



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Inorgánica y Analítica

***Desarrollo y validación de una metodología para la  
identificación de azúcares simples en chocolates mediante  
HPLC-Índice de refracción***

Memoria para optar al título profesional de Químico

Diane Isabel López Opazo

Director de Memoria: Sarah Arcuri  
Nestlé, Laboratorio de Calidad

Académico Patrocinador: Dra. Tatiana Garrido Reyes  
Facultad de Ciencias. Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Santiago, Chile  
2022



## ***AGRADECIMIENTOS***

Esta tesis es el fruto de un extenso, intenso y profundo periodo formativo en el que me sumergí durante un largo tiempo de mi vida. Hubo muchísima gente a mi lado que me acompañó a lo largo de este complejo y aventurado recorrido. Quiero agradecer, en primer lugar, a mis abuelos mi Mami vieja y Papito viejo o más conocido como “Ramoncito”, el cual desde pequeña me mostró el mundo de la química, me enseñaron lo que era la disciplina lo cual me ayudó mucho para organizarme en todo lo que fue mi vida universitaria, además de todo el amor que me dieron desde que nací y los consejos siempre en base del amor y respeto para poder ser día a día mejor, gracias papitos por haber estado siempre para mí, porque sin duda sin ustedes no podría haber logrado nada.

Como no agradecer a mi mamá Lucia Isabel Opazo Sánchez, la mujer que más admiro en mi vida la que desde que era bebe me llevaba a sus clases, luego me llevaba a la universidad y me mostro que todo trabajo duro tiene recompensa y que la química la llevamos en la sangre y como bien dice ella ¡EL QUE QUIERE PUEDE!, me faltan palabras para agradecer todo lo que hiciste por mí, porque siempre te esforzaste para poder darnos todo y eso estaré agradecida toda la vida. Agradecer igual al Tío Alfredo, si bien no estuvo en todo el proceso, desde que llego a mi vida siempre me apoyo, aconsejo, mimo y consoló también cuando estaba mal, fue participe de mis gastos universitarios sin pedir nunca nada a cambio y eso lo agradezco de corazón, ya que nunca tuvo una obligación de hacerlo y el apoyo del tío fue desde el día 1 de forma incondicional. A mi madrina la “tita” mi segunda madre que siempre estuvo apoyándome y aconsejándome, la que me retaba sin pelos en la lengua y me decía las cosas tal cual eran. A mi tía Lupe, Tatita, tío Eduardo, tío Martin y mis primos que son fundamentales en mi vida el cual nos criamos juntos y sin duda cada logro siempre quiero celebrarlos con ustedes. No puede faltar el agradecimiento al más pequeño e importante de la familia mi hermanito, mi Felipin, el que me decía “hermana se te va a salir el ojo tanto estudiar” y siempre me llevaba algo para comer en las noches o tardes de estudio y se preocupaba de que todo estuviera bien. Agradecer a mi papá que de una u otra

forma me dio su apoyo moral y desde chica fue bastante exigente conmigo en el ámbito estudiantil el cual creo conciencia de una u otra forma en cómo debería ser mi desempeño, lo cual me ayudo siempre a buscar metas y objetivos, gracias por formarme como una mujer fuerte y aguerrida. Gracias a mi familia por siempre haberme sostenido y apoyado en cada paso con amor, comprensión y alegría.

Todo mi proceso universitario estuve acompañada de una de las personas que me enseñó a darme cuenta que yo si era capaz, el que me paro cuando la frustración era más fuerte el que me paraba y me decía ¡¡TÚ PUEDES ERES SECA!!, el que me abrazaba porque colapsaba y entendía cada uno de mis berrinches, el que me iba a buscar a la universidad o me iba a dejar cuando llovía porque a la linda no le gustaba mojarse, gracias Gabriel por acompañarme y haber estado para mí en una de las etapas más importantes de mi vida

