán fundamentales para su crecimiento (Fennema, 2009).

Cuadro I: Composición de la leche en los diferentes seres vivos (Bylund, 1995).

Especie	% Proteína total	% Caseína	% Seroproteínas	% Grasa	% Carbohidratos	% Cenizas
Humana	1,2	0,5	0,7	3,8	7	0,2
Caballo	2,2	1,3	0,9	1,7	6,2	0,5
Vaca	3,5	2,8	0,7	3,7	4,8	0,7
Búfalo	4	3,5	0,5	7,5	4,8	0,7
Cabra	3,6	2,7	0,9	4,1	4,7	0,8
Oveja	5,8	4,9	0,9	7,9	4,5	0,8

1.2. Propiedades físicas de la leche

1.2.1. Apariencia

El aspecto opaco de la leche se debe a su contenido de partículas en suspensión de grasa, proteínas y ciertas sales minerales. El color varía desde blanco a amarillo, según la coloración de la grasa (determinada por el contenido de caroteno). La leche desnatada es más transparente, con un ligero tinte azulado (Nuñez, 2010).

1.2.2. Densidad

La leche de vaca varía entre 1,028 g/mL y 1,038 g/mL, dependiendo de su composición.

1.2.3. Punto de congelación

Varía entre -0,54 °C y -0,59 °C. Este es el único parámetro que nos permite detectar si hay una adulteración con agua. Cuando la leche se expone a un tratamiento a alta temperatura

(tratamiento UHT o esterilización), la precipitación de algunos fosfatos que se producen causará un aumento del punto de congelación (Nuñez, 2010).

1.2.4. Acidez

El valor de pH de un producto o una disolución representa la acidez. La leche normal es ligeramente ácida, con un pH entre 6,5- 6,7; siendo 6,6 el pH más usual. La temperatura de medida debe ser cercana a 25 °C (Bylund, 1995).

1.3. Componentes de la leche

Como se vio en el cuadro I, la leche está compuesta por un grupo de sustancias, entre las principales se encuentran: grasa, proteínas, lactosa, vitaminas, enzimas, sales y minerales.

1.3.1. Grasa

La leche y la nata son ejemplos de emulsiones de grasa en agua. La grasa de leche se presenta como pequeños glóbulos o gotitas dispersas en el suero de la leche. Su diámetro oscila entre 0,1 μm y 20 μm . El tamaño medio es de 3 μm - 4 μm , y se tienen unos 15 000 millones de glóbulos por mililitro. La grasa de la leche se compone por triglicéridos, di y monoglicéridos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, vitaminas y otros elementos en trazas y componentes minoritarios (Bylund, 1995).

1.3.2. Proteínas

Las proteínas son una parte esencial de nuestra dieta. Las proteínas que nosotros comemos son descompuestas en productos más simples por el sistema digestivo y por el hígado. Esos productos son entonces transportados hasta las células del cuerpo donde se utilizan como material de construcción de las proteínas de nuestro propio cuerpo. La gran mayoría de las reacciones químicas que tienen lugar en el organismo están controladas por ciertas proteínas activas, conocidas como enzimas (Douglas, et al.).

Las proteínas son moléculas gigantes formadas por aminoácidos. Una molécula de proteína consta de una o más cadenas entrelazadas de aminoácidos, donde éstos están dispuestos según un orden específico. Una molécula de proteína contiene normalmente alrededor de 100 a 200 aminoácidos unidos, pero también existen otras proteínas con números mayores y menores de aminoácidos (Galván, 2012).

La leche contiene varios tipos de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en muy pequeñas cantidades. Las proteínas pueden clasificarse de diversas formas según sus propiedades físicas o químicas, o sus funciones biológicas. El antiguo criterio de clasificación de las proteínas en caseína, albúmina y globulina ha sido cambiado en la actualidad por un sistema de clasificación más adecuado.

Seroproteína es un término utilizado con frecuencia como sinónimo de proteínas del suero de la leche, pero este término debería estar reservado para las proteínas existentes en el suero procedente de la fabricación de queso. Además, de las proteínas del suero de la leche, las proteínas del suero de quesería contienen fragmentos de moléculas de caseína. Las caseínas son fácilmente precipitadas en la leche por diversos procedimientos, mientras que las proteínas del suero normalmente permanecen en disolución. Las proteínas de las membranas de los glóbulos de grasa se adhieren, como su nombre indica, a la superficie de dichos glóbulos grasos y solamente se pueden separar mediante acciones mecánicas, tales como el batido de la nata en la fabricación de mantequilla (Galván, 2012).

1.3.3. Enzimas

Tienen la capacidad de modificar reacciones químicas, de afectar el curso y la velocidad de tales reacciones. Las enzimas cumplen su labor sin ser consumidas, ésta labor es específica, cada tipo de enzima cataliza exclusivamente un tipo de reacción.

Dos factores que influyen de forma importante sobre la acción enzimática son la temperatura y el pH. Las enzimas actúan normalmente entre 25 °C y 50 °C mientras que

entre 50 °C y 120 °C su actividad cae hasta que son desnaturalizadas completamente o se inactivan. La temperatura de inactivación varía dependiendo del tipo de enzima. Otro factor que afecta la eficacia de una enzima es el pH, algunas funcionan mejor ácidas, mientras que otras lo hacen mejor en medios alcalinos, específicamente dependen de la protonación o desprotonación del sitio activo de la enzima (Bylund, 1995).

1.3.4. Lactosa

La lactosa es un azúcar que se encuentra solamente en la leche y pertenece al grupo de los compuestos químicos orgánicos llamados carbohidratos. Estos son la fuente más importante de energía en nuestra dieta. La lactosa es un disacárido con una molécula que contiene los monosacáridos glucosa y galactosa. Cuando las bacterias lácticas atacan a la lactosa, la desdoblan en estos dos monosacáridos por la acción de la enzima llamada lactasa. Luego, otras enzimas de las bacterias lácticas atacan a la glucosa y a la galactosa convirtiéndolas a través de distintas reacciones intermedias en ácido láctico, principalmente. Las enzimas implicadas reaccionan con cierto orden, como lo que sucede cuando se produce la leche agria, en la que primero se produce la fermentación de la lactosa con formación de ácido láctico (Chávez, 2007).

1.3.5. Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos que están presentes en muy bajas concentraciones en animales y plantas. Son esenciales para el normal desarrollo de la vida. Su composición es compleja aunque conocida en la mayoría de los casos. La leche contiene muchas vitaminas, entre ellas la A, B₁, B₂, C y D. Las vitaminas A y D son solubles en grasa o en disolventes de la grasa, mientras que el resto son solubles en agua (Fennema, 2009).

1.3.6. Minerales y sales en la leche

La leche contiene una concentración total de minerales inferior al 1 %. Las sales minerales se encuentran disueltas en el suero de la leche o formando compuestos con la caseína. Las

sales más importantes son las de calcio, sodio, potasio y magnesio. Se encuentran como fosfatos, cloruros, citratos y caseinatos. Las sales de potasio y calcio son las más abundantes en la leche normal. Las cantidades de sales presentes en la misma no son constantes, dependen de la leche (Bylund, 1995).

1.4. Efectos del tratamiento térmico

Es importante el tratamiento térmico que se le hace a la leche para destruir los microorganismos patógenos que pudieran estar presentes en la misma. Este tratamiento térmico también provoca cambios en los componentes de la leche que dependen de la intensidad y el tiempo de la aplicación de la temperatura. Un breve calentamiento a una alta temperatura (UHT) puede tener el mismo efecto que un calentamiento a baja temperatura durante un prolongado periodo de tiempo. Por ello, la temperatura y el tiempo deben de considerarse en los tratamientos térmicos (Douglas et al., 1981).

1.4.1. Grasa

Al pasteurizar la leche a 70 °C - 80 °C durante 15 s, se da el fenómeno de la separación de la crema, el cual es evidente a los 74 °C. Se ha demostrado también la fuga de la grasa libre de los glóbulos grasos en cremas con 30 % de grasa, homogenizada y no homogenizada, cuando se calienta a temperaturas entre 105 °C y 135 °C.

Por encima de 135 °C las proteínas depositadas sobre las membranas de los glóbulos de grasa forman una red que comunica una cierta densidad a la membrana y la hace menos permeable. Por lo anterior, se recomienda realizar la homogenización a continuación de la esterilización UHT de productos con un alto contenido graso (Lange, 2010).

1.4.2. Proteínas

La proteína más importante de la leche es la caseína, que no se desnaturaliza por el calor dentro del ámbito normal de pH, sales y proteínas.

Las seroproteínas, por otro lado, particularmente la β -lactoglobulina que constituye alrededor del 50 % de las proteínas del suero de la leche, son claramente sensibles al calor. La desnaturalización comienza a 65 °C y casi se completa cuando las proteínas se calientan a 90 °C durante cinco minutos. La desnaturalización por calor de las seroproteínas es una reacción de tipo irreversible.

En la leche destinada a la elaboración de productos lácteos fermentados (como yogurt), la desnaturalización de las seroproteínas y la interacción con la caseína que se obtiene mediante un tratamiento a 90-95 °C durante 3-5 min contribuirá a mejorar la calidad ya que se reduce la sinéresis y mejora la viscosidad (Marconi et al., 2004).

La leche que se calienta a 75 °C de 20 a 60 s comenzará a saber y oler a “cocido”. Esto debido a la liberación de compuestos que contienen azufre provenientes de la β -lactoglobulina y otras proteínas sulfuradas (Douglas et al., 1981).

1.4.3. Enzimas

Las enzimas pueden ser inactivadas por calentamiento. La temperatura de inactivación varía según el tipo de enzima.

Existen algunas bacterias, actualmente muy citadas entre la flora de deterioro de la leche cruda almacenada y refrigerada y de los productos lácteos tratados con calor, que tienen enzimas lipolíticas y proteolíticas extremadamente resistentes al calor. Solo una parte de su actividad es inhibida por la pasteurización o tratamiento UHT de la leche (Muniategui & Ferna, 1998).

1.4.4. Lactosa

La lactosa experimenta cambios más visibles cuando está en la leche que cuando se encuentra como sólido seco. A temperaturas por encima de 100 °C se produce una reacción entre la lactosa y las proteínas, produciéndose un pardeamiento de la leche. Esta serie de

reacciones, que ocurren entre los grupos amino de los residuos de aminoácidos y los grupos aldehído de los carbohidratos de la leche, se llama reacción de Maillard o reacción de pardeamiento. Se produce un pardeamiento u oscurecimiento del producto y un cambio del sabor junto a una pérdida de valor nutritivo, concretamente se produce una pérdida de lisina, que es uno de los aminoácidos esenciales (Kokkinidou & Peterson, 2014).

1.4.5. Vitaminas

La vitamina C es la más sensible al calor, especialmente en presencia de aire y de ciertos metales. La pasteurización en un intercambiador de calor de placas puede, sin embargo, llevarse a cabo sin prácticamente ninguna pérdida de vitamina C. Las otras vitaminas presentes en la leche apenas si sufren con calentamientos moderados (Fennema, 2009).

1.4.6. Sales minerales

De las sales minerales presentes en la leche, sólo el hidroxifosfato cálcico ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), que se encuentra en las micelas de caseína, se ve afectado por el calentamiento. Cuando se calienta por encima de los 75 °C pierde agua y forma ortofosfato cálcico insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), que altera las propiedades queseras de la leche. Por ende es muy importante seleccionar cuidadosamente la intensidad del tratamiento térmico (Bylund, 1995).

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

La leche contiene componentes únicos que la hacen imprescindible para una correcta nutrición, tales como agua (87,0 g/ 100mL), proteínas (3,5 g/ 100mL), carbohidratos (4,8 g/100 mL), lípidos (4,0 g/ 100 mL), vitaminas y minerales, las cifras son valores medios para las leches de vaca, ya que la composición de la leche de las diversas especies está influida por diferentes factores de producción, manejo, cría, alimentación, clima, y otros. El constituyente más característico y que la distingue de cualquier otro alimento es el carbohidrato lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa) (Bylund, 1995). Dada su composición, la leche no sólo es un excelente alimento para el hombre sino también un caldo de cultivo ideal para bacterias y otros microorganismos; por ello, se hace necesario asegurar que la leche que se vende para el consumo humano sea un producto íntegro que conserve bien su calidad. Para lograr esto, se deben desarrollar sistemas de manejo y procesado que destruyan todos los microorganismos patógenos y prolonguen la vida útil del producto; el método más eficaz es el tratamiento térmico (pasteurización, ultrapasteurización (UHT) y esterilización) (Galván, 2012).

La pasteurización UHT (Ultra High Temperature – Ultra Alta Temperatura) es un proceso diferente al de pasteurización normal. La pasteurización convencional se lleva a cabo al calentar la leche a 71,7 °C por 15 s y un rápido enfriamiento, lo que permite eliminar la mayoría de microorganismos patógenos. Sin embargo, hay virus y bacterias que sobreviven estas condiciones, lo que provoca una variación en la calidad de la leche durante el almacenamiento. Ahora, para llevar a cabo un proceso más drástico que elimine estos microorganismos se lleva a cabo la pasteurización UHT, la cual, consiste en calentar la leche al menos hasta 130 °C por un segundo. Este proceso hace que la leche mantenga su calidad nutricional hasta por 180 días (Douglas et al., 1981).

A pesar de que los tratamientos térmicos son necesarios para garantizar una leche de óptima calidad, tienen como desventaja que pueden ocasionar una serie de modificaciones en los

componentes de la misma. Al aplicar altas temperaturas en estos procesos, se pueden modificar las proteínas de la leche por desnaturalización y reducción de solubilidad de las mismas. Estos cambios que se dan al aplicar estos procesos térmicos son importantes para determinar si la leche pierde su valor nutricional. Se han reportado varios tipos de efectos sobre las proteínas que se encuentran en la leche. La caseína es una de estas proteínas que puede variar con el uso de altas temperaturas. Se ha notado que a pH neutro o menor, la disminución en la solubilidad de la caseína es muy notable, mientras que a pH mayores de 7 también se da una disminución pero no tan marcada. De igual manera se observó una relación similar en cuanto a la viscosidad, pues al ir aumentando la temperatura se nota que la viscosidad de las leches ultrapasteurizadas disminuye comparadas con las leches a las cuales se les efectuó el proceso de pasteurización normal (Meltretter, Schmidt, Humeny, Becker & Pischetsrieder, 2008).

Sin embargo, al cuantificar la cantidad de proteína total que se encuentra dentro de la leche después de todo el tratamiento y al calcular los gramos de lisina por cada 100 g de proteína total se ha reportado que no hay diferencia significativa entre la leche recién salida de la vaca, la pasteurizada y la ultrapasteurizada UHT, con lo cual se determina que los procesos no disminuyen la calidad nutricional de la leche y si la ayudan a mantenerla en buen estado por mucho más tiempo (Bylund, 1995).

Se menciona que la descomposición de la D-glucosa durante el calentamiento en disoluciones acuosas, conlleva a la formación de otros productos. Por ejemplo, se ha estudiado mucho la relación de la descomposición que provoca formación de compuestos coloreados debido a la presencia de aminoácidos. También se observó, la ausencia o presencia de aminoácidos por acción del oxígeno sobre disoluciones calientes de glucosa. Se ha visto que algunos reactivos alcalinos llevan a la formación de pequeñas cantidades de metilglioxal, mientras que reactivos ácidos diluidos generan pequeñas cantidades de uno de los compuestos de interés, el 5-hidroximetil-2-furaldehído o hidroximetil furfural (HMF), el cual es un precursor de la coloración café en la leche (Mendoza, Olano, & Villamiel,

2005). La formación de este compuesto puede ser monitoreada mediante espectrofotometría ya que este compuesto presenta una intensa banda de absorción en la región UV en aproximadamente 285 nm debido al movimiento electrónico de un sistema conjugado (figura 1), lo que permite que se puedan cuantificar las pequeñas cantidades formadas. Una disolución de glucosa de aproximadamente 16,7 mg/ L calentada por una hora en agua a ebullición puede producir 6 mg de HMF por kg glucosa. Si las disoluciones se calientan 2 ½ h y 7 h, conllevan la formación de 15 mg/ kg y 770 mg/ kg respectivamente, este último, presenta un color visible al ojo humano (Nikolov & Yaylayan, 2011).

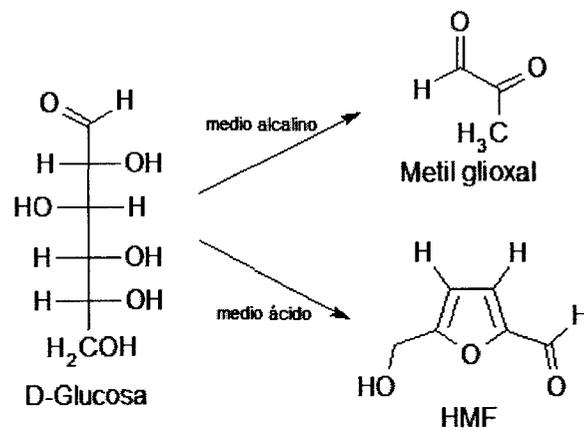


Figura 1: Estructura del HMF (Tsao, 2014).

Hay más compuestos que se forman por el tratamiento con altas temperaturas, como la furosina que se genera por la hidrólisis ácida del compuesto Amadori (Lactulosil-Lisina) y el otro compuesto de interés: la lactulosa (disacárido formado por la isomerización de la lactosa). La presencia de sales en leches con Ca²⁺ y Mg²⁺ pueden afectar el proceso de isomerización de la lactosa durante la aplicación de calor en el proceso (Adachi, 1965). Además, como la concentración de lactulosa depende de la cantidad de lactosa, se ha concluido que la presencia de lactosa en la leche cruda juega un papel importante en la formación de la lactulosa (Cardelle-Cobas, Corzo, Villamiel, & Olano, 2008).

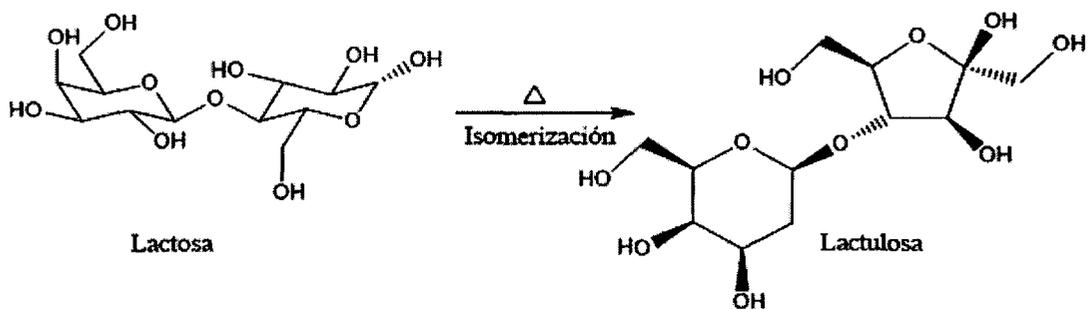


Figura 2: Estructura de la lactulosa (Hervas, 1993).

La lactulosa también es un compuesto que presenta una banda de absorción en la región visible en aproximadamente 425 nm debido a que la unión 1 - 4 entre los dos monosacáridos, galactosa y fructosa, hace posible que existan cinco formas anoméricas de la lactulosa como tal (figura 3). Con base en esto la técnica espectrofotométrica UV - Vis resulta muy cómoda para la determinación y cuantificación de ambos componentes en las muestras. Esta técnica es de las mejores para realizar este proceso, pues desafortunadamente otros métodos químicos que se han publicado consumen demasiado tiempo o son muy susceptibles a errores causados por la interferencia de contaminantes (Marconi et al., 2004).

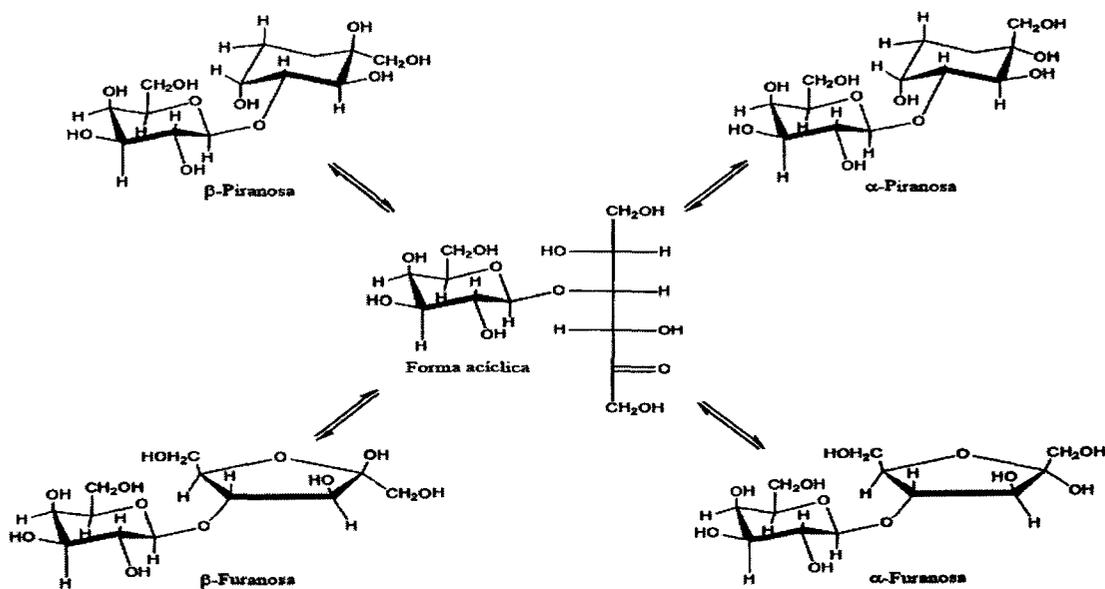


Figura 3: Formas anoméricas de la lactulosa presentes en la leche (Hervas, 1993).