Uno de los agradecimientos más importantes y especiales son también para la mejor docente que he conocido Tatiana Garrido, más que una profesora es y forma parte de mi familia, estoy muy contenta de haber realizado todo el proceso de la unidad de laboratorio y tesis con usted una hermosa persona de la cual he aprendido muchas cosas desde lo académico, hasta lo humano, sin duda sin sus palabras, sin sus ¡VAMOS QUE QUEDA POQUITO! , todo hubiese sido mucho más difícil. Gracias al profe Jorge por siempre estar presente en el proceso, un hombre de pocas palabras, pero sin duda muy sabias. Dentro de este proceso cuando llegué al laboratorio conocí a 3 grandes amigos y compañeros de laboratorio, Margaret, Álvaro y Patito de los cuales aprendí mucho y además me aconsejaron mucho sobre todo lo que era la vida de adulto, la tesis (tenían razón, sin sufrimiento no es tesis) y la pasamos tan bien compartiendo en diferentes situaciones, ya que obvio no todo es estudio.

A mis amigos, en el lugar del mundo en el que se encuentren, que muchas veces tuvieron que lamentar mis ausencias en este tiempo pero que, aun así, siguieron junto a mí. Mis amigas del liceo, mi gran amiga de la infancia la Fran, la Vale y el Pipe que siempre me

soportaban el mal genio por no poder terminar este difícil proceso. A mis pocos amigos de la universidad por no decir solo al Sebita que pasamos nuestros primeros años de universidad estudiando a full para buscar siempre eximirnos y también todo lo que era salir, los viernes en los pastos o en el bus en ese entonces porque también necesitábamos relajarnos.

En el plano profesional, estoy convencida de que este trabajo no hubiese llegado a ser lo que es sin la guía de mi director de tesis, Sarah Arcuri quien me escuchó, guío, pacientemente y creyó en mí dándome la oportunidad de poder seguir creciendo y avanzando dentro del departamento. También agradecer a María Francisca Gutiérrez por el trabajo codo a codo, por enseñarme día a día, confiar en mí y los consejos, es muy grato tener personas de tan buen corazón de colega. En Nestlé, específicamente CPW tengo dos grandes amigos los cuales, me apoyan, aconsejan, cuidan y también tenemos momentos de recreación Rubén Santana y Hans Hernández, gracias por todo son mis angelitos del camino.

También agradecer a todos los docentes que formaron parte de mi vida universitaria de los que no están y los que están, todos fueron parte importante de mi crecimiento personal y profesional.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE .....	vi
SUMMARY .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	44
2. HIPÓTESIS .....	52
3. OBJETIVOS .....	52
3.1 GENERAL .....	52
3.2 ESPECÍFICOS .....	52
4. MATERIALES .....	53
4.1 MATERIALES .....	53
4.2 REACTIVOS .....	53
4.3 EQUIPOS .....	54
5. METODOLOGÍA .....	55
5.1 ANÁLISIS DE AZÚCARES POR MEDIO DE HPLC- índice de refracción .....	55
5.1.1 Condiciones cromatográficas .....	55
5.2 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES DESDE MATRIZ CHOCOLATE .....	55
5.3 VALIDACIÓN METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	56
5.3.1 CURVA DE CALIBRACIÓN .....	56
5.3.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN .....	57
5.3.3 PRECISION .....	58
5.3.4 RECUPERACION .....	58
5.5 ANÁLISIS MUESTRAS DE CHOCOLATE .....	59
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS .....	59

6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
6.1	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES POR MEDIO DE HPLC-IR. ....	60
6.2	CURVA DE CALIBRACIÓN .....	64
6.3	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LA TECNICA.....	65
6.4	METODOLOGIA DE EXTRACCIÓN .....	66
	.....	66
6.5	CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ .....	67
6.6	CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ LACTOSA .....	69
6.7	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LA METODOLOGIA .....	72
6.8	EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD .....	73
6.9	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA METODOLOGIA .....	75
6.10	ANALISIS MUESTRAS DE CHOCOLATE .....	77
7.	CONCLUSIONES.....	81
	BIBLIOGRAFIA .....	83
	ANEXOS .....	85

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 Sellos de advertencia (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 1997) .....	44
Figura 2 Principales disacáridos utilizados en la industria de alimentos (Nelson & Cox, 2005) .....	46
Figura 3 Diagrama proceso de fabricación del chocolate (Beckett, 2000) .....	48
Figura 4 Refractómetro de desviación de haz óptico (Yusá Marco & de Marina Bayo , 2016) .....	51
Figura 5 Cromatograma prueba 1 concentración 0,002 g/mL .....	61
Figura 6 Preparación muestras para prueba 2, concentración $8 \times 10^{-5}$ g/m .....	61
Figura 7 Cromatograma prueba 2 concentración $8 \times 10^{-5}$ g/mL.....	62
Figura 8 Representación de parámetros para el cálculo de la resolución (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992) .....	63
Figura 9 Curva de calibración en solvente de los azúcares en estudio, análisis realizados por HPLC-IR.....	65
Figura 10 Muestra obtenida tras la extracción según metodología 1 .....	66
Figura 11 Muestra obtenida tras la extracción según metodología 2 .....	66
Figura 12 Cromatograma por HPLC-IR de extracto de muestra de chocolate sin fortificar .....	67
Figura 13 Curva de calibración en matriz de los azúcares en estudio, análisis realizado por HPLC-IR.....	68
Figura 14 Cromatograma muestra de chocolate fortificado 0,03 g/100 mL .....	70
Figura 15 Cromatograma muestra de chocolate fortificado 0,1 g/100 mL .....	71
Figura 16 Cromatograma de la muestra 2 de chocolate, libre de gluten con 34% de grasa .....	78
Figura 17 Cromatograma de la muestra 3 de chocolate con un 85% cacao.....	79
Figura 18 Propuesta de procedimiento optimizado para el análisis de chocolate .....	80

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1 Polioles empleados como edulcorantes en la matriz de chocolate .....	49
Tabla 2 Condiciones de trabajo HPLC-IR para análisis de azúcares .....	60
Tabla 3 Resultados cromatográficos prueba 1 .....	63
Tabla 4 Resultados cromatográficos prueba 2 .....	63
Tabla 5 Curvas de calibración en solvente de los azúcares seleccionados para este estudio .....	64
Tabla 6 Límites de detección y cuantificación en solventes .....	65
Tabla 7 Curvas de calibración en matriz de los azúcares seleccionados para este estudio .....	68
Tabla 8 Curvas de calibración en matriz para lactosa .....	71
Tabla 9 Límites de detección y cuantificación en matriz .....	73
Tabla 10 Evaluación de la repetibilidad .....	74
Tabla 11 Evaluación de la reproducibilidad .....	75



Tabla 12 Porcentaje de recuperación de la metodología .....	76
Tabla 13 Características de las muestras de chocolate sin azúcar .....	77
Tabla 14 Resultados del análisis de muestra 1 .....	77
Tabla 15 Resultados del análisis de muestra 2 .....	77
Tabla 16 Resultados del análisis de muestra 3 .....	78

## ÍNDICE DE ANEXO

TABLA A1 1 Masa de azúcar para muestras de baja concentración 1,0 g/mL.....	85
TABLA A1 2 Masa de azúcar para muestras de baja concentración 2,0 g/mL.....	85
TABLA A1 3 Área promedio en solvente para fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa. ....	85
Figura 2 1 Curva de calibración solvente Fructosa .....	87
Figura 2 2 Curva de calibración solvente Glucosa .....	87
Figura 2 3 Curva de calibración solvente Sacarosa.....	88
Figura 2 4 Curva de calibración solvente Maltosa .....	88
Figura 2 5 Curva de calibración solvente Lactosa.....	88
TABLA 3 1 Curvas promedio en matriz para fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa.....	89
TABLA 3 2 Tabla de gramos utilizados por estándar y muestra de chocolate para la curva en matriz .....	90
TABLA 5 1 Curva promedio en matriz para Lactosa .....	92
Figura 6 1 Curva de calibración en matriz Lactosa seleccionando 3 puntos .....	92
Figura 6 2 Curva de calibración en matriz Lactosa seleccionando todos los puntos.....	93
TABLA 7 1 Datos de gramos de muestras para std 0,3-0,4 g/100mL.....	95
TABLA 8 1 Áreas utilizadas para cálculo de recuperación en muestras de chocolate.....	95
TABLA 8 2 Gramos de muestras de chocolate y muestras del estándar utilizadas para fortificar .....	95