La IDF (International Dairy Federation – Federación Internacional de Lechería) propuso a la lactulosa como un indicador adecuado para distinguir entre leche pasteurizada, leche UHT y leches esterilizadas. Las muestras comerciales tienen concentraciones de lactulosa cerca de 40 mg/ 100 mL y la IDF estableció como límite una concentración de 60 mg/ 100 mL, si poseen una concentración superior son clasificadas como leches con tratamiento UHT, aunque todavía se encuentra en debate que tan crítico debería ser este valor.

Muchos autores han concordado en que el principal problema para cuantificar la lactulosa, es la alta concentración de lactosa en la leche. La IDF también propuso un método de cromatografía líquida, sin embargo, ni éste ni ninguno similar es lo suficientemente viable para las determinaciones de bajas concentraciones de lactulosa en la leche debido a su limitada capacidad de separación (Cataldi, Angelotti & Bufo, 1999).

También se propuso la técnica de HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection – Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alto Desempeño Acoplado con Detección Amperométrica de Pulso), el cual demostró que el uso de una columna fuerte de intercambio aniónico permite separaciones rápidas y eficaces de la lactulosa y otros carbohidratos comunes presentes en la leche. Pero ésta técnica puede volverse poco eficiente pues se tendrían que hacer demasiadas corridas para analizar todas las muestras (Cataldi et al., 1999).

Por ende, el mejor método para realizar este proyecto es mediante espectrofotometría UV, pues ambos compuestos presentan bandas de absorción fuertes, las interferencias pueden ser eliminadas fácilmente y es una técnica rápida y económica.

En el Laboratorio se trabaja bajo Norma INTE–ISO/IEC 17025:2005 para laboratorios de ensayo y/o calibración, la cual, se refiere a los requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo que se deben cumplir para demostrar que se dispone de un sistema de gestión de la calidad. Esta norma pide la validación de los métodos de análisis que se implementan.

CAPITULO 3: OBJETIVOS

El presente trabajo pretendió determinar si las leches sometidas a procesos de pasteurización tipo UHT poseen la calidad nutricional requerida y no fueron dañadas por el tratamiento a alta temperatura.

Los objetivos propuestos son:

3.1. Objetivo general

Implementar y validar los métodos de medición de las concentraciones de HMF y lactulosa en leche semidescremada (2 % grasa) sometida al proceso de ultra pasteurización, con el fin de establecer indicadores de su calidad nutricional.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Elaborar un protocolo para el manejo del equipo y de la metodología del método analítico.

3.2.2. Implementar los métodos para la determinación de HMF y lactulosa en la leche semidescremada 2 % UHT, así como comparar y discutir los procedimientos base y los implementados.

3.2.3. Validar los métodos de determinación de HMF y lactulosa por espectrofotometría ultravioleta visible, mediante los parámetros establecidos en la Guía para Validación de Métodos del ECA.

3.2.4. Determinar el contenido de HMF y lactulosa en cuatro lotes diferentes de producción durante 4 meses de almacenamiento a una temperatura de 24 °C.

CAPITULO 4: SECCIÓN EXPERIMENTAL

Todos los procedimientos descritos en el presente capítulo provienen de literatura científica específica del tema, así como de normas y procedimientos estipulados a nivel internacional.

Se implementó la documentación de un protocolo de manejo del equipo y se usó como guía para el uso del espectrofotómetro UV-Visible marca Termo Spectronic, Helios Alpha-N°UVA 110418. Para ello se tomó el Manual del Usuario y se resumieron los pasos más importantes de cómo usar el equipo, esto de acuerdo al formato que tienen los otros equipos del Laboratorio (Helios Alpha & Beta, 2000).

Esto se realizó ya que todos los equipos usados en el Laboratorio tienen su debido instructivo de uso. Es importante escribir un protocolo para que todos los integrantes del Laboratorio lo puedan usar con facilidad.

Se utilizaron leches semidescremadas (2 % grasa) y ultrapasteurizadas (UHT). Las muestras fueron tomadas a partir de una línea de producción en salida, de tanques de vía directa, luego se almacenaron en un cuarto con aire acondicionado a 20 °C hasta su medición en el tiempo requerido. También se almacenaron muestras en un cuarto frío a 4 °C para comparar el efecto de la temperatura de almacenaje.

Las muestras se tomaron de 4 diferentes lotes de producción en 4 semanas consecutivas, se tomaron 30 muestras por lote, incluyendo algunas de respaldo. De éstas, 6 muestras se almacenaron a una temperatura de control de 4 °C y las restantes a temperatura ambiente, 24 °C. Las mediciones se realizaron en un tiempo inicial de cero y luego, cada 30 días durante 4 meses, tomando datos al tiempo de 0, 30, 60, 90 y 120 días respectivamente. Se determinó la concentración de lactulosa y HMF a 4 muestras por lote en cada periodo de tiempo: 3 de las almacenadas a temperatura ambiente (24 °C) y 1 a temperatura control de 4 °C (Madriz, 2010).

El muestreo se hizo en el primer mes de trabajo, mientras que el análisis fue en días consecutivos, en el primero se hizo la determinación de HMF y además, se dejó listo el tratamiento previo para la determinación de lactulosa que se completó al siguiente día.

Para la extracción y análisis espectrométrico de HMF y lactulosa se siguió el procedimiento descrito en los artículos de Rada (Rada & Rojas, 2008). Se realizaron modificaciones de acuerdo a la adaptación del lugar de trabajo y al equipo disponible. Esta variación incluye el uso de equipo volumétrico y también la preparación de baños maría. En el caso de las muestras la única modificación al procedimiento de Rada, es que han sido almacenadas a 24 °C, mientras que otras muestras usadas como control serán almacenadas a 4 °C.

4.1. Lactulosa

4.1.1. Equipo, materiales y reactivos

- Espectrofotómetro UV-Visible, marca Termo Spectronic, Helios Alpha-N°UVA 110418. Lactulosa 4-O-β-D-Galactopiranosil-D-fructuofuranosa 95 %, Sigma Aldrich, artículo L7877-25G, lote: 011M0093V.
- Antrona grado ACS, Merck KGaA, artículo: 1.01468.0010, lote: 536092.
- Lactulosa 4-O-β-D-Galactopiranosil-D-fructuofuranosa 95 %, Sigma Aldrich, artículo L7877-25G, lote: 011M0093V.
- Etanol absoluto, Merck KGaA, artículo: 1.00983.2500, lote: UN 1170.
- Ácido Acético grado ACS, Fisher Scientific, artículo: A38^C-212, lote: UN 2789.
- Acido o-Fosfórico 85,7 % Mallinckrodt, artículo: 2729, lote: 2796 KJHH.
- Metanol Absoluto, Fisher Scientific, artículo: UN1230, lote 142424.

4.1.2. Personal

Jeisson Cárdenas Miranda, Bachiller en Química.

Eduardo Ramírez Meléndez, Bachiller Laboratorista Químico.

4.1.3. Procedimiento

4.1.3.1. Condiciones Ambientales

La temperatura ambiente debe encontrarse en el rango de 20 °C a 25 °C.

Se miden 3 muestras almacenadas a temperatura ambiente y una bajo refrigeración a temperatura de 4 °C.

4.1.3.2. Preparación de reactivos

- Reactivo de antrona: se pesa 0,2 g de antrona ($C_{14}H_{10}O$), se agregan 6 mL de ácido acético glacial, se calienta levemente hasta disolver, se agregan 12 mL de etanol absoluto y 2,8 mL de ácido o-fosfórico concentrado. Este reactivo se debe preparar en el momento de análisis debido a que al almacenarse a temperatura ambiente la antrona cristaliza.

4.1.3.3. Medición de muestras

- Se miden con micropipeta 1,00 mL de la muestra de leche en un tubo para centrífuga.
- Se agregan con micropipeta 9,00 mL de metanol absoluto.
- Se agita en vortex por un minuto y se deja reposar en la refrigeradora de 1 a 2 días.
- Se extraen con micropipeta 0,2 mL del líquido supernatante, se mezclan con 4 mL de etanol absoluto y 0,5 mL del reactivo de antrona en un vial de 10 mL.
- El vial se pone en baño de agua hirviendo con una plantilla hasta que se evapore la mayoría del líquido y se forme un residuo amarillo (dejar 5 minutos y sacar el vial).
- Se deja enfriar y se disuelve el producto con 6 mL de ácido acético glacial.
- Se mide la muestra por triplicado con respecto a su blanco en el espectrofotómetro a una longitud de 433 nm.
- La fórmula empleada para obtener la concentración de lactulosa es:

$$C_{n\text{lactulosa}} = \frac{(A - b)}{m}$$

Donde:

A = Absorbancia

m = Pendiente en la curva de calibración

b = Intercepto en curva de calibración

4.2. Hidroximetilfurfural (HMF)

4.2.1. Equipo, materiales y reactivo

- Espectrofotómetro UV-Visible, marca Termo Spectronic, Helios Alpha-N°UVA 110418.
- 5-Hidroximetil-2-Furaldehído 99 %, Sigma-Aldrich, artículo: H40807, lote: BCBF61278.
- Sulfato de Zinc heptahidratado grado ACS 99 %, Sigma-Aldrich, artículo: 221376 500 G, lote: MKBH1967V.
- Hexacianoferrato (II) de Potasio trihidratado grado ACS 98,5 % - 102,0 %, Sigma-Aldrich, artículo: P3289 – 500G, Lote: 110M0152V.

4.2.2. Personal

Jeisson Cárdenas Miranda, Bachiller en Química.

Eduardo Ramírez Meléndez, Bachiller Laboratorista Químico.

4.2.3. Procedimiento

4.2.3.1. Condiciones Ambientales

La temperatura ambiente debe estar en el rango de 20 °C a 25 °C. Se miden 3 muestras almacenadas a temperatura ambiente y una bajo refrigeración a temperatura de 4 °C.

4.2.3.2. Preparación de reactivos

- Ferrocianuro de potasio trihidratado al 15 %: se disuelven 15 g de ferrocianuro de potasio trihidratado en 100 mL de H₂O destilada.
- Sulfato de zinc heptahidratado al 14,4 %: se disuelven 14,4 g de sulfato de zinc heptahidratado en 100 mL de H₂O destilada.
- Estos reactivos se pueden preparar y mantener en refrigeración por seis meses.

4.2.3.3. Medición de muestras

- Se miden con micropipeta 2,00 mL de la muestra de leche en balón de 25,00 mL.
- Se afora a 25,00 mL con H₂O destilada, se agita hasta asegurar que la disolución sea uniforme.
- En un tubo de centrifuga se añaden con micropipeta 5,00 mL de ésta disolución, 0,5 mL de la disolución de ferrocianuro de potasio trihidratado al 15 %, 0,5 mL de la disolución de sulfato de zinc heptahidratado al 14,4 %.
- Se agita el tubo en un vortex durante 5 minutos.
- El tubo se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos.
- Se toma la mayor parte del líquido sobrenadante y se filtra al vacío con papel filtro Whatman # 42 diámetro 90 mm.
- Del filtrado medir con micropipeta 1,00 mL y añadirlos a un balón de 10,00 mL.
- Se afora a 10,00 mL con H₂O destilada, agite hasta asegurar que la disolución sea uniforme.
- Se mide la muestra por triplicado con respecto a su blanco en el espectrofotómetro a una longitud de 284 nm.
- La fórmula empleada para obtener la concentración de HMF es:

$$C_{\text{HMF}} = \frac{(A - b)}{m}$$

Donde:

A = Absorbancia

m = Pendiente en la curva de calibración

b = Intercepto en curva de calibración

4.3. Validación de métodos

El objetivo de esta validación es lograr determinar la cantidad de lactulosa y HMF presentes en leches semidescremadas (2 % grasa) y ultrapasteurizadas (UHT) mediante un método confiable y accesible. Como alcance para estandarizar el método se determinarán parámetros que servirán como criterio de confianza del método analítico. Dentro de estos se realizaron pruebas de linealidad, precisión, LD, LC y exactitud.

Como parte de la validación el procedimiento lo realizará un analista más, los resultados obtenidos se pueden comparar mediante un análisis de varianzas para así comprobar que no haya diferencia entre los datos obtenidos por cada analista.

Con base en todos los datos recolectados se realizará un informe de validación del método, en el cual se incluyen todos los resultados detalladamente y los criterios de conformidad de cada uno de los métodos (ECA, 2010; Eurachem, 2005).

4.3.1. Lactulosa

Linealidad. Se realizaron dos curvas de calibración, una al principio, poco antes de empezar a medir las muestras y la otra al final, después de que se miden las muestras.

El ámbito de las concentraciones fue aproximadamente de 0,084 mg/mL a 1,05 mg/mL. Primero se prepararon 100 mL de una disolución madre cercana a 2 mg/mL a partir del reactivo de lactulosa descrito en la sección 4.1.1. Se pesó aproximadamente 0,2 mg de lactulosa, se disolvió y se llevó a 100,00 mL en un balón aforado.

De esta disolución madre se tomó la alícuota necesaria para preparar el patrón requerido y se llevó a 25,00 mL con agua destilada en balón aforado (ver cuadro en anexos 8.1.2.). El procedimiento se realizó una vez para cada patrón y la medida de absorbancia se hizo por duplicado. Con base en la curva se obtuvo el coeficiente de correlación entre los patrones mediante la recta de mejor ajuste, así como la absortividad molar del analito de interés mediante su pendiente. Además, se realizó un análisis de regresión para calcular las incertidumbres de la pendiente y el intercepto.

A ambas curvas se les realizó un análisis de residuales para corroborar que los patrones tengan una correlación adecuada. Además, se comparó los valores de las pendientes mediante el ámbito que abarca cada una para comprobar si son diferentes entre sí.

Precisión. Se tomaron tres muestras y se hizo el análisis de las muestras recién salidas de producción. Se determinaron 10 réplicas de sus concentraciones a las cuales se les calculó el coeficiente de variación. El cliente acepta un coeficiente de variación menor al 10 %, esta medida permite evaluar la calidad estadística de las estimaciones. Si se reporta un valor menor al 7 % se considera precisa, entre 8 % y 14 % significa que existe una precisión aceptable, entre 15 % y 20 % la estimación es poco precisa y se debe utilizar con precaución y mayor a un 20 % indica que la estimación es poco precisa, por lo tanto, se debería utilizar solo para fines descriptivos (Feinberg, 2007).

$$\%CV = \frac{S_x}{\bar{x}} * 100$$

La muestra se midió en el tiempo cero proveniente del tanque por vía directa con almacenaje a temperatura entre 20 °C y 25 °C.

Exactitud. Se determinó en términos de porcentaje de recuperación, se hizo una adición estándar a un patrón.

Para preparar el patrón, se tomó la alícuota necesaria para ajustar la concentración del patrón requerido (3,00 mL de 0,2039 mg/mL de lactulosa), luego se añadió la cantidad de muestra que se utilizó normalmente en el análisis (1 mL), esta mezcla se lleva a 25,00 mL en balón aforado.

A esta disolución preparada se le realizó el procedimiento de análisis de muestra descrito en la sección 4.1.3.3 de la metodología, se le determinó la absorbancia y asimismo su concentración.

Se comparó la concentración obtenida con la concentración esperada y se determinó un porcentaje de recuperación, para métodos analíticos se aceptan valores entre 80 % y 110 %, sin embargo, el cliente acepta un 90 % de recuperación (Feinberg, 2007).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}} * 100$$

LD y LC. Se determinaron simultáneamente a partir del análisis de la gráfica de los patrones con su respectiva correlación mediante el programa estadístico SMAC el cual nos brindó estos valores de forma sistemática.

Prueba F. Se realizó el procedimiento en la sección 4.1.3.3 para una muestra. Se realizaron 12 réplicas y se le determinó su varianza al análisis. Seguidamente otro analista realizó el mismo procedimiento para la misma muestra con 7 réplicas. Para el primer analista se tuvieron 11 grados de libertad mientras que para el segundo se tuvieron 6 grados de libertad, para lo cual se reporta una F crítica de 3,09 (Miller & Miller, 2002).

4.3.2. Hidroximetilfurfural

Linealidad. Se realizaron dos curvas de calibración una al principio, poco antes de empezar a medir las muestras y la otra al final, después de que se midieran las muestras.

El ámbito de las concentraciones fue aproximadamente entre 0,0021 mg/mL y 0,015 mg/mL. Primero se preparó 1 L de una disolución madre cercana a 0,1 mg/mL a partir del reactivo de HMF descrito en la sección 4.2.1 Se pesó aproximadamente 0,1 g de HMF, se disolvió y se llevó a 1 L en un balón aforado.

De esta disolución madre se tomó la alícuota necesaria para preparar el patrón requerido y se lleva a 50,00 mL con agua destilada en balón aforado (ver cuadro en anexo 8.1.1). Cada patrón se preparó una vez y la medida de absorbancia se realizó por triplicado. Con base en la curva se obtuvo el coeficiente de correlación entre los patrones mediante la recta de mejor ajuste, así como la absortividad molar del analito de interés mediante su pendiente. Además, se efectuó un análisis de regresión para calcular las incertidumbres de la pendiente y el intercepto.

A ambas curvas se les realizó un análisis de residuales para corroborar que los patrones tuvieran una correlación adecuada y además se compararon los valores de las pendientes mediante el ámbito que abarca cada una y se comprobaron si eran diferentes entre sí (Feinberg, 2007).

Precisión. Se tomó tres muestras y se hizo el análisis de las muestras recién salidas de producción. Se determinaron 10 réplicas de sus concentraciones a las cuales se les calculó el coeficiente de variación. El cliente acepta un coeficiente de variación menor al 10 %, ésta medida permite evaluar la calidad estadística de las estimaciones. Si se reporta un valor menor al 7 % se considera precisa, entre 8 % y 14 % significa que existe una precisión aceptable, entre 15 % y 20 % la estimación es poco precisa y se debe utilizar con precaución y mayor a un 20 % indica que la estimación es poco precisa, por lo tanto, se debería utilizar solo para fines descriptivos (Feinberg, 2007).

$$\% CV = \frac{S_x}{\bar{x}} * 100$$

La muestra se midió en el tiempo cero provenientes del tanque por vía directa con almacenaje a temperatura entre 20 °C y 25 °C.

Exactitud. Se determinó en términos de porcentaje de recuperación, se hizo una adición estándar a un patrón.

Se preparó el patrón de 0,0123 mg/ mL, de este se tomó 5,00 mL, se añadió 2,00 mL de la muestra de leche y se aforó a 25,00 mL con H₂O destilada. A esta disolución preparada se le realiza el procedimiento de análisis de muestra descrito en la sección 4.2.3.3, de la metodología, se le determina la absorbancia y asimismo su concentración.

Se compara la concentración obtenida con la concentración esperada y se determina un porcentaje de recuperación, al cual, el cliente acepta un 90 % de recuperación.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenida}}}{C_{\text{esperada}}} * 100$$

LD y LC. Se determinaron simultáneamente a partir del análisis de la gráfica de los patrones con su respectiva correlación mediante el programa estadístico SMAC el cual nos brindó estos valores de forma sistemática.

Prueba F. Se realizó el procedimiento en la sección 4.2.2.3 para una muestra. Se realizó 10 réplicas y se le determinó su varianza al análisis. Seguidamente otro analista realizó el mismo procedimiento para la misma muestra con 7 réplicas. Para el primer analista se tuvo 9 grados de libertad mientras que para el segundo 6 grados de libertad, para lo cual se reporta una F crítica de 4,1 (Miller & Miller, 2002).

CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. *Determinación de lactulosa en leche*

Antes de empezar el análisis es muy importante comprobar la longitud de onda de mayor absorbancia para la lactulosa. La literatura reporta un pico máximo de absorción en 425 nm lo que corresponde a la región visible del espectro. Para comprobar los resultados se hizo un barrido que abarcara cercanamente a esta longitud de onda tomando uno de los patrones hechos para determinar la linealidad, esto se demuestra en la figura 4.