## **RESUMEN**

En Chile el consumo de productos procesados, con altos niveles de azúcares ha crecido de forma exponencial, lo que también conlleva al aumento de enfermedades como obesidad, diabetes, hígado graso entre otras, además de contribuir a alteraciones psicológicas, por ejemplo, hiperactividad, por lo que el consumo de estos carbohidratos tiene un gran impacto en lo que es la salud de las personas, es por ello que es importante considerar la regulación de su contenido en los productos procesados. Por esta razón, se dio inicio a una regulación enfocada a la clasificación de estos aspectos, donde se estableció la cantidad de azúcar permitido en los alimentos, por lo que dichos productos procesados que no contengan la clasificación establecida de “alto en Azúcar” deben asegurar de forma analítica la cantidad de azúcar que ellos contienen, ya que el incumplimiento del reglamento conlleva aumento de impuestos, sanciones sanitarias y hasta clausura de la marca por una publicidad que podría causar daño al consumidor.

Dentro de los alimentos que contienen una alta cantidad de azúcar se encuentra el chocolate, en el cual Chile se posiciona como el primer país que más consume chocolate en América Latina. En el último año en Chile existe mayor demanda por productos saludables debido a la Ley de Etiquetado de Alimentos implementada el 2016, por ello la gama de productos baja en azúcares ha aumentado, debido a una buena aceptación por el mercado chileno, donde se puede encontrar una gran variedad de tipos.

La finalidad de esta tesis fue desarrollar y validar una metodología de extracción, determinación y cuantificación de fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa, por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC-IR), en muestras de chocolate con distintos porcentajes de contenido de grasa. Para ello se utilizó la metodología de HPLC-IR, utilizando una columna amino NH<sub>2</sub>, y una mezcla de solventes, acetonitrilo: agua grado HPLC (80:20), como fase móvil. Se comprobó la

separación y se obtuvieron los tiempos de retención de los picos cromatográficos de los carbohidratos (fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa).

Los resultados obtenidos para las muestras de chocolate presentaron un LD inferior a 0,00061 g/mL para glucosa, sacarosa y maltosa, con una repetibilidad y reproducibilidad menor al 16%. La recuperación para sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa fue superior a un 99%.

Con este estudio se permitió corroborar que todas las muestras de chocolate sin azúcar se encontraron con resultados cercanos al límite de cuantificación establecido, siendo todos menor a 10 g/ mL cumpliendo con la ley establecida por el país.

## *SUMMARY*

In Chile the consumption of processed products with high levels of sugars has grown exponentially, which also leads to an increase in diseases such as obesity, diabetes, fatty liver among others, in addition to contributing to psychological disorders, for example, hyperactivity, so the consumption of these carbohydrates has a great impact on the health of people, which is why it is important to consider the regulation of its content in processed products. For this reason, a regulation focused on the classification of these aspects was initiated, where the amount of sugar allowed in foods was established, so that those processed products that do not contain the established classification of "high sugar" must ensure analytically the amount of sugar they contain, since non-compliance with the regulation leads to increased taxes, health sanctions and even closure of the brand for advertising that could cause harm to the consumer.

Among the foods that contain a high amount of sugar is chocolate, in which Chile is positioned as the first country that consumes the most chocolate in Latin America. In the last year in Chile there is greater demand for healthy products due to the Food Labeling Law implemented in 2016, therefore the range of low sugar products has increased, due to a good acceptance by the Chilean market, where you can find a wide variety of types

The purpose of this thesis was to develop and validate a methodology for the extraction, determination and quantification of fructose, glucose, sucrose, maltose, and lactose, by high performance liquid chromatography coupled to a refractive index detector (HPLC-refractive index), in chocolate samples with different percentages of fat content. For this purpose, the HPLC-refractive index methodology was used, using an amino NH<sub>2</sub> column, and a solvent mixture, acetonitrile: water HPLC grade (80:20), as mobile phase. The separation was checked and the retention times of the chromatographic peaks of the carbohydrates (fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose) were obtained.