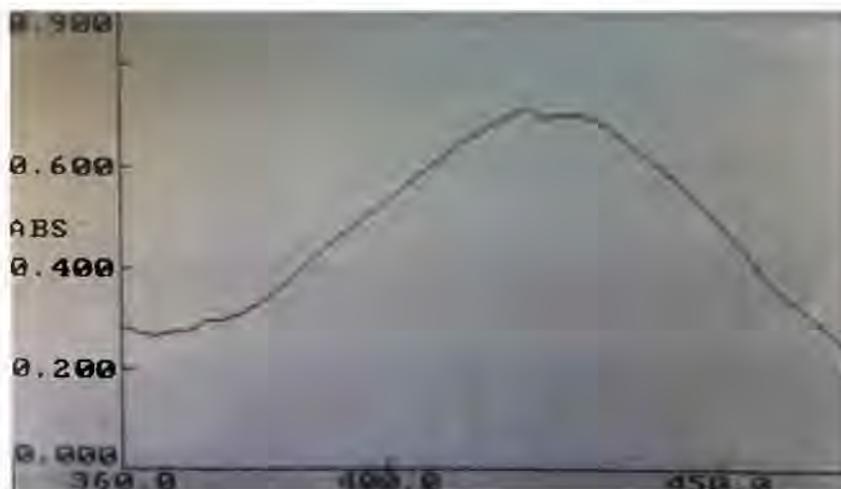


Figura 4: Espectro de absorción para un patrón de concentración intermedia de lactulosa.

El pico máximo obtenido fue a los 433 nm lo cual es muy cercano a lo reportado, en cuanto a la lactulosa se trabajó siempre con esta longitud de onda para todos los parámetros de validación así como en la medición de las muestras. Esta longitud de onda se corroboró al final del análisis de muestras para comprobar que no había variado y que el análisis se realizó de forma correcta.

Con base en los patrones preparados y las absorbancias medidas se obtuvo la curva de calibración descrita en la figura 5.

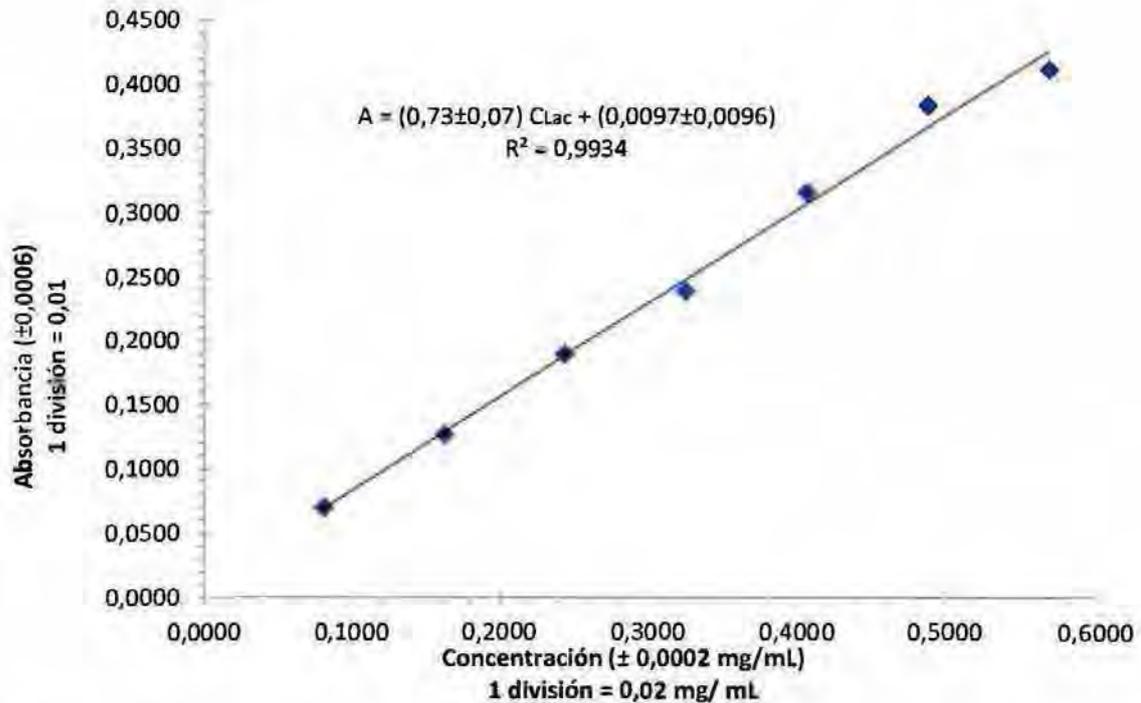


Figura 5: Curva de calibración de lactulosa a 433 nm mediante la formación de un complejo coloreado con antrona.

En el anexo 8.2.2 se puede observar ambas curvas, al comparar las pendientes se ve como ambas son iguales, si se abarca el ámbito brindado por la incertidumbre de cada una. Se realizaron 11 patrones para tener un mayor grupo de datos a comparar.

Es importante mencionar que anterior a lo obtenido se hizo un ámbito más amplio de concentraciones, sin embargo, se pudo apreciar como a concentraciones superiores a 1,2 mg/mL se perdía la linealidad totalmente y se aleja mucho de la zona en que se encuentra la concentración de la muestra, por esta razón se escogió una cantidad de datos menor. Inclusive también con once patrones la linealidad se distorsionaba un poco por lo que se

realizó un estudio con las diferentes cantidades de puntos (ver anexo 8.2.2) y se obtuvo que la condición óptima es esta que se muestra con siete puntos.

Realizando el ajuste lineal por el criterio de los mínimos cuadrados, para cada una de las gráficas se obtiene la misma ecuación y el mismo valor para el coeficiente de correlación. A la vista del resultado analítico se puede afirmar que el ajuste del modelo es bueno, ya que el valor de $R^2 = 0,99$ es cercano a 1 (Feinberg, 2007).

Al determinar la precisión mediante el análisis de 10 réplicas de una muestra se obtuvo un coeficiente de variación cercano a 9 %, mientras que el cliente expresa satisfacción con un coeficiente menor a 10 %, por lo que sí se obtiene un valor aceptado (Feinberg, 2007).

En cuanto a la exactitud, se analizaron los resultados de 10 réplicas de un mismo procedimiento. Se hizo una adición conocida a la muestra y se determinó el porcentaje de recuperación como se mencionó en la metodología. Los porcentajes obtenidos se encuentran entre 93 % y 99 % (ver anexo 8.2.2). La empresa requería un porcentaje de recuperación superior a 90 %, por lo que también se cumplió con este requisito de la validación (Madriz, 2010).

Como se había mencionado el LC y el LD se determinaron simultáneamente de la curva, utilizando el programa estadístico SMAC. Se obtuvo que el LC fue de 0,0652 mg/mL y el LD 0,0340 mg/mL.

Con el análisis de varianzas se obtuvo una F crítica de 1,83; ésta es menor a la F tabulada (3,09), por lo que, se concluye que se retiene la hipótesis nula que expresa que no hay diferencia significativa entre los analistas.

En el anexo 8.2.2 se ven las medidas obtenidas para cada una de las partes de la validación en el procedimiento de la determinación de lactulosa, también sus cálculos y los resultados expresados anteriormente.

Después de validar el método se determina la cantidad de lactulosa presente en las muestras de leches con el proceso UHT y se obtienen los resultados que se observan de la figura 6 a la 9.

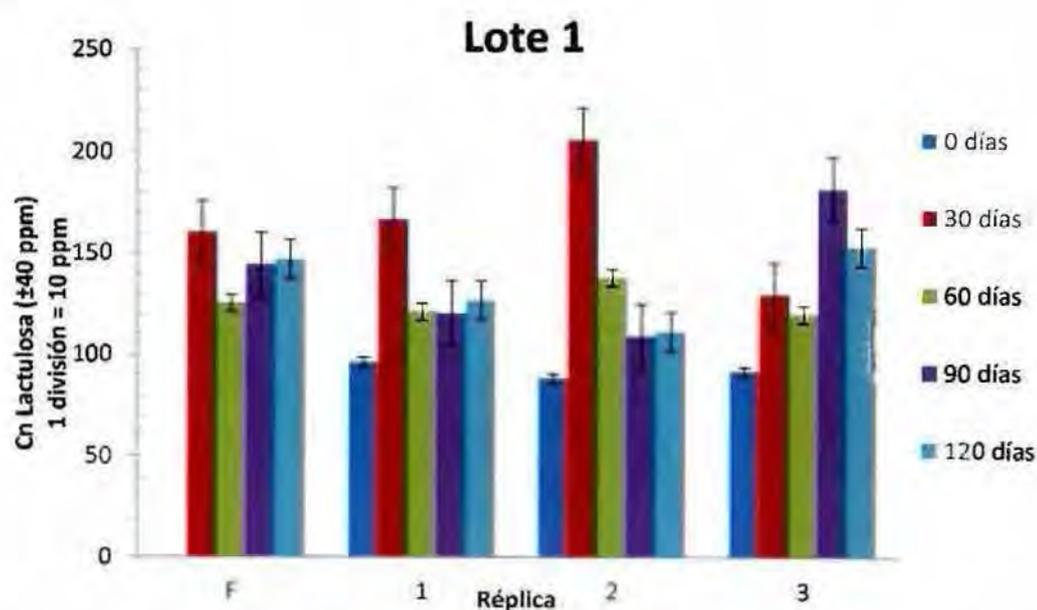


Figura 6: Concentración de lactulosa para el lote # 1 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

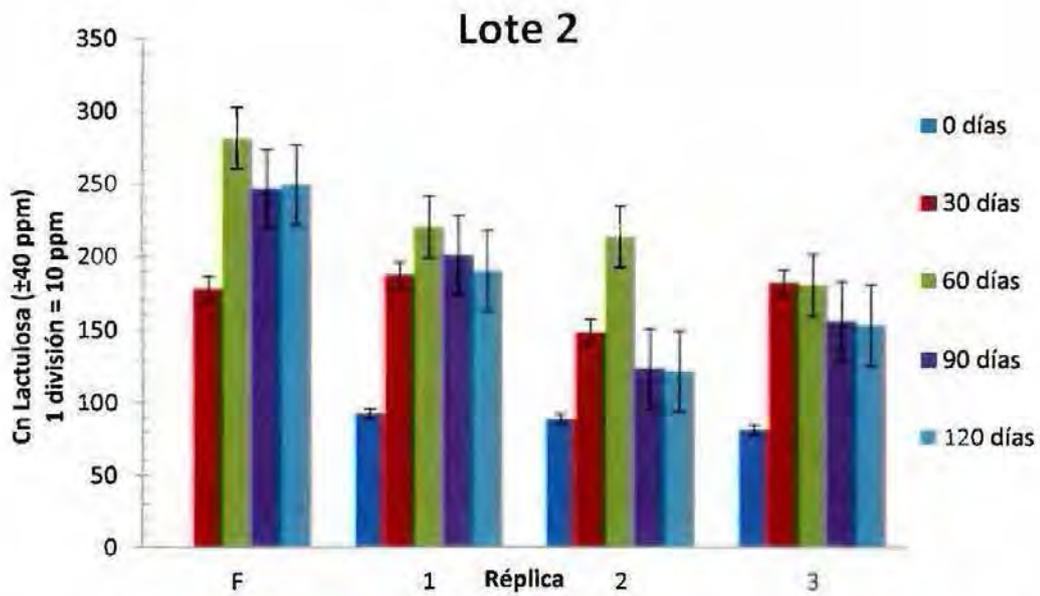


Figura 7: Concentración de lactulosa para el lote # 2 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

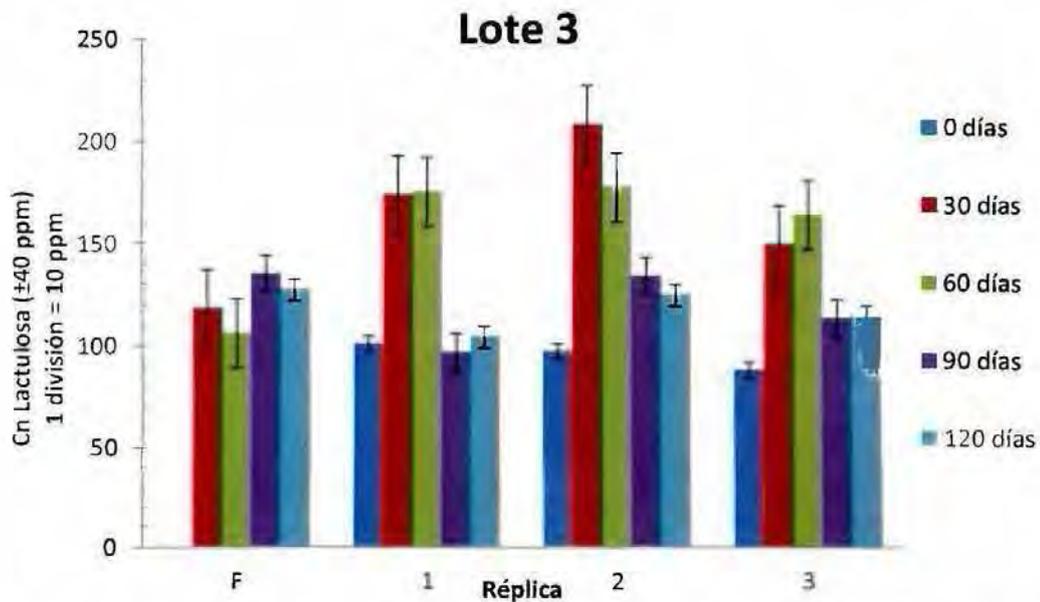


Figura 8: Concentración de lactulosa para el lote # 3 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

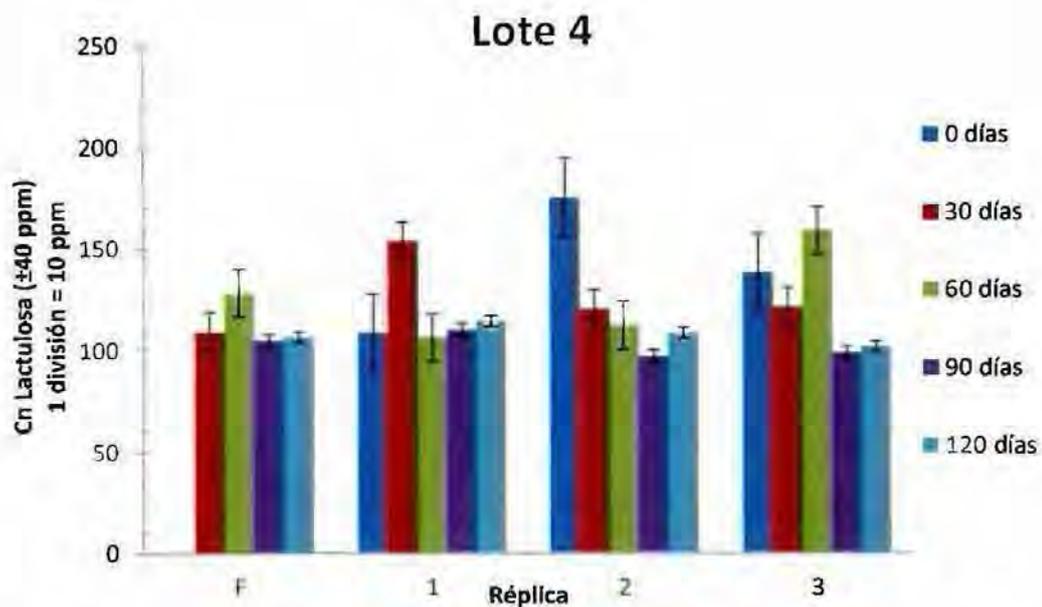


Figura 9: Concentración de lactulosa para el lote # 4 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

En las figuras 6, 7, 8, 9 anteriores se observa el comportamiento de la cantidad de lactulosa en todas las muestras analizadas durante el periodo establecido. Esto se realizó luego de montar el método de análisis y validarlo. Las figuras muestran las concentraciones de los diferentes lotes que se obtuvieron en los tiempos que se planificó, es decir, cada 30 días.

De cada lote se tomaron 19 muestras para analizar 3 muestras se analizan en el día 0, 4 muestras se analizan a los 30 días, 4 muestras más se analizan a los 90 días, otras 4 muestras más se analizan a los 90 días y finalmente, se analizan 4 muestras a los 120 días.

De las 4 muestras que se analizan periódicamente, 3 se mantenían a temperatura ambiente y una era guardada en una cámara fría a aproximadamente 4 °C. En el tiempo 0 no se hizo la medición de la muestra fría porque está recién salida de la producción, por lo que, no ha sido almacenada a bajas temperaturas por un determinado tiempo.

Se puede observar al analizar las figuras como la concentración de lactulosa no aumenta o disminuye gradualmente con el tiempo, por tanto, no depende del tiempo en que se realiza la medición. Al ver las concentraciones obtenidas tomando en cuenta su incertidumbre, se concluye que algunas muestras no varían ni con la temperatura ni con el tiempo, pero hay otras que sí lo hacen. Se nota que entre muestras la concentración puede fluctuar un poco, ya sea para una cantidad superior o inferior, sin embargo, esto sucede de forma aleatoria. Depende más de cada una de las muestras y de su tratamiento, pues como estas concentraciones son muy pequeñas no tienen una clara tendencia a variar de forma proporcional.

La variación de las muestras entre lote y lote puede justificarse debido a detalles que pueden variar durante el proceso. El tratamiento térmico fue realizado en un esterilizador tubular de capacidad de 14 000 L/h a una temperatura de (140 ± 2) °C, el tiempo varía de 2 a 5 segundos. El proceso se realiza a leches previamente pasteurizadas a (78 ± 2) °C por 33 segundos. Sin embargo, como se ha mencionado no existe una relación marcada con respecto a la variación de las muestras.

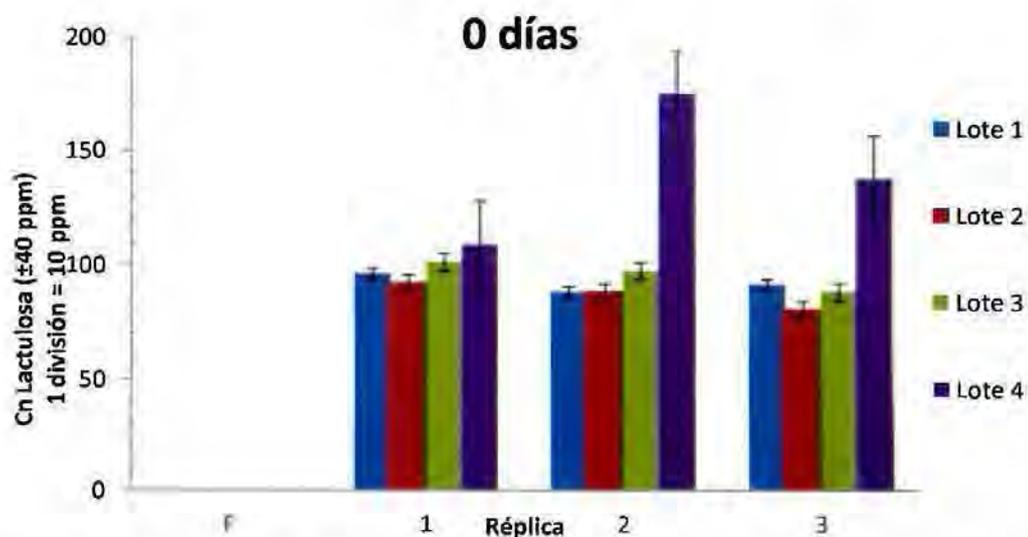


Figura 10: Concentración de lactulosa al tiempo de 0 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

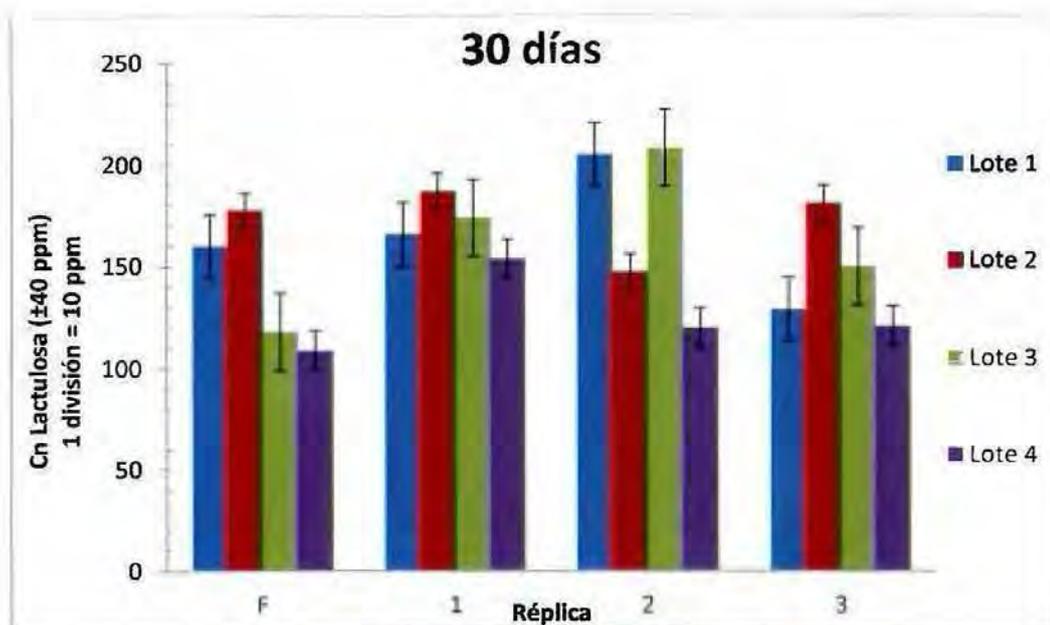


Figura 11: Concentración de Lactulosa al tiempo de 30 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

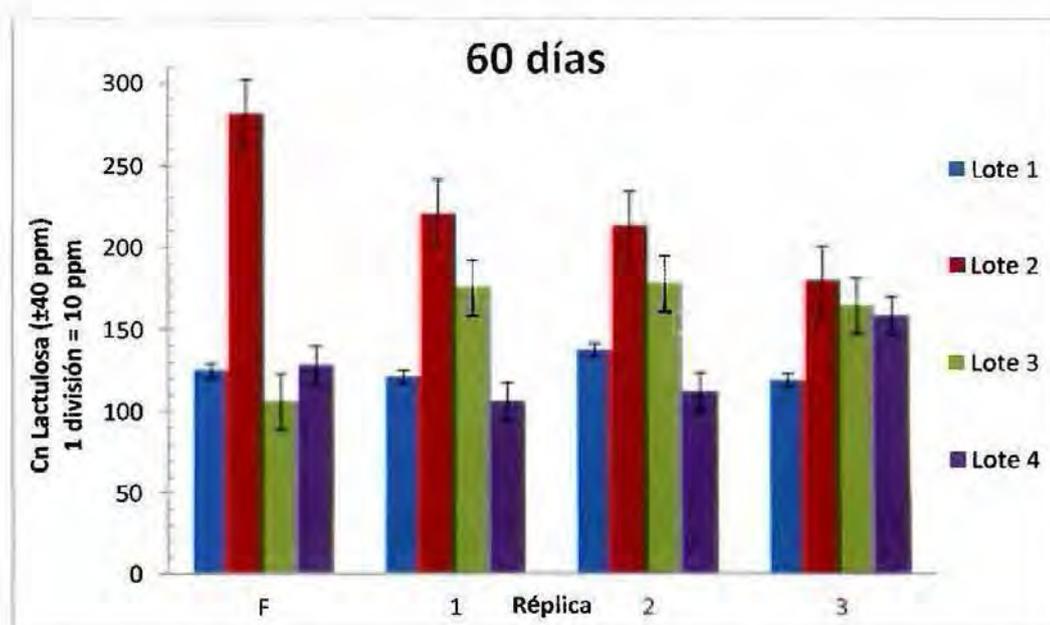


Figura 12: Concentración de lactulosa al tiempo de 60 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

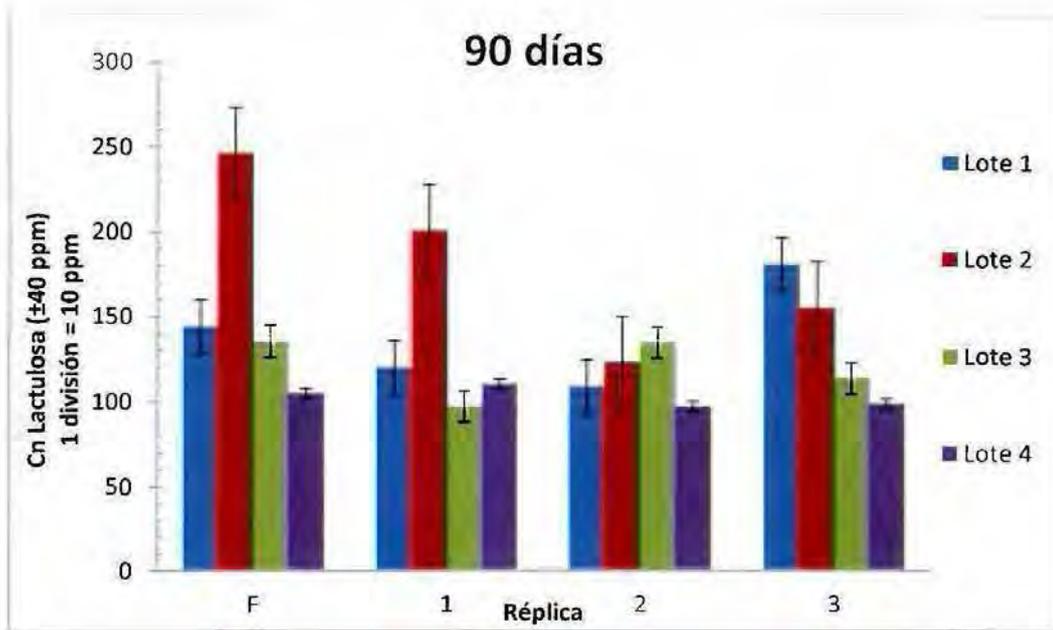


Figura 13: Concentración de lactulosa al tiempo de 90 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

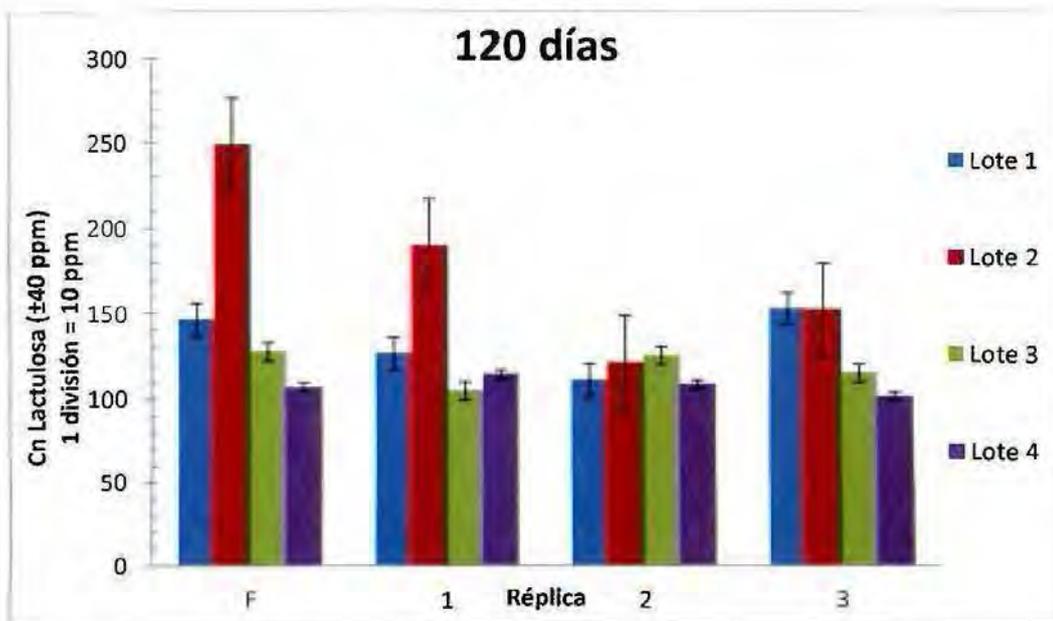


Figura 14: Concentración de lactulosa al tiempo de 120 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

De las figura 10 a la 14, se ve la concentración de lactulosa comparándola por lotes en los diferentes tiempos en que se realizaron las medidas. Como se había mencionado, el proceso es el mismo, por lo que no debería existir variación significativa entre los lotes. Esto no se comprueba del todo, pues se sigue viendo que no hay una tendencia específica pero si hay variabilidad.

En la figura 10 se muestran las concentraciones en el tiempo de 0 días, es decir, en el momento de producción, en la parte que corresponde a la muestra fría no se ven medidas, pues no se tomaron. Al comparar los lotes tampoco se observa una tendencia específica al variar el tiempo o a la temperatura.

Al tener esta serie de datos determinados en el Laboratorio es importante hacer un análisis estadístico acerca de la relación que existe entre ellos, así como ver qué factores afectan (si lo hiciesen) la concentración de lactulosa en las muestras.

Primeramente, se realiza un análisis ANOVA de dos vías para saber el efecto en la variación del tiempo y los lotes de producción que se observa en el cuadro II, y asimismo saber si existe una correlación entre los datos.

Cuadro II: ANOVA de dos vías para la concentración de lactulosa con respecto al tiempo y los lotes.

ANOVA de dos vías: concentración de Lactulosa vs tiempo y lote					
Fuente	DF	SS	MS	F	P
Tiempo	4	0,030993	0,0077482	10,12	0,000
Lote	3	0,027159	0,0090529	11,82	0,000
Interacción	12	0,035896	0,0029913	3,91	0,000
Error	60	0,045943	0,0007657		
Total	79	0,139991			
S = 0,02767	R-Sq = 67,18%	R-Sq (adj) = 56,79%			

Estos datos de ANOVA de dos vías nos permiten ver cómo afecta la variación en los lotes o los diferentes tiempos de análisis en las determinaciones. Para ello también se plantean dos hipótesis: la nula y la alternativa.

La hipótesis nula consiste en que la variación de algún parámetro no afecta los valores obtenidos, mientras que la hipótesis alternativa expresa que al variar el parámetro estudiado sí se afectan los valores obtenidos (Miller & Miller, 2002).

En este caso con los datos obtenidos en el cuadro II se ven los diferentes valores de probabilidad. Con un valor superior a 0,05 se puede decir con un intervalo del 95 % de confianza que se retiene la hipótesis nula, mientras que si ese valor es menor se rechaza la hipótesis nula y se retiene la hipótesis alternativa.

Acá se nota claramente como los tres valores de probabilidad dan $p = 0,000$, así que en las tres se descarta la hipótesis nula y por ende, se retiene la hipótesis alternativa, que expresa la importancia de la variación de cada uno de los parámetros. Para este caso de lactulosa se obtuvo que al variar el tiempo o el lote afectará los resultados obtenidos, y que además se da una interacción significativa entre estas dos variables (Harvey, 2000).

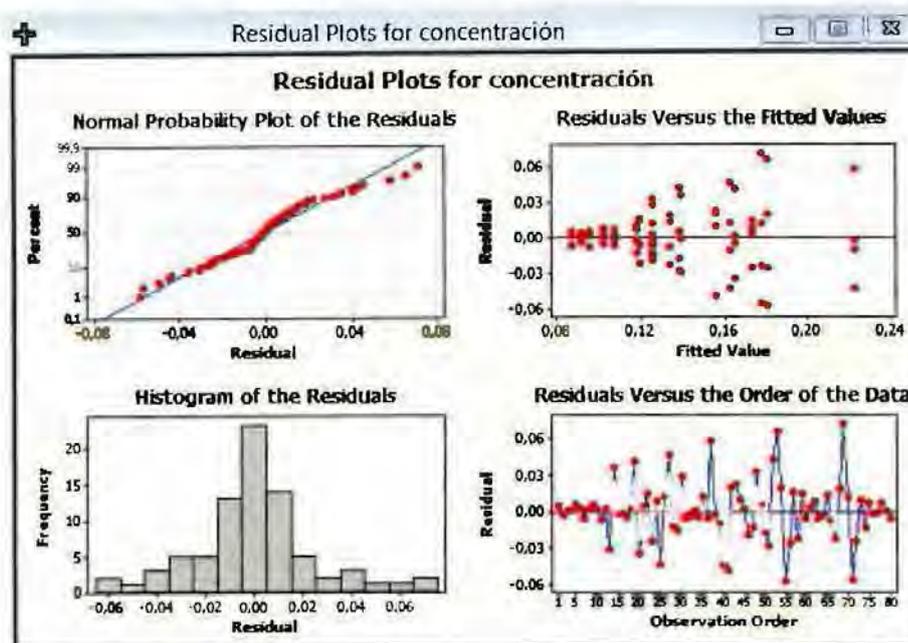


Figura 15: Gráficas de residuales para la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

A partir de la figura 15 se concluye que los datos de concentración de lactulosa siguen una distribución normal. En la primera figura se nota como al graficar la probabilidad normal de los residuales, los puntos describen un comportamiento lineal que implica la normalidad de los datos. Al ver el histograma de los residuales y notar como describen un comportamiento similar al de una campana también confirma la distribución normal de los datos. Finalmente, al ver las últimas dos gráficas de los residuales contra los valores ajustados y contra el orden de los datos, no se muestra una correlación o una tendencia, los datos se distribuyen aleatoriamente lo cual expresa normalidad en su distribución.

Como las cuatro figuras demuestran un mismo comportamiento se puede concluir que los datos muestran una distribución normal y se puede realizar un análisis para ver si afectan y que tanto lo hacen los parámetros de tiempo y lotes.

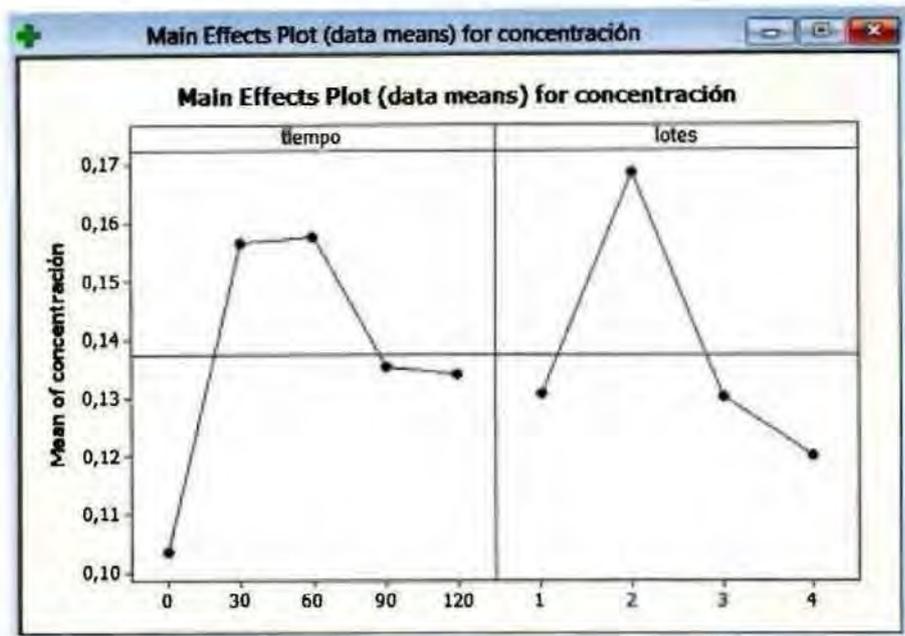


Figura 16: Interacción principal de las medias de la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

En la figura 16 se comparan los efectos que se dan al variar el tiempo y los lotes. Al comparar ambas se comprueba lo mencionado anteriormente ya que ambas poseen una variación significativa. Al variar alguno de los dos parámetros provocará variación en las mediciones.

En la figura 17 se quiere observar si hay una tendencia en estas variaciones, pero se dan conclusiones similares a lo anterior. La variación de las medias es significativa cuando se varían ambos parámetros. Estas variaciones son aleatorias y no describen ningún comportamiento, pues se ve en la figura que las variaciones son inconsistentes y sin correlación (Miller & Miller, 2002).

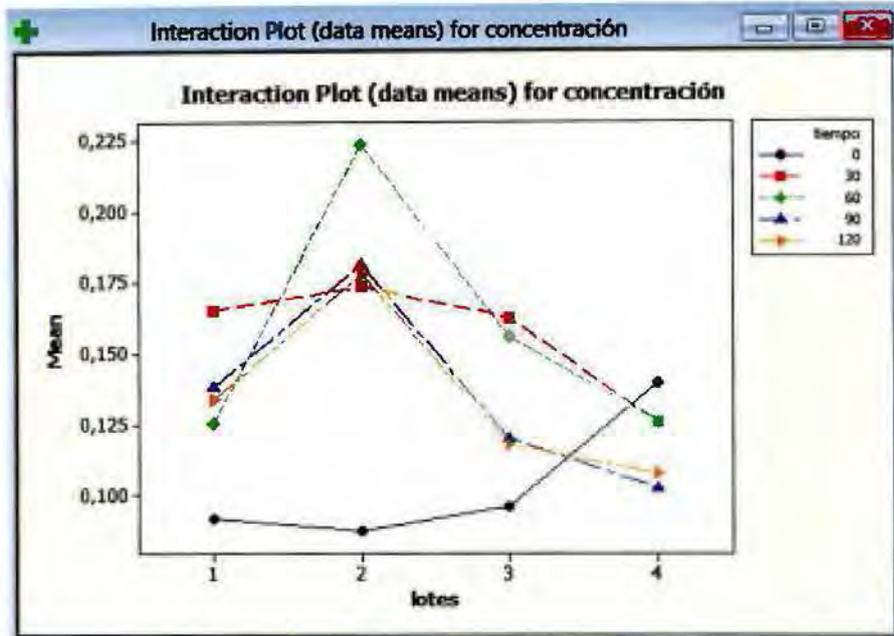


Figura 17: Interacción de las medias de la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

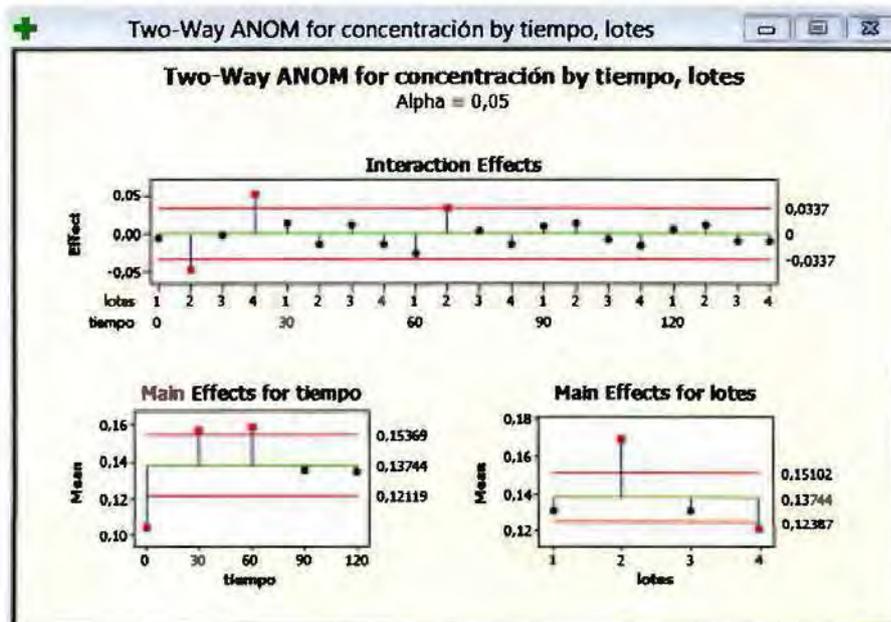


Figura 18: Límites en la homogeneidad de la concentración de lactulosa al variar el tiempo y los lotes.

Finalmente, la figura 18 nos muestra si los valores de las medias al cambiar el lote y el tiempo se salen de los límites de valores normales establecidos en las gráficas mediante las líneas rojas. Los valores de las medias obtenidas para la lactulosa se salen de los límites establecidos para decir que los datos son afectados al variar los parámetros. En el caso del tiempo salen tres valores de las medias mientras que en el caso de los lotes fueron dos valores, lo cual demuestra heterogeneidad en las medias obtenidas, sin embargo, también hay que determinar si se encuentran dentro de los límites establecidos. Para lactulosa este límite es de 400 ppm y la literatura consultada presenta valores no mayores a las 300 ppm, lo cual al comparar con lo obtenido se ve como claramente los resultados se encuentran por debajo de lo permitido y aunque haya variaciones en la producción ningún resultado tuvo valores mayores a estos límites.

5.2. *Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en leche*

Antes de empezar el análisis es muy importante comprobar la longitud de onda de mayor absorbancia para el HMF. La literatura reporta un pico máximo de absorción en 285 nm lo que, corresponde a la región UV del espectro, se hizo un barrido que correspondiera a valores cercanos a esta longitud de onda con un patrón intermedio y se obtuvo lo mostrado en la figura 19.



Figura 19: Espectro de absorción para un patrón intermedio de HMF.

El pico máximo obtenido fue a los 284 nm lo cual es muy cercano a lo reportado, en cuanto al HMF se trabajó siempre con esta longitud de onda para todos los parámetros de validación así como en la medición de las muestras (Rada & Rojas, 2008).

Con base en los patrones preparados y las absorbancias medidas se obtuvo la figura 20.