The results obtained for the chocolate samples showed a LD of less than 0.00061 g/mL for glucose, sucrose, and maltose, with a repeatability and reproducibility of less than 16%. The recovery for sucrose, glucose, fructose, and maltose was greater than 99%.

With this study it was possible to corroborate that all the sugar-free chocolate samples were found with results close to the established limit of quantification, all being less than 10 g/mL, complying with the law established by the country.

## 1. INTRODUCCIÓN

Según la organización mundial de la salud (OMS), la obesidad y el sobrepeso son uno de los principales factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y los accidentes cerebrovasculares, así como varios tipos de cáncer, sumado a que los niños con sobrepeso tienen un mayor riesgo a llegar a ser obesos en la edad adulta. En la población chilena más del 60% tiene algún grado de exceso de peso, debido a esto, en el año 2016 se implementó la Ley 20.606 de etiquetados “ALTO EN” (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2009-2010) calorías, grasas saturadas, sodio y azúcares , por lo que, las industrias de alimentos deben responder ante esta nueva regulación, ajustándose a los límites que exige la normativa vigente, como por ejemplo en el caso los productos sólidos cada 100 gramos deberán tener el sello de advertencia a las 275 Kcal, 400 mg de sodio, 10 g de azúcares y 4 g de grasas (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2022).

Entre estas categorías, el azúcar es uno de los sellos más relevantes que se incluye en el etiquetado, tanto para pacientes con enfermedades crónicas como la diabetes, como para personas sanas, ya que a través de estos sellos es posible seleccionar de manera informada los alimentos a consumir (Figura 1).



Figura 1 Sellos de advertencia (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 1997)

Uno de los factores asociados al sobrepeso y obesidad es el alto consumo de alimentos azucarados, por lo que la tendencia es a disminuir el uso de azúcares, sustituyéndola por edulcorantes los cuales mimetizan el efecto dulce aportando menor energía (Foreyt , Sigman-Grant, B Allison , & Anderson, 2012), es por ello que es importante utilizar el etiquetado nutricional, ya que se mencionan los hidratos de carbonos que al ser digeridos y metabolizados aumentan la glicemia e insulinemia, esto puede generar problemas a las personas con enfermedades como la diabetes, por lo que es de gran utilidad la visualización del sello para tener una advertencia de que esto podría causar un daño a su salud, según las indicaciones medicas que tenga cada paciente.

Debido al impacto sobre la salud del consumo del azúcar, es que se han creado nuevas políticas de Administración de Alimentos y Medicamentos, en la cual se recomienda el análisis de los alimentos cuando la presencia de azúcares es superior al 1%. (Petkova, Brabant, Masson , & Denev, 2013)

Se utiliza el término de azúcares para referirse a la suma de monosacáridos y disacáridos presentes, los cuales poseen varias propiedades funcionales que se aprovechan en la elaboración de alimentos, por ejemplo: son utilizados para conferir ciertos atributos sensoriales a los alimentos, tales como, viscosidad, textura y cuerpo (Chen, 1999).