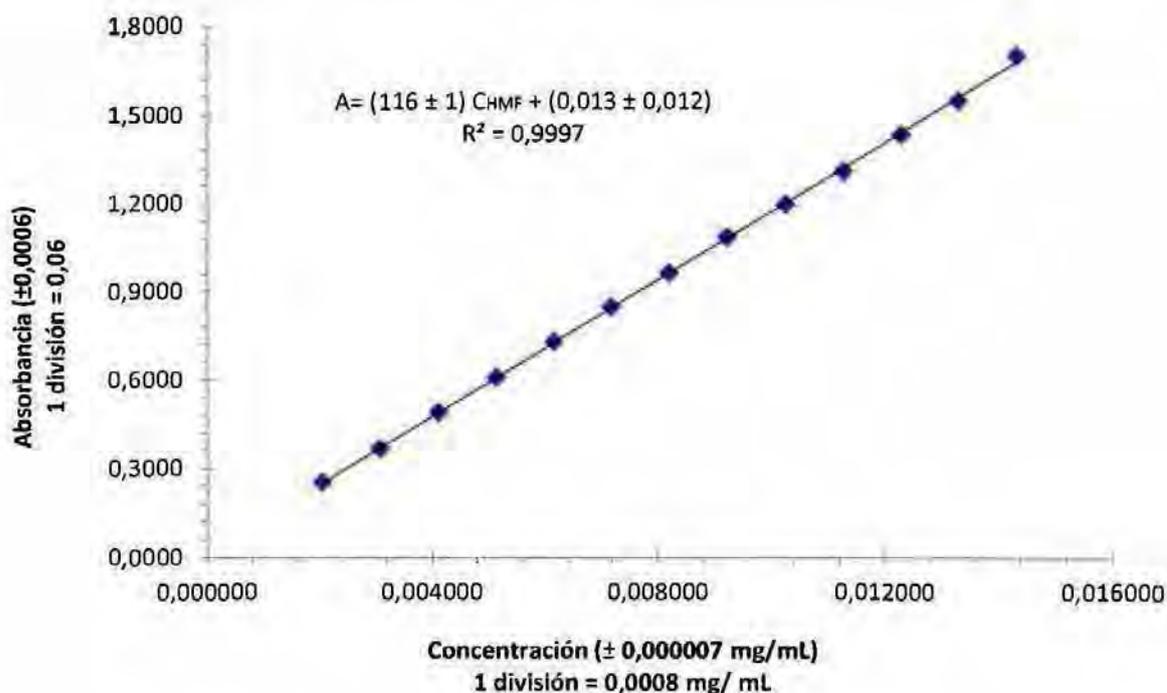


Figura 20: Curva de calibración para el HMF a 284 nm.

Para esta parte se realizaron 13 patrones para tener un mayor grupo de datos a comparar. La literatura muestra que para el estudio de HMF se usó un ámbito de concentraciones de 0,039 mg/mL a 0,232 mg/mL sin embargo, al probar éste ámbito no se observó una correlación lineal, por lo que, se procedió a trabajar con patrones más diluidos, inclusive se llegó a diluir más de una décima parte de lo reportado (Rada & Rojas, 2008).

Al preparar los 13 patrones de concentraciones en un ámbito entre 0,0021 mg/mL y 0,015 mg/mL, se observó que a concentraciones superiores la linealidad se va perdiendo poco a poco formando una curva hasta volverse una constante.

Es importante que luego de realizar esta modificación, la concentración de la muestra siempre se encuentra dentro del ámbito de trabajo. La cantidad de HMF presente en la muestra es muy poca, y está dentro del intervalo de concentraciones en los cuales se prepararon los patrones.

Al determinar la precisión mediante el análisis de 10 réplicas de una muestra se obtuvo un coeficiente de variación de 6. El cliente expresa satisfacción con un coeficiente menor a 10, al estar por debajo del límite el cliente acepta el resultado obtenido (Feinberg, 2007).

En cuanto a la exactitud se evaluó a partir de 10 réplicas de una muestra con el mismo método. Se hizo una adición conocida a la muestra y se determinó el porcentaje de recuperación. Los porcentajes obtenidos se encuentran entre 90 % y 98 %. Para esto, el cliente requería un porcentaje de recuperación superior al 90 %, por lo que, también se cumplió con este requisito de la validación del método de HMF (Madriz, 2010).

Como se había mencionado, el LC y el LD se determinaron simultáneamente mediante la curva de calibración. Se obtuvo que el LC fue de 0,00011 mg/mL mientras que se obtuvo un LD 0,00022 mg/mL.

Con el análisis de varianzas se obtuvo una F crítica de 2,1; siendo ésta menor a la F tabulada (4,1), por lo que se concluye que se retiene la hipótesis nula que expresa que no hay diferencia significativa entre los analistas.

En el anexo 8.1.1 se ven las medidas obtenidas para cada una de las partes de la validación, también sus cálculos y los resultados expresados anteriormente.

Después de validar el método se determinó la cantidad de HMF presente en las muestras de leches con el proceso UHT y se obtienen los resultados que se muestran de las figuras 21 a 29.

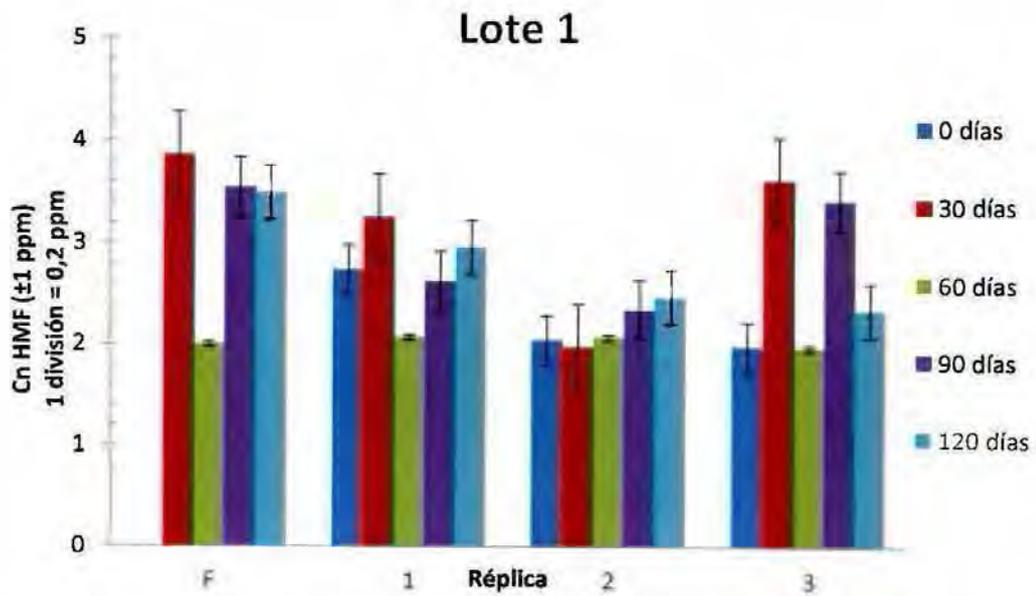


Figura 21: Concentración de HMF para el lote # 1 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

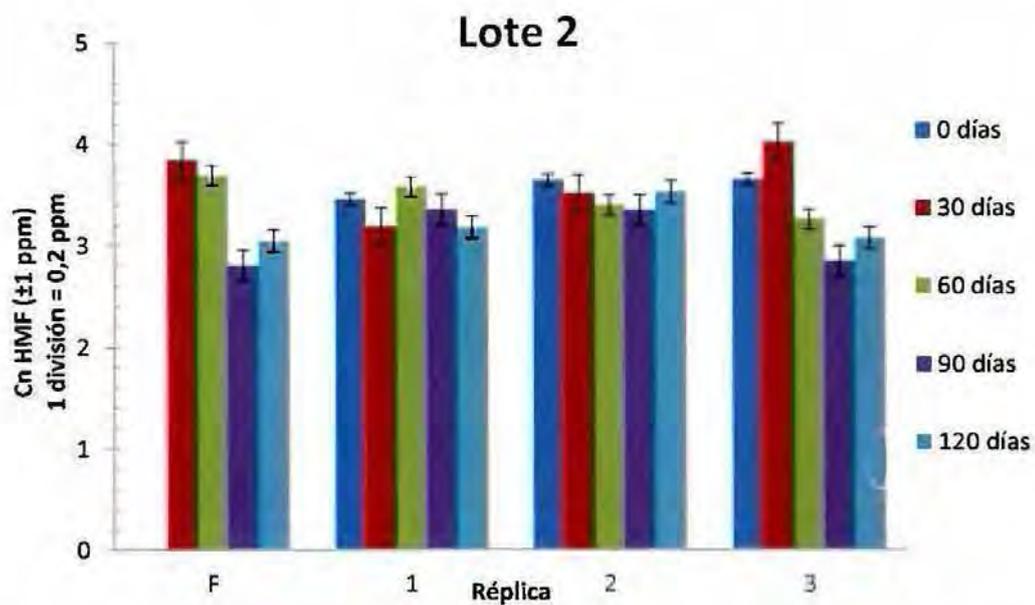


Figura 22: Concentración de HMF para el lote # 2 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

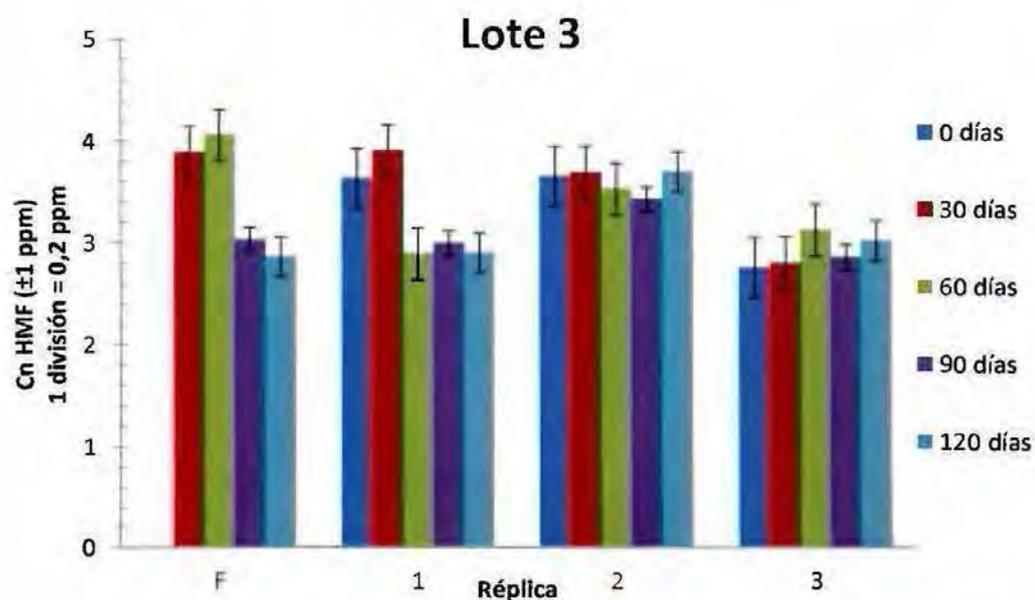


Figura 23: Concentración de HMF para el lote # 3 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

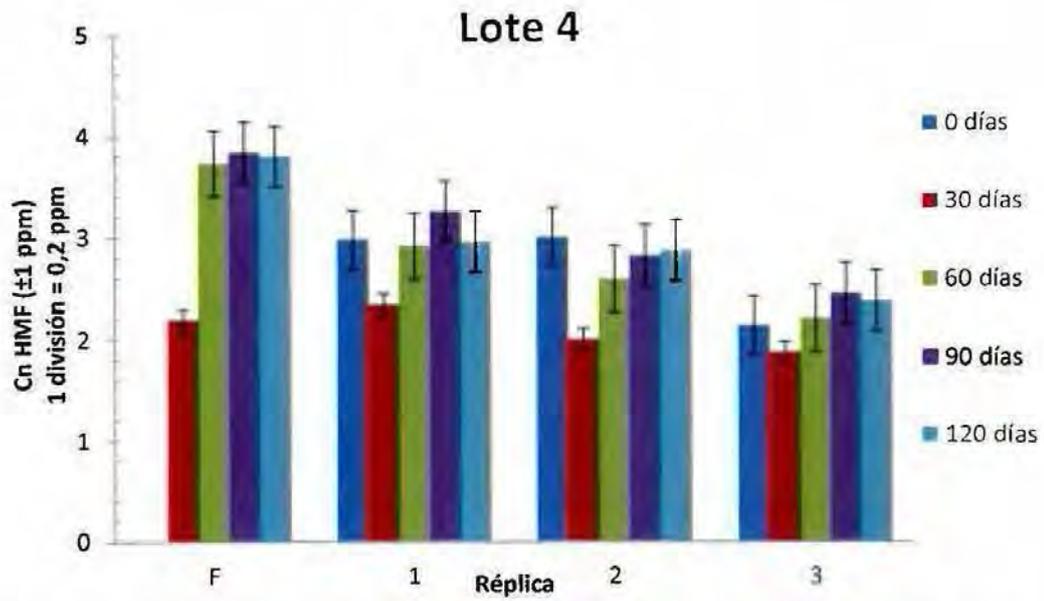


Figura 24: Concentración de HMF para el lote # 4 a través del tiempo. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

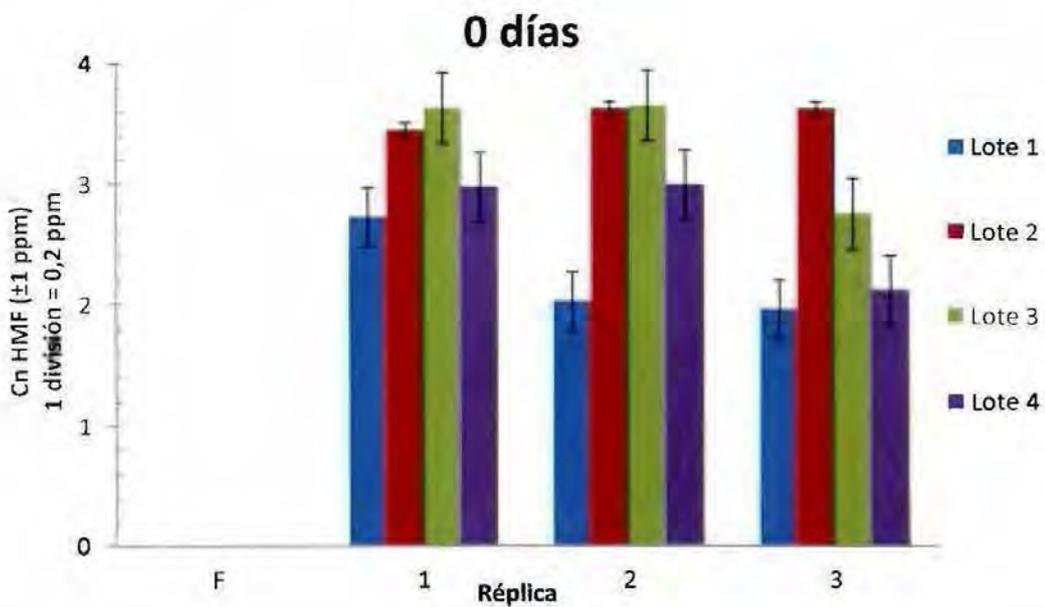


Figura 25: Concentración de HMF al tiempo de 0 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

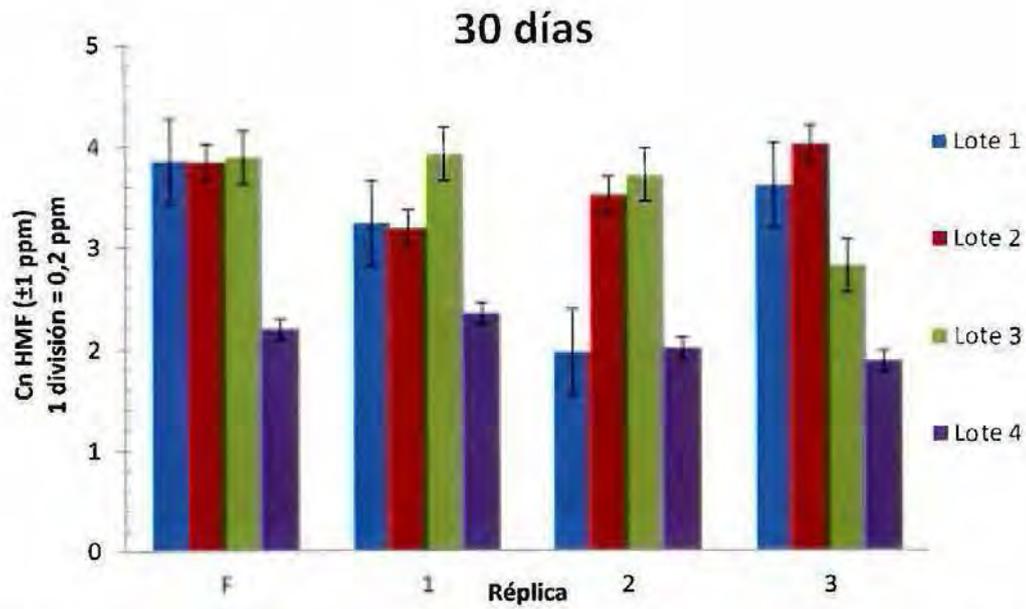


Figura 26: Concentración de HMF al tiempo de 30 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

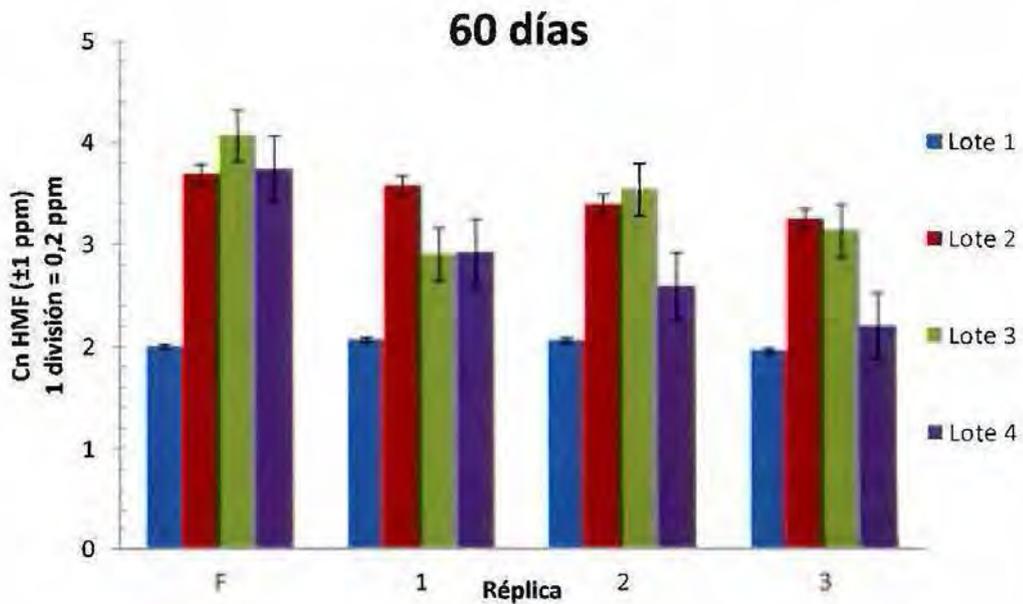


Figura 27: Concentración de HMF al tiempo de 30 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

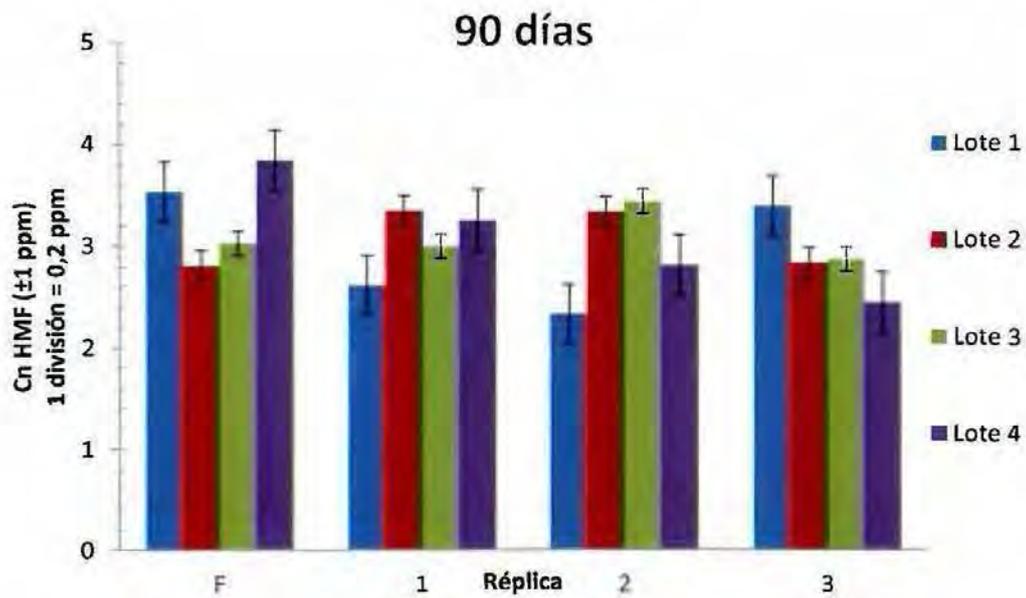


Figura 28: Concentración de HMF al tiempo de 90 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

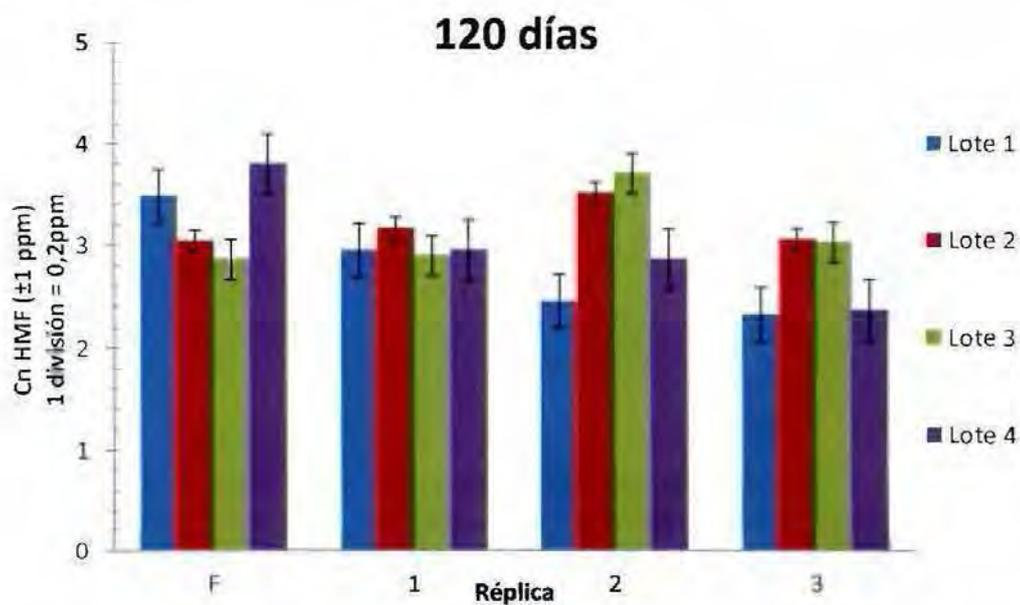


Figura 29: Concentración de HMF al tiempo de 120 días para los diferentes lotes. (F: réplica fría; 1: réplica # 1; 2: réplica # 2; 3: réplica # 3).

Se hicieron análisis en tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 días respectivamente; tres muestras almacenadas a temperatura ambiente y una se almacenó en un cuarto frío de 4 °C. La misma cantidad de muestras fueron tomadas de los lotes, debido a que a las mismas muestras que se extrajeron para determinar la lactulosa también se les determinó HMF.

Cada muestra que se extrajo, se analizó en el primer día para calcular la concentración de HMF y a su vez, se dejó preparada la respectiva mezcla con metanol absoluto en la refrigeradora durante 24 h, para que en el segundo día de análisis se obtuviera la concentración de lactulosa.

Esto fue de igual forma para cada una de las muestras y para cada uno de los lotes, por lo que, semana a semana se tomaron dos días para las respectivas determinaciones de ambos compuestos.

Las conclusiones de esta parte son muy similares a las mencionadas para la lactulosa. Primeramente, se ve de la figura 21 a la 24, la variación de la concentración en las muestras analizadas. Con el HMF tampoco se ve una dependencia marcada al tiempo o a la temperatura, es decir, no hay tendencia entre las concentraciones de HMF a través de los 4 meses de análisis. Al igual que tampoco se ve un aumento o una disminución proporcional al comparar las muestras analizadas que se almacenaron a temperatura ambiente y las que se almacenaron en la cámara fría.

Para complementar, de la figura 25 a la 29 se puede observar el efecto del tiempo sobre la composición de HMF en las muestras. Al ver estas figuras también se concluye que no se puede establecer una relación o una variación con tendencia, pues las concentraciones varían ligeramente de manera independiente, más por la aleatoriedad de las muestras que por el efecto del tiempo o de la temperatura (Harvey, 2000).

Al tener esta serie de datos determinados en el Laboratorio es importante hacer un análisis estadístico acerca de la relación que pueda existir entre ellos, así como ver qué factores

afectan (si lo hiciesen) la concentración de HMF en las muestras. Para ello se obtienen los datos mostrados en el cuadro III.

Cuadro III: ANOVA de dos vías para la concentración de HMF con respecto al tiempo y los lotes.

ANOVA de dos vías: concentración de HMF vs tiempo y lote					
Fuente	DF	SS	MS	F	P
Tiempo	4	0,0000003	0,0000001	0,36	0,837
Lote	3	0,0000090	0,0000030	14,64	0,000
Interacción	12	0,0000078	0,0000007	3,19	0,001
Error	60	0,0000123	0,0000002		
Total	79	0,0000294			
S = 0,0004523		R - Sq = 58,23 %		R - Sq (adj) = 45,00 %	

Primero se realiza una ANOVA de dos vías para evaluar el efecto del tiempo y los distintos lotes de producción y asimismo saber si existe una correlación entre los datos. Al analizar una ANOVA de dos vías se intenta ver cómo afecta la variación en los lotes o en los diferentes tiempos de análisis. Para ello se plantean dos hipótesis, la nula y la alternativa.

La hipótesis nula indicaría que la variación del parámetro no afecta los valores obtenidos, mientras que la hipótesis alternativa expresa que al variar el parámetro estudiado si afecta los valores obtenidos.

En este caso con los datos obtenidos en el cuadro III se ven los diferentes valores de probabilidad. Con un valor superior a 0,05 se puede decir con un intervalo del 95 % de confianza que se retiene la hipótesis nula, mientras que si ese valor es menor se rechaza la hipótesis nula y se retiene la hipótesis alternativa.

Al obtener una $p = 0,837$ se concluye que variar el tiempo no afectaría los resultados obtenidos en el análisis. Luego al tener una $p = 0,000$ se concluye que al variar el lote los resultados si se ven afectados, de acuerdo a las hipótesis planteadas. Finalmente, al ver una

$p = 0,001$ se obtiene que hay una interacción significativa entre tiempo y lote, la cual se puede estudiar (Miller & Miller, 2002).

Con las siguientes gráficas en la figura 30 se concluye que los datos de concentraciones de HMF siguen una distribución normal. En la primera figura se describe un comportamiento lineal. En el histograma se describe un comportamiento similar al de una campana. Finalmente, las últimas dos gráficas de los residuales contra los valores ajustados y contra el orden de los datos, no muestran una correlación o una tendencia, los datos se distribuyen aleatoriamente. Toda esta información corrobora la distribución normal en los datos.

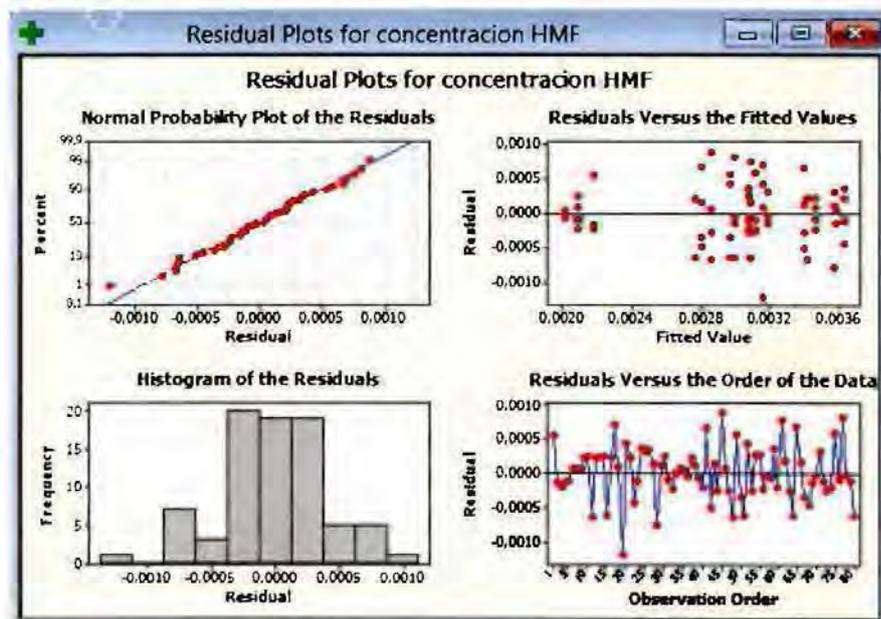


Figura 30: Gráficas de residuales para la concentración de HMF al variar el tiempo y los lotes.

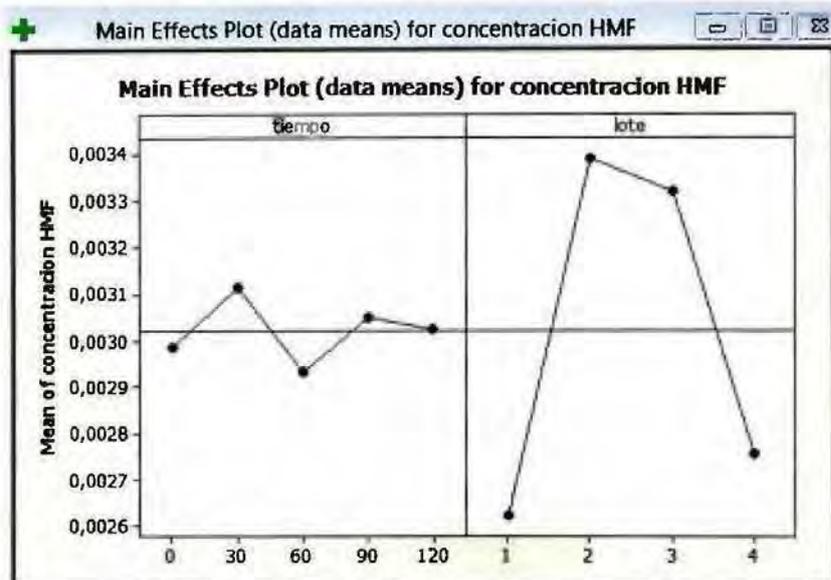


Figura 31: Interacción principal de las medias de la concentración de HMF al variar el tiempo y los lotes.

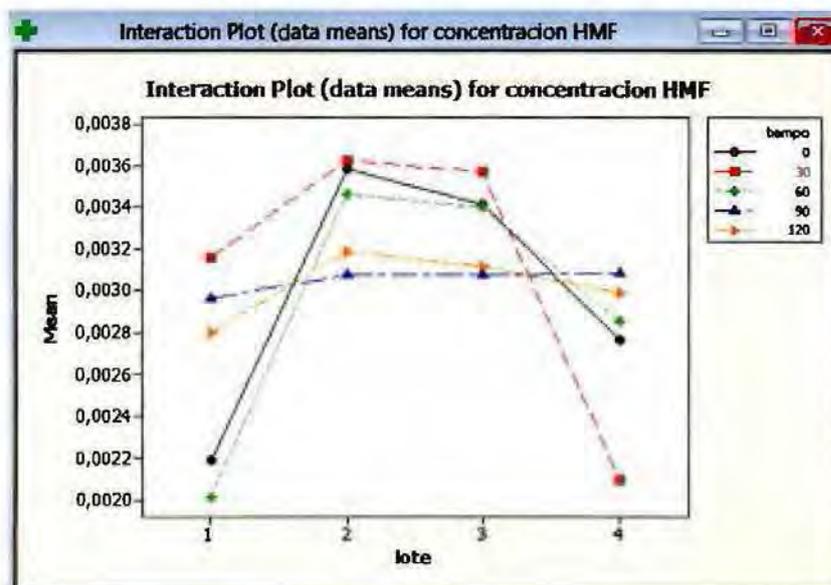


Figura 32: Interacción de las medias de la concentración de HMF al variar tiempo y lote.

En las figuras 31 y 32 se comparan los efectos que se dan al variar el tiempo y los lotes. En la primera figura se nota claramente lo confirmado anteriormente, que las medias de los resultados obtenidos varían más significativamente al cambiar el lote, no tanto así al variar el tiempo, pues no se ven diferencias tan grandes entre sus medias.

En la figura 33 se quiere observar si hay una tendencia en estas variaciones, pero se dan conclusiones similares a lo anterior. La variación de las medias al cambiar el lote es mucho más significativa que cuando se varía el tiempo. Esto se ve más claro porque al cambiar de lote se nota como la diferencia entre las medias se amplía, mientras que al comparar los tiempos, esta diferencia varía, pero no tan abruptamente. Ambas variaciones no muestran una tendencia marcada, por lo que, no se puede concluir una correlación directa entre la variación de parámetros (Miller & Miller, 2002).

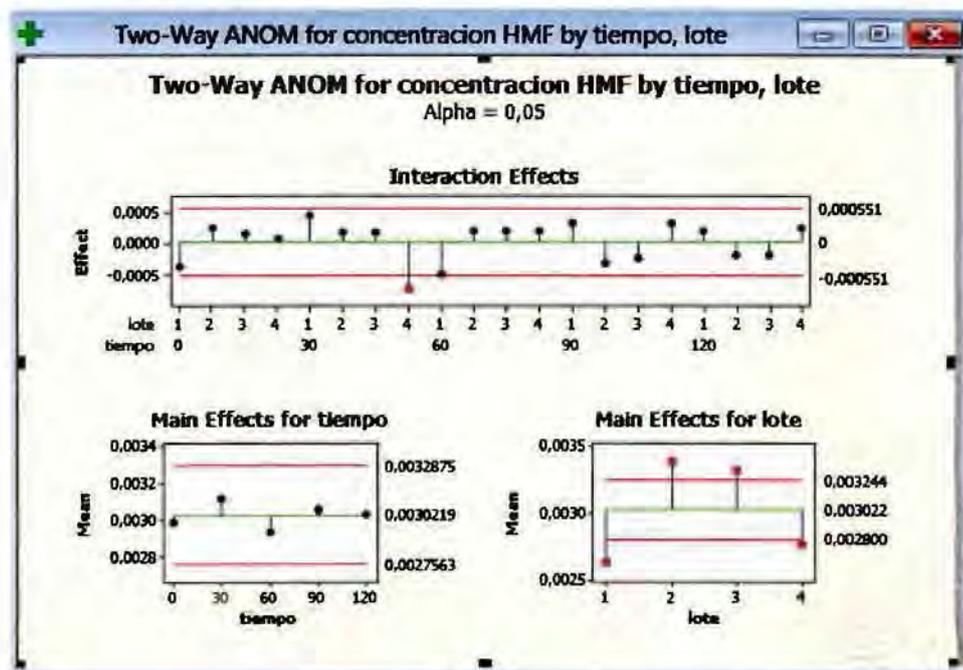


Figura 33: Límites en la homogeneidad de la concentración de HMF al variar el tiempo y los lotes.

Finalmente, la figura 33 muestra si los valores de las medias al cambiar el lote y el tiempo se salen de los límites de valores normales establecidos en las gráficas mediante las líneas rojas. Con ello se ve como al variar el tiempo no se afecta la homogeneidad entre los datos, es decir, que los valores siempre se mantendrían dentro de un ámbito que se consideraran homogéneos. Caso contrario al variar los lotes, pues sus medias si se salen de los límites establecidos para homogeneidad de los datos. Sin embargo, esto no expresa si sobrepasa los límites permitidos del analito dentro de la leche. Como se mencionó anteriormente se establecen ciertos límites para cada uno de los componentes, en este caso se analiza HMF y aunque en la literatura no se da una valor límite para el contenido, los valores que se reportan en otros análisis no superan datos de 15 ppm, mientras que al ver las gráficas anteriores los valores obtenidos no supera los 3,5 ppm.

CAPITULO 6: CONCLUSIONES

1. Se logró implementar una metodología que permite determinar la concentración de lactulosa en leches tratadas con el proceso UHT, a este método se le realizaron las pruebas de validación establecidas por la Guía para Validación de Métodos del ECA, para asegurar la confiabilidad del método así como satisfacción de la empresa por el mismo.
2. Se implementó la metodología para analizar el contenido de HMF por espectrometría ultravioleta visible en las muestras de leche con proceso UHT, a la cual también se le determinaron las condiciones establecidas en la Guía para Validación de Métodos del ECA para obtener un método confiable de análisis y lograr de la misma forma la satisfacción de la empresa.
3. Se simplificó el trabajo de operarios y del personal del Laboratorio mediante la elaboración de protocolos para ambos procedimientos y para el manejo del espectrofotómetro ultravioleta visible.
4. Se comprobó que las cantidades producidas de lactulosa y HMF después del proceso UHT para leches semidescremadas (2 % grasa) se encuentran por debajo de lo reportado en la literatura.
5. No se observó una relación entre el tiempo de almacenamiento de la muestra y la concentración de alguno de los dos componentes de interés. A los tiempos en que se realizaron las medidas se les detectaron variaciones de las concentraciones, sin embargo, esto se debió a la aleatoriedad de la muestra misma y no al tiempo de almacenado; valga aclarar que ninguna sobrepasa un valor límite establecido.

6. Para la comparación entre muestras almacenadas a temperatura ambiente a 4 °C, no se encontró una relación directa entre la temperatura y la concentración de cada una de los componentes.

7. El procedimiento realizado para la producción de las muestras es el mismo, por lo que no se debió obtener variación en la concentración de lactulosa y HMF en muestras de un mismo lote, sin embargo sí se observó una leve variación entre las concentraciones pero como se ha mencionado, sin ninguna tendencia.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, S. (1965). Spectrophotometric Determination of Lactulose With Methylamine. *Analytical Chemistry*, 37(16), 896 – 8. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14326977>
- Berry, R., & Tatum, J. (1955). 5-Hydroxymethylfurfural in Stored Foam-Mat Orange Powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13(6), 588 – 590.
- Bylund, G. (1995). *Dairy Processing Handbook* (p. 436). Lund: Tetra Park Systems AB.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Villamiel, M., & Olano, A. (2008). Isomerization of Lactose-Derived Oligosaccharides: a Case Study Using Sodium Aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10954 – 9. doi:10.1021/jf801952k
- Cataldi, T. R., Angelotti, M., & Bufo, S. a. (1999). Method Development for the Quantitative Determination of Lactulose in Heat-Treated Milks by HPAEC with Pulsed Amperometric Detection. *Analytical Chemistry*, 71(21), 4919 – 25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10565283>
- Cattaneo, S., Masotti, F., & Pellegrino, L. (2009). Liquid Infant Formulas: Technological Tools for Limiting Heat Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10689 – 94. doi:10.1021/jf901800v
- Chávez, J. (2007). *Estudios de estabilidad en preparados de base láctea suplementados con diferentes fuentes de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga* (pp. 257 – 268). Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Ruiz, M., Reviejo, J., & Pingarrón, J. M. (2010). An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in

- Milk and Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7141 – 8. doi:10.1021/jf101173e
- Douglas, F. W., Greenberg, R., Farrell, H. M., & Edmondson, L. F. (1981). Effects of Ultra-High-Temperature Pasteurization on Milk Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(1), 11 – 5. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7204746>
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., & Roa, L. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”* (p. 68). Santiago: Instituto de Salud Pública.
- Dunkley, W. L., & Stevenson, E. (1987). Ultra-High Temperature Processing and Aseptic Packaging of Dairy Products. *J. Dairy Sci*, 70, 2192 – 2202.
- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Study of the Reactions between (+)-Catechin and Furfural Derivatives in the Presence or Absence of Anthocyanins and Their Implication in Food Color Change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5946–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141265>
- Feinberg, M. (2007). Validation of Analytical Methods Based on Accuracy Profiles. *Journal of Chromatography*, 1158(1 - 2), 174 – 83. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.021
- Fennema, O. (2009). *Química de alimentos* (p. 44). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Galván, J. (2012). *Proyecto integral de producción y comercialización de leche ultrapasteurizada (UHT)* (pp. 1 – 126). México D.F.: Liconsa.
- Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry* (p. 816). Boston: McGraw-Hill.

Helios Alpha & Beta Manual el Usuario N°UVA 110418, versión 3a (01/2000).

Hervas, T. (1993). *Contenido en Furosina, Lactulosa y 8-Lactoglobulina como indicadores de calidad en leches líquida y en polvo*. Universidad Complutense de Madrid.

Hicks, K. B., Raupp, D. L., & Smith, P. W. (1984). Preparation and Purification of Lactulose from Sweet Cheese Whey Ultrafiltrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2), 288 – 292. doi:10.1021/jf00122a028

Jerez, J. (2006). *La evaluación de leches pasteurizada (HTST) y esterilizada (UHT) en la textura del yogurt*. Universidad Técnica de Ambato.

Johanna Velandia. (2008). *Validación del método analítico para la cuantificación de bacitrina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria*. Pontificia Universidad Javeriana.

Kokkinidou, S., & Peterson, D. G. (2014). Control of Maillard-Type Off-Flavor Development in Ultrahigh-Temperature-Processed Bovine Milk by Phenolic Chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32), 8023 – 33. doi:10.1021/jf501919y

Lacroix, M., Léonil, J., Bos, C., Henry, G., Airinei, G., Fauquant, J., ... Gaudichon, C. (2006). Heat Markers and Quality Indexes of Industrially Heat-Treated [15N] Milk Protein Measured in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1508 – 17. doi:10.1021/jf051304d

Lange, I. (2010). *Estudio sobre la conservación térmica de la carne fresca y la leche ultrapasteurizada en supermercados y almacenes ubicados en Capital Federal y Gran Buenos Aires*. Universidad de Belgrano.

- Le, T. T., Bhandari, B., Holland, J. W., & Deeth, H. C. (2011). Maillard Reaction and Protein Cross-Linking in Relation to the Solubility of Milk Powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12473 – 9. doi:10.1021/jf203460z
- LeBlanc, B. W., Eggleston, G., Sammataro, D., Cornett, C., Dufault, R., Deeby, T., & St Cyr, E. (2009). Formation of Hydroxymethylfurfural in Domestic High-Fructose Corn Syrup and its Toxicity to the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7369 – 76. doi:10.1021/jf9014526
- Madriz, M. (2010). *Guía para la validación de métodos*.(p. 9). ECA.
- Marconi, E., Messia, M. C., Amine, A., Moscone, D., Vernazza, F., Stocchi, F., & Palleschi, G. (2004). Heat-Treated Milk Differentiation by a Sensitive Lactulose Assay. *Food Chemistry*, 84(3), 447 – 450. doi:10.1016/S0308-8146(03)00268-1
- Marina, D., Herrero, M., Jimeno, M. L., & Moreno, F. J. (2012). Efficient Synthesis and Characterization of Lactulosucrose by *Leuconostoc mesenteroides* B-512F Dextranucrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10564 – 71.
- Marine, A., & Vidal-carou, M. C. (1998). Changes in Furfural Compounds during Storage of Infant Milks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2998 – 3003.
- Matsuda, T., Kato, Y., & Nakamura, R. (1991). Lysine Loss and Polymerization of Bovine B-Lactoglobulin by Amino Carbonyl Reaction with Lactulose (4-O-B-D-Galactopyranosyl-D-fructose). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(7), 1201 – 1204.
- Meltretter, J., Schmidt, A., Humeny, A., Becker, C.-M., & Pischetsrieder, M. (2008). Analysis of the Peptide Profile of Milk and its Changes During Thermal Treatment and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2899 – 906. doi:10.1021/jf073479o

- Mendoza, M. R., Olano, A., & Villamiel, M. (2005). Chemical Indicators of Heat Treatment in Fortified and Special Milks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2995 – 9. doi:10.1021/jf0404061
- Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y quimiometría para Química Analítica* (4th ed., p. 296). Madrid: Prentice Hall.
- Morales, F. J., & Babbel, M.-B. (2002). Antiradical Efficiency of Maillard Reaction Mixtures in a Hydrophilic Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2788 – 92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11982400>
- Morales, V. (2008, June). Operación de homogenizadores en plantas UHT. *Mundo Lácteo y Cárnico*, 14 – 15.
- Mortier, L., Braekman, A., Cartuyvels, D., Renterghem, R. Van, & Block, J. De. (2000). Intrinsic Indicators for Monitoring Heat Damage of Consumption Milk. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 4(4), 221 – 225.
- Muniategui, S., & Ferna, M. A. (1998). Enzymatic Determination of Galactose and Lactose in Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1381 – 1385.
- Nikolov, P. Y., & Yaylayan, V. a. (2011). Thermal Decomposition of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) and Its Further Transformations in the Presence of Glycine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10104 – 13. doi:10.1021/jf202470u
- Nuñez, J. (2010). *Programa Pruebas de desempeño de productos* (pp. 3 – 21). Buenos Aires: INTI.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2008). Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization Treatment on the Lipolysis and Lipid Oxidation

- of Milk During Refrigerated Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7125 – 30. doi:10.1021/jf800972m
- Rada, M., & Fernández, S. (2007). Aplicación de la espectrofotometría ultravioleta-visible para la determinación de 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF) en leches comerciales. *Col. Cienc. Pec.*, 20(4), 532.
- Rada, M., & Rojas, S. (2008). Determinación de 4-O-β-D-Galactopiranosil-D-Fructuofuranosa (Lactulosa) y 5-(Hidroximetil)-2-Furaldehído (HMF) en leches UHT comerciales colombianas por espectrofotometría ultravioleta-visible. *Alimentos Hoy*, 15, 40 – 51.
- Rada, M., & Salazar, M. (2011). La Lactulosa, indicador de tratamiento térmico en leches enriquecidas comerciales colombianas. *Bioteología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 9(2), 74 – 84.
- Ramos, M. (1996). Protein Changes in Stored Ultra-High-Temperature-Treated Milks Studied by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3955 – 3959.
- Reglamento Técnico: RTCR: 401 - 2006. Leche cruda y Leche Higienizada. , Pub. L. No. 33812 (2006). Costa Rica.
- Rooijen, C. Van, Bosch, G., Poel, A. F. B. Van Der, Wierenga, P. A., Alexander, L., & Hendriks, W. H. (2014). Quantitation of Maillard Reaction Products in Commercially Available Pet Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Ruiz-Matute, A. I., Sanz, M. L., Corzo, N., Martín-Alvarez, P. J., Ibañez, E., Martínez-Castro, I., & Olano, A. (2007). Purification of Lactulose from Mixtures with Lactose Using Pressurized Liquid Extraction with Ethanol-Water at Different Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3346 – 50. doi:10.1021/jf070018u

- Scallet, B., & Gardner, J. (1945). Formation of 5-Hydroxymethylfurfural from D-Glucose in Aqueous Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(1926), 1934 – 1935.
- Skoog, D. A., Leary, J. J., & Holler, F. (1998). *Espectrometría Visible y Ultravioleta* (5th ed., pp. 353 – 367). McGraw-Hill.
- Stanciuc, N. (2009). Traceability Indicators for Heat Treatments of Milk. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 5, 10 – 17.
- Sugihara, J., Smirnova, I., Kasho, V., & Kaback, H. R. (2011). Sugar Recognition by CscB and LacY. *Biochemistry*, 50(51), 11009 – 14. doi:10.1021/bi201592y
- Taylor, J. L. S., Demyttenaere, J. C. R., Abbaspour Tehrani, K., Olave, C. A., Regniers, L., Verschaeve, L., ... de Kimpe, N. (2004). Genotoxicity of Melanoidin Fractions Derived from a Standard Glucose/Glycine Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 318 – 23. doi:10.1021/jf030125y
- Tsao, R. (2014). 5-Hydroxymethyl-2-furfural and Derivatives Formed During Acid Hydrolysis of Conjugated and Bound Phenolics in Plant Foods and the Effects on Phenolic Content and Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4754 – 61.
- Vargas, M. (2006). *Utilización de leche concentrada descremada reconstituida para la elaboración de leche UHT: efectos fisicoquímicos y de estabilidad*. Universidad Austral de Chile.
- Wada, Y. (2014). Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4175 – 85.

Wunderlin, D. A., Pesce, S. F., Ame, V., & Faye, P. F. (1998). Decomposition of Hydroxymethylfurfural in Solution and Protective Effect of Fructose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8561(97), 1855 – 63.

Zavala, J. (2009). Cambios organolépticos y nutricionales producidos por los tratamientos térmicos durante el procesamiento de la leche. Perú: Ministerio de Agricultura.

CAPITULO 8: ANEXOS

8.1. Datos de validación

8.1.1. Hidroximetilfurfural (HMF)

Cuadro IV: Datos para la primera curva de calibración de HMF.

Patrones	Alícuota de dis madre (mL)	Balón (mL)	Concentración ($\pm 0,000007$ mg/mL)	A1	A2	A3	A promedio
1	1,00	50,00	0,002050	0,252	0,253	0,253	0,2525
2	1,50	50,00	0,003075	0,366	0,366	0,366	0,3662
3	2,00	50,00	0,004100	0,488	0,488	0,488	0,4880
4	2,50	50,00	0,005125	0,606	0,606	0,606	0,6057
5	3,00	50,00	0,006150	0,729	0,727	0,727	0,7277
6	3,50	50,00	0,007175	0,846	0,845	0,846	0,8455
7	4,00	50,00	0,008200	0,961	0,961	0,961	0,9606
8	4,50	50,00	0,009225	1,084	1,083	1,082	1,0829
9	5,00	50,00	0,010250	1,194	1,194	1,193	1,1937
10	5,50	50,00	0,011275	1,305	1,305	1,304	1,3050
11	6,00	50,00	0,012300	1,429	1,429	1,429	1,4287
12	6,50	50,00	0,013325	1,543	1,543	1,543	1,5431
13	7,00	50,00	0,014350	1,694	1,693	1,694	1,6939

Linear Regression

File C:\Users\jelcard871\Dropbox\Tesis\Lo actual\Tesis\HMF\Linealidad\HMF Lin 2.dat

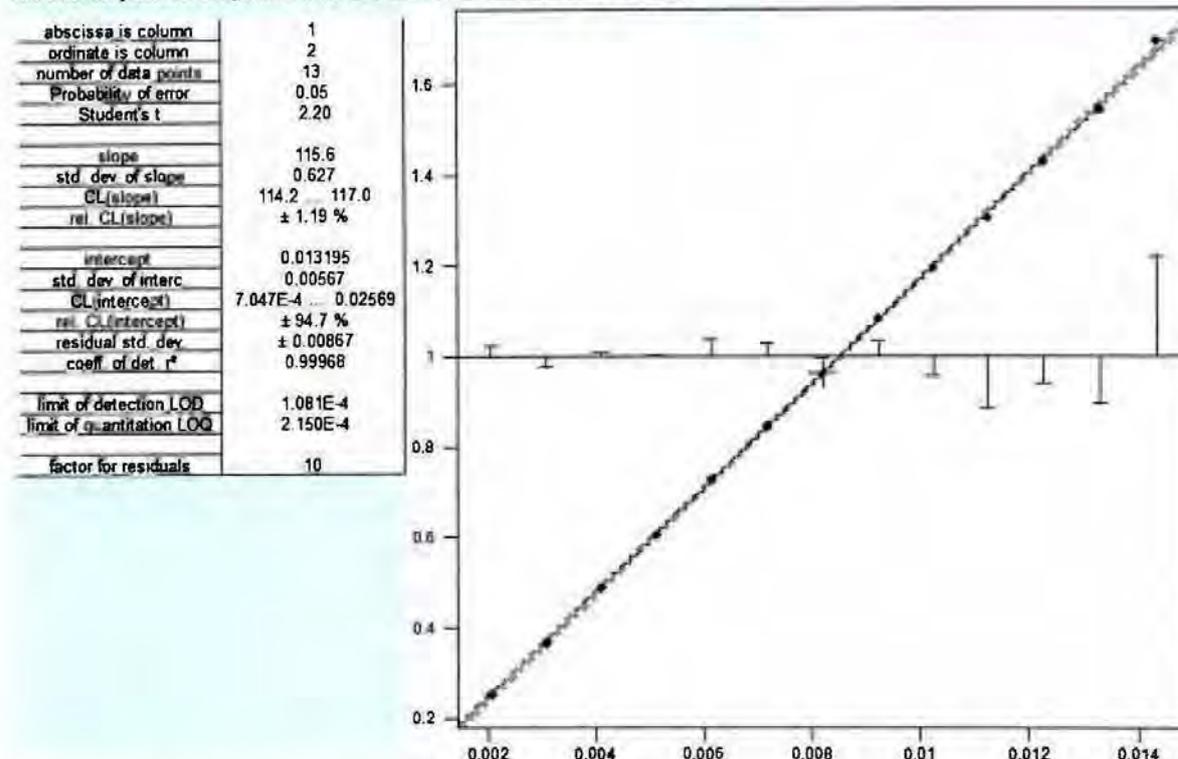


Figura 34: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de HMF.

Cuadro V: Datos para la segunda curva de calibración de HMF.

Patrones	Alícuota de dis madre (mL)	Balón (mL)	Concentración ($\pm 0,000007$ mg/mL)	A1	A2	A3	A promedio
1	1,00	50,00	0,002022	0,2501	0,2499	0,2502	0,2501
2	1,50	50,00	0,003033	0,3654	0,3650	0,3651	0,3652
3	2,00	50,00	0,004044	0,4873	0,4876	0,4876	0,4875
4	2,50	50,00	0,005055	0,6041	0,6043	0,6043	0,6042
5	3,00	50,00	0,006066	0,7261	0,7263	0,7265	0,7263
6	3,50	50,00	0,007077	0,8413	0,8414	0,8414	0,8414
7	4,00	50,00	0,008088	0,9563	0,9567	0,9561	0,9564
8	4,50	50,00	0,009099	1,0799	1,0798	1,0794	1,0797
9	5,00	50,00	0,010110	1,1913	1,1918	1,1920	1,1917
10	5,50	50,00	0,011121	1,3046	1,3050	1,3050	1,3049
11	6,00	50,00	0,012132	1,4290	1,4288	1,4291	1,4290
12	6,50	50,00	0,013143	1,5450	1,5458	1,5456	1,5455
13	7,00	50,00	0,014154	1,6969	1,6967	1,6965	1,6967

Linear Regression

File C:\Users\joicard87\Dropbox\Tesis\Lo actual\Tesi\HMF\Linealidad\HMF Lin 1.dat

abscissa is column	1
ordinate is column	2
number of data points	13
Probability of error	0,05
Student's t	2.20
slope	117.5
std. dev. of slope	0.662
CL (slope)	116.0 ... 118.9
rel. CL (slope)	± 1.24 %
intercept	0.0096264
std. dev. of interc.	0.00591
CL (intercept)	-0.003385 ... 0.02264
rel. CL (intercept)	± 135 %
residual std. dev.	± 0.00903
coeff. of det. r^2	0.99965
limit of detection LOD	1.107E-4
limit of quantitation LOQ	2.203E-4
factor for residuals	10

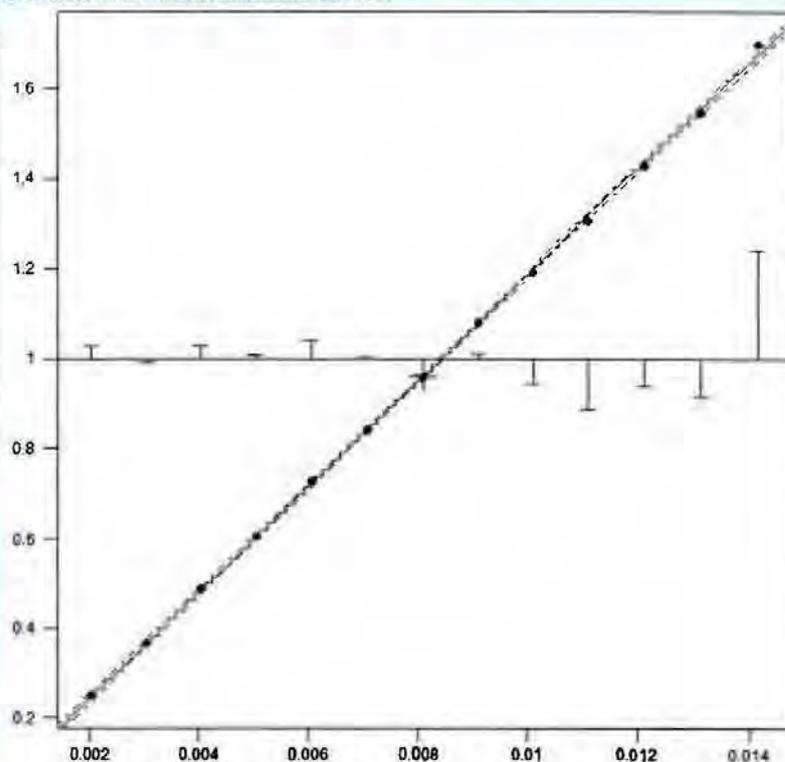


Figura 35: Linealidad, LD y LC obtenidos para la segunda curva de calibración de HMF.

Cuadro VI: Datos para la exactitud en la determinación de HMF.

Réplica	Absorbancia	Absorbancia promedio	Concentración ($\pm 0,000007$ mg/mL)	Cn esperada (mg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)
Réplica 1	0,641	0,6415	0,005418	0,0060	90,8
	0,642				
Réplica 2	0,692	0,6915	0,005849	0,0060	98,1
	0,691				
Réplica 3	0,667	0,6680	0,005647	0,0060	94,7
	0,669				
Réplica 4	0,637	0,6370	0,005379	0,0060	90,2
	0,637				
Réplica 5	0,668	0,6675	0,005642	0,0060	94,6
	0,667				
Réplica 6	0,702	0,7020	0,005940	0,0060	99,6
	0,702				
Réplica 7	0,695	0,6955	0,005884	0,0060	98,6
	0,696				
Réplica 8	0,651	0,6510	0,005500	0,0060	92,2
	0,651				
Réplica 9	0,664	0,6635	0,005608	0,0060	94,0
	0,663				
Réplica 10	0,647	0,6470	0,005466	0,0060	91,6
	0,647				

Cuadro VII: Datos para la precisión en la determinación de HMF.

Réplica	Absorbancia	Absorbancia promedio	Concentración (± 0,000007 mg/mL)
Réplica 1	0,366	0,3635	0,003022
	0,361		
Réplica 2	0,362	0,3630	0,003017
	0,364		
Réplica 3	0,396	0,3955	0,003297
	0,395		
Réplica 4	0,374	0,3740	0,003112
	0,374		
Réplica 5	0,421	0,4195	0,003504
	0,418		
Réplica 6	0,403	0,4025	0,003358
	0,402		
Réplica 7	0,446	0,4465	0,003737
	0,447		
Réplica 8	0,375	0,3750	0,003121
	0,375		
Réplica 9	0,400	0,4000	0,003336
	0,400		
Réplica 10	0,350	0,3475	0,002884
	0,345		
Promedio		0,3890	0,003239
Desviación estándar		0,030	0,00026
Coefficiente de variación		8	8

Cuadro VIII: Datos para comparación de analistas en la determinación de HMF.

Analista 1				Analista 2															
Muestra	Absorbancia	Abs promedio	Cn ($\pm 0,000007$ mg/mL)	Muestra	Absorbancia	Abs promedio	Cn ($\pm 0,000007$ mg/mL)												
1	0,366	0,3635	0,003022	1	0,415	0,4155	0,003470												
	0,361				0,416														
2	0,362	0,3630	0,003017	2	0,386	0,3860	0,003216												
	0,364				0,386														
3	0,396	0,3955	0,003297	3	0,414	0,4150	0,003466												
	0,395				0,416														
4	0,374	0,3740	0,003112	4	0,428	0,4275	0,003573												
	0,374				0,427														
5	0,421	0,4195	0,003504	5	0,398	0,3995	0,003332												
	0,418				0,401														
6	0,403	0,4025	0,003358	6	0,377	0,3780	0,003147												
	0,402				0,379														
7	0,446	0,4465	0,003737	7	0,430	0,4330	0,003621												
	0,447				0,436														
8	0,375	0,3750	0,003121	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Prueba F</td> <td>2,1</td> </tr> <tr> <td>GL num</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>GL den</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>F crítica</td> <td>4,1</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">H₀ no hay diferencia</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Se retiene H₀</td> </tr> </table>				Prueba F	2,1	GL num	9	GL den	6	F crítica	4,1	H ₀ no hay diferencia		Se retiene H ₀	
	Prueba F							2,1											
GL num	9																		
GL den	6																		
F crítica	4,1																		
H ₀ no hay diferencia																			
Se retiene H ₀																			
9	0,400	0,4000	0,003336																
	0,400																		
10	0,350	0,3475	0,002884																
	0,345																		

8.1.2. Lactulosa

Cuadro IX: Datos para la primera curva de calibración de lactulosa.

Patrones	Alicuota de dis madre (mL)	Balón (mL)	Concentración ($\pm 0,0002$ mg/mL)	A1	A2	A3	A promedio
1	1,00	25,00	0,0841	0,0681	0,0680	0,0680	0,0680
2	2,00	25,00	0,1682	0,1213	0,1213	0,1214	0,1213
3	3,00	25,00	0,2524	0,1956	0,1955	0,1954	0,1955
4	4,00	25,00	0,3365	0,2621	0,2620	0,2618	0,2620
5	5,00	25,00	0,4206	0,3507	0,3506	0,3506	0,3506
6	6,00	25,00	0,5047	0,4397	0,4395	0,4392	0,4395
7	7,00	25,00	0,5888	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
8	8,00	25,00	0,6730	0,5495	0,5492	0,5492	0,5493
9	9,50	25,00	0,7991	0,6527	0,6527	0,6527	0,6527
10	11,00	25,00	0,9253	0,7050	0,7052	0,7050	0,7051
11	12,50	25,00	1,0515	0,7880	0,7880	0,7880	0,7880

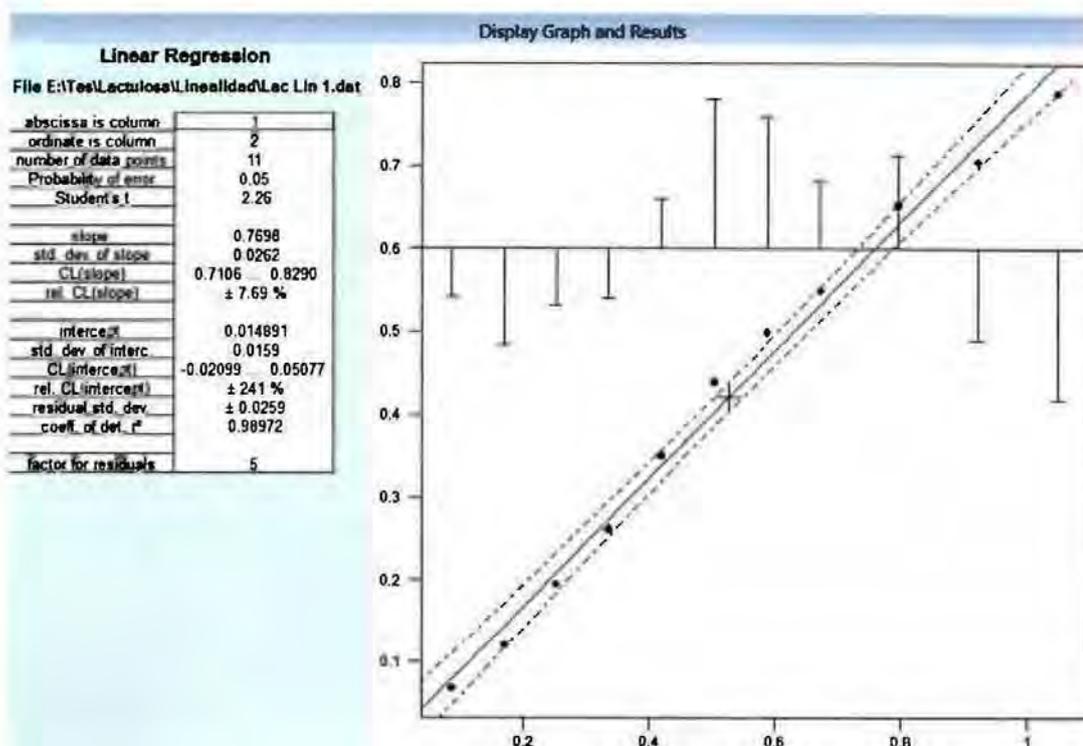


Figura 36: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con once datos.

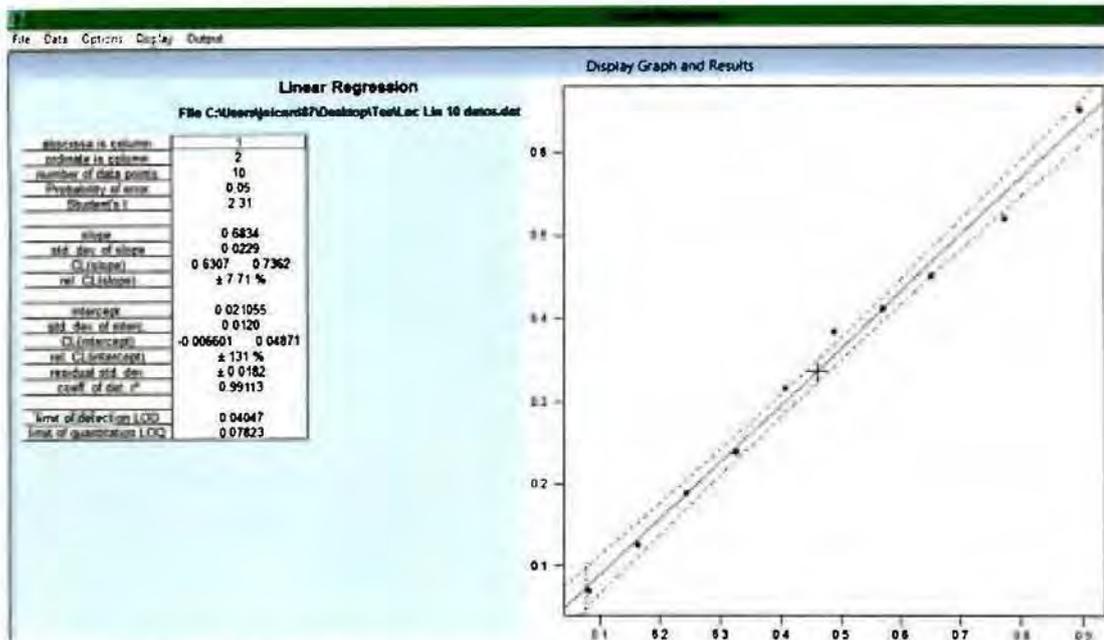


Figura 37: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con diez datos.

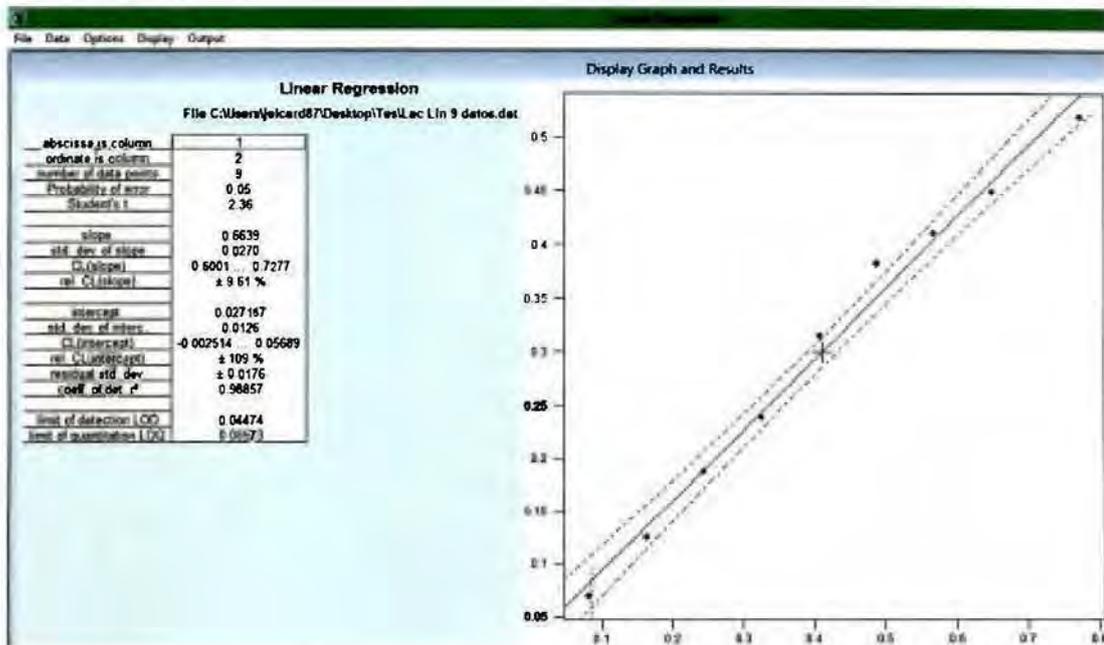


Figura 38: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con nueve datos.

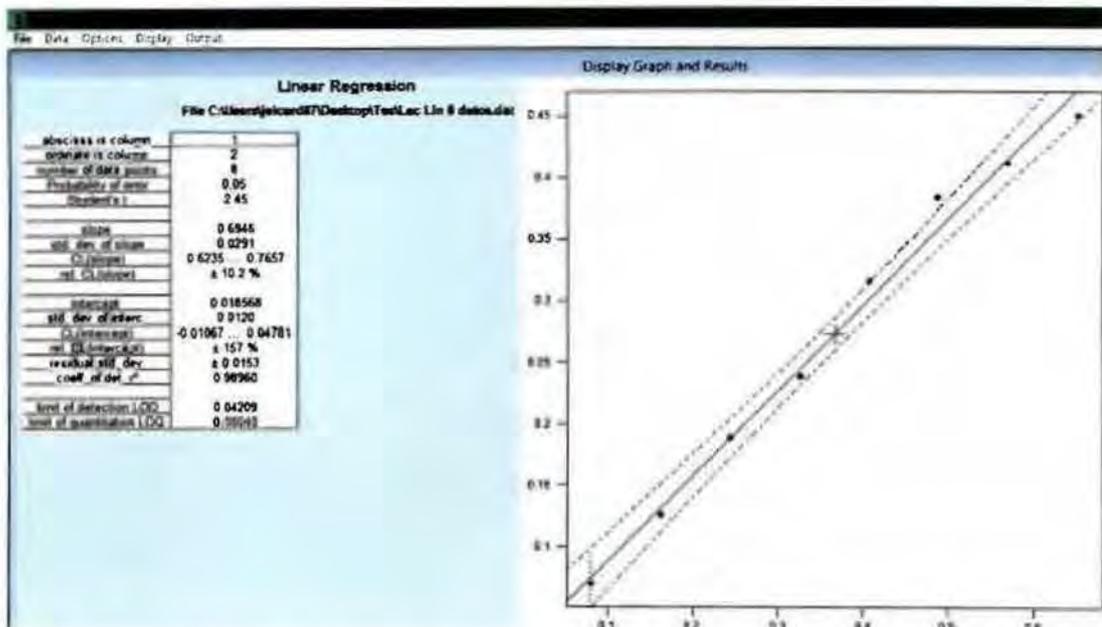


Figura 39: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con ocho datos.

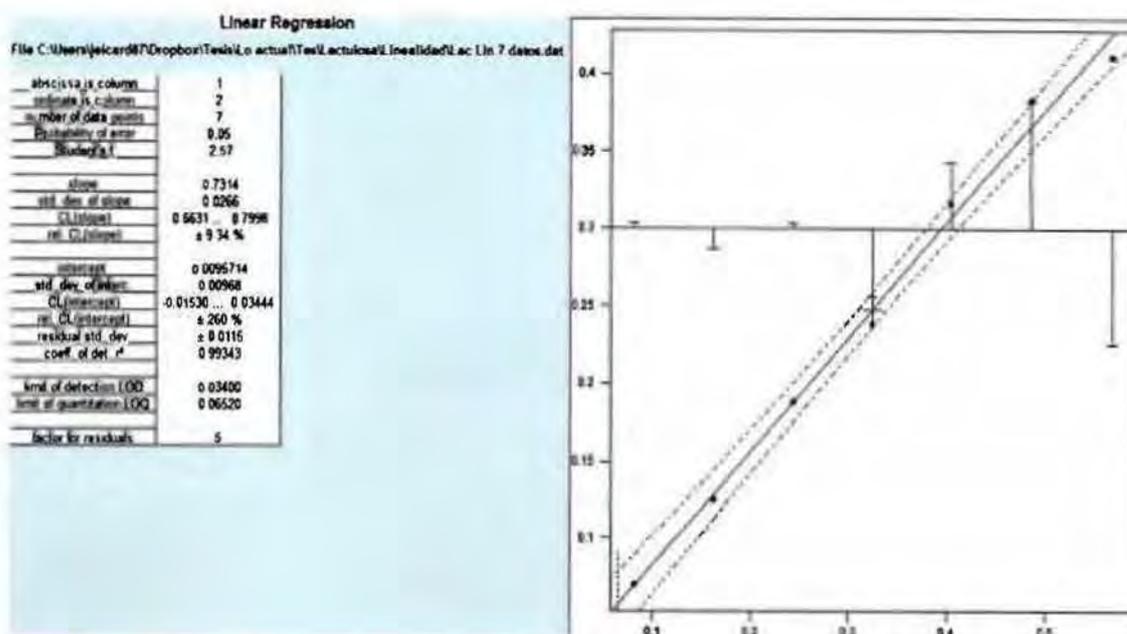


Figura 40: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con siete datos.

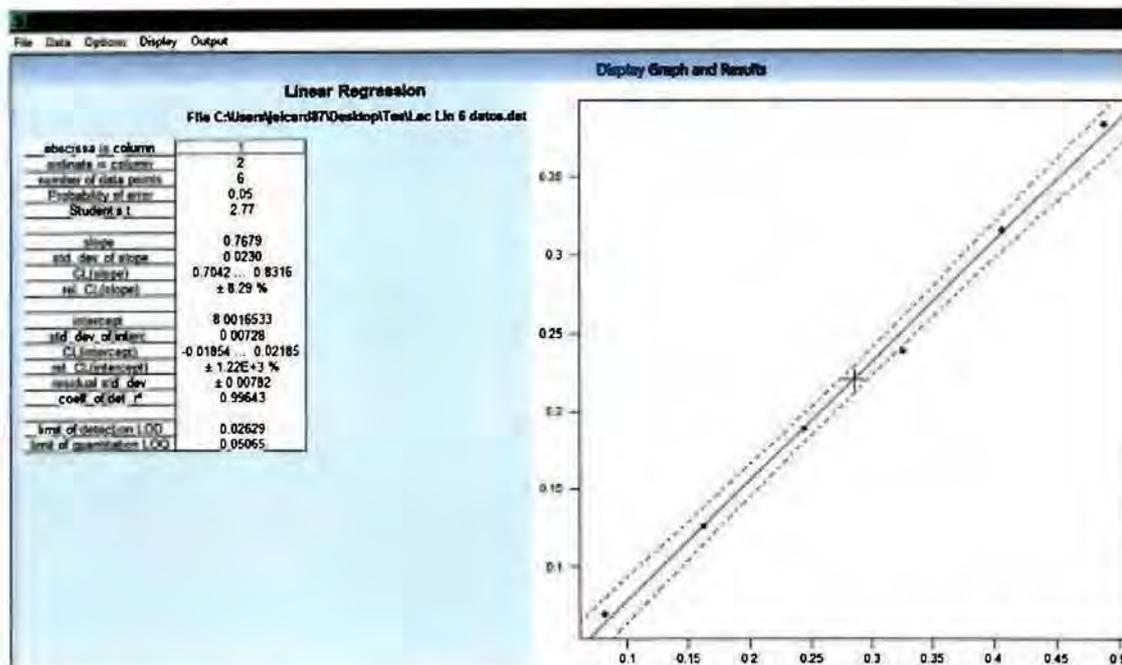


Figura 41: Linealidad, LD y LC obtenidos para la primera curva de calibración de lactulosa con seis datos.

Cuadro X: Datos para la segunda curva de calibración de lactulosa.

Patrones	Alícuota de dis madre (mL)	Balón (mL)	Concentración (± 0,0002 mg/mL)	A1	A2	A3	A promedio
1	1,00	25,00	0,0814	0,0697	0,0696	0,0697	0,0697
2	2,00	25,00	0,1628	0,1260	0,1260	0,1261	0,1260
3	3,00	25,00	0,2442	0,1891	0,1888	0,1888	0,1889
4	4,00	25,00	0,3256	0,2388	0,2388	0,2387	0,2388
5	5,00	25,00	0,4070	0,3158	0,3159	0,3157	0,3158
6	6,00	25,00	0,4884	0,3833	0,3834	0,3834	0,3834
7	7,00	25,00	0,5698	0,4114	0,4115	0,4115	0,4115
8	8,00	25,00	0,6512	0,4498	0,4500	0,4500	0,4499
9	9,50	25,00	0,7733	0,5196	0,5196	0,5197	0,5196
10	11,00	25,00	0,8954	0,6502	0,6502	0,6503	0,6502
11	12,50	25,00	1,0175	0,7880	0,7880	0,7880	0,7880

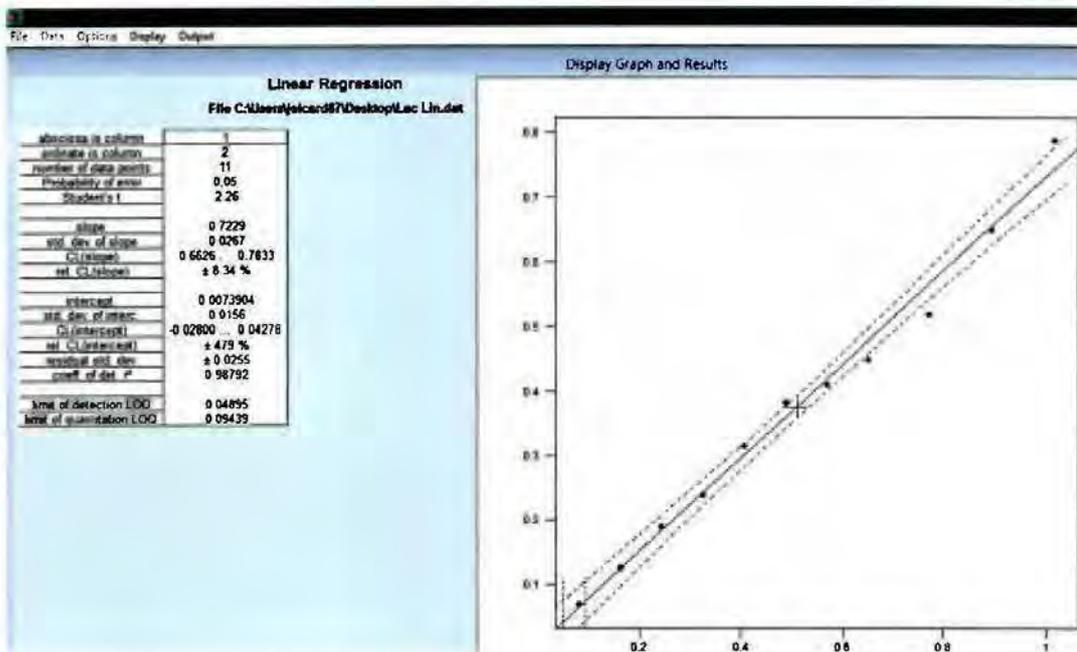


Figura 42: Linealidad, LD y LC obtenidos para la segunda curva de calibración de lactulosa con todos los datos.

Cuadro XI: Datos para la exactitud en la determinación de lactulosa.

Réplica	Absorbancia	Absorbancia promedio	Concentración (± 0,0002 mg/mL)	Cn esperada (mg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)
Réplica 1	0,254	0,2540	0,3424	0,3569	95,9
	0,254				
Réplica 2	0,258	0,2585	0,3486	0,3569	97,7
	0,259				
Réplica 3	0,257	0,2570	0,3465	0,3569	97,1
	0,257				
Réplica 4	0,260	0,2605	0,3514	0,3569	98,4
	0,261				
Réplica 5	0,259	0,2595	0,3500	0,3569	98,1
	0,260				
Réplica 6	0,246	0,2460	0,3313	0,3569	92,8
	0,246				
Réplica 7	0,254	0,2540	0,3424	0,3569	95,9
	0,254				
Réplica 8	0,259	0,2590	0,3493	0,3569	97,9
	0,259				
Réplica 9	0,257	0,2565	0,3458	0,3569	96,9
	0,256				
Réplica 10	0,262	0,2625	0,3542	0,3569	99,2
	0,263				

Cuadro XII: Datos para la precisión en la determinación de lactulosa.

Réplica	Absorbancia	Absorbancia promedio	Concentración (± 0,0002 mg/mL)
Réplica 1	0,089	0,0885	0,1125
	0,088		
Réplica 2	0,092	0,0920	0,1174
	0,092		
Réplica 3	0,096	0,0960	0,1229
	0,096		
Réplica 4	0,091	0,0905	0,1153
	0,090		
Réplica 5	0,097	0,0965	0,1236
	0,096		
Réplica 6	0,101	0,1010	0,1299
	0,101		
Réplica 7	0,093	0,0930	0,1188
	0,093		
Réplica 8	0,089	0,0890	0,1132
	0,089		
Réplica 9	0,099	0,0995	0,1278
	0,100		
Réplica 10	0,106	0,1060	0,1368
	0,106		
Promedio		0,095	0,1218
Desviación estándar		0,0057	0,0079
Coficiente de variación		6	6

**Cuadro XIII: Datos para comparación de analistas en la determinación de lactulosa
HMF.**

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
Muestra	Absorbancia	Abs promedio	Cn ($\pm 0,0002$ mg/mL)	Muestra	Absorbancia	Abs promedio	Cn ($\pm 0,0002$ mg/mL)
1	0,089	0,0887	0,1127	1	0,110	0,1107	0,1433
	0,089				0,111		
	0,088				0,111		
2	0,092	0,0920	0,1174	2	0,101	0,1010	0,1299
	0,092				0,101		
	0,092				0,101		
3	0,096	0,0960	0,1229	3	0,123	0,1230	0,1604
	0,096				0,123		
	0,096				0,123		
4	0,091	0,0903	0,1150	4	0,098	0,0980	0,1257
	0,090				0,098		
	0,090				0,098		
5	0,085	0,0857	0,1086	5	0,089	0,0887	0,1127
	0,086				0,089		
	0,086				0,088		
6	0,101	0,1010	0,1299	6	0,102	0,1023	0,1317
	0,101				0,102		
	0,101				0,103		
7	0,093	0,0930	0,1188	7	0,104	0,1050	0,1354
	0,093				0,105		
	0,093				0,106		
8	0,106	0,1060	0,1368	8	0,106	0,1060	0,1368
	0,106				0,106		
	0,106				0,106		
9	0,089	0,0890	0,1132	9	0,089	0,0890	0,1132
	0,089				0,089		
	0,089				0,089		
10	0,099	0,0993	0,1275	10	0,099	0,0993	0,1275
	0,100				0,100		

Prueba F	1,83
GL num	6
GL den	11
F crítica	3,09
H ₀ no hay diferencia	

	0,099		
11	0,113	0,1130	0,1465
	0,113		
	0,113		
12	0,096	0,0963	0,1234
	0,097		
	0,096		

Se retiene H_0