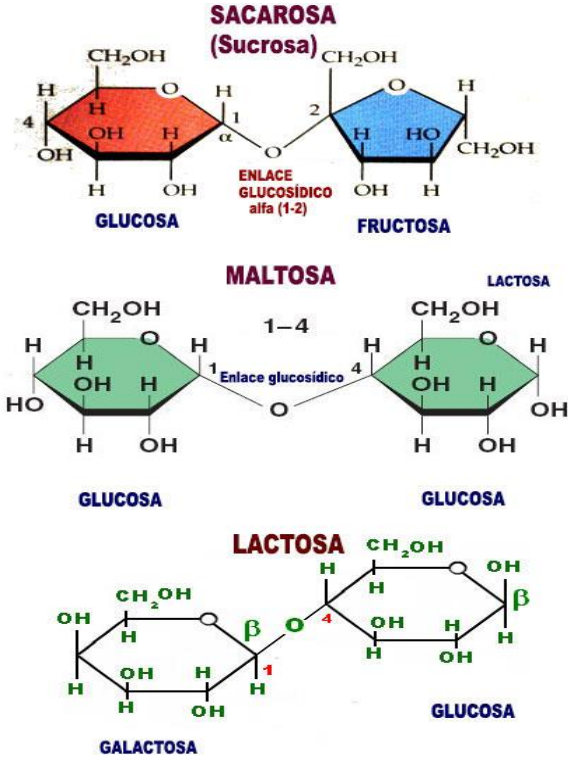
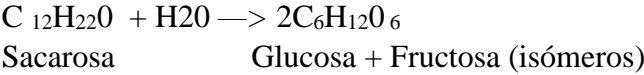
Entre los edulcorantes naturales más utilizados en la industria de alimentos encontramos la sacarosa, fructosa, glucosa que tiene un índice glicémico (IG) de 100 y poder edulcorante relativo a la sacarosa entre 0,5-1, valor considerado moderado-alto. El IG corresponde a la rapidez con la que un alimento puede elevar su nivel de azúcar en la sangre (García-Almeida, Gracia-Casado, & García Alemán , 2013).

Los azucares están compuestos por átomos de C, H y O, y corresponden a un tipo específico de hidratos de carbono, donde podemos diferenciar a los monosacáridos que presentan solo una unidad de polihidroxicetona o polihidroxialdehido, el más abundante y utilizado es la glucosa. Estas unidades de monosacáridos se pueden unir entre ellos a través de enlaces



glucosídicos, los cuales se conocen como oligosacáridos, los más abundantes son los disacáridos y entre ellos el más común de éstos es la sacarosa. Dichas azúcares son reductoras y poseen su grupo funcional carbonilo, a través del cual pueden reaccionar como reductores con otras moléculas (Nelson & Cox, 2005).

En la figura 2, se puede apreciar que los disacáridos están compuestos por dos azúcares simples unidos químicamente:



**Figura 2** Principales disacáridos utilizados en la industria de alimentos (Nelson & Cox, 2005)

La determinación del contenido de azúcares presente en distintos tipos de alimentos requiere el análisis de mono y disacáridos, como son glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y maltosa, siendo la elección de la metodología de extracción según la matriz en estudio determinante.

Uno de los alimentos más consumidos por la población, son los chocolates, siendo Chile el país de América Latina que más chocolate consume por persona, con un promedio de 2,1 Kg per cápita al año (Michavila Fossati & Pardavila, 2020). Pudiéndose encontrar distintas variedades, según la mezcla que se realice con la pasta de cacao, dentro de ellas podemos encontrar: (Beckett, 2000)

-Chocolate negro, crema o manteca de cacao hasta un 70 % con azúcar.

-Chocolate con leche, contiene cacao, manteca de cacao, azúcar, leche en polvo, extracto de vainilla y lecitina de soja.

-Chocolate Blanco, cuando se añade a la leche azúcar y manteca de cacao, el color corresponde a la falta de la almendra tostada del cacao

-Chocolate líquido, se sustituye la manteca de cacao por aceite vegetal.

Tradicionalmente el contenido en azúcares en los chocolates alcanza cerca de un 50%, la mayor parte en forma de sacarosa, pero también con lactosa proveniente de los productos lácteos empleados en el chocolate con leche (Pérez Zuñiga, 2009). El proceso de fabricación de chocolate considera varias etapas, siendo de suma importancia el mezclado, etapa en la cual se agrega el azúcar y leche o los saborizantes según el tipo de chocolate que se desee obtener (figura 3). Para ampliar el consumo de chocolate y disminuir su posible efecto en la salud se han desarrollado nuevas fórmulas en las que se incorpora fructosa, otro tipo de azúcar que también se encuentra presente en la miel y otros edulcorantes que no son azúcares, como el sorbitol.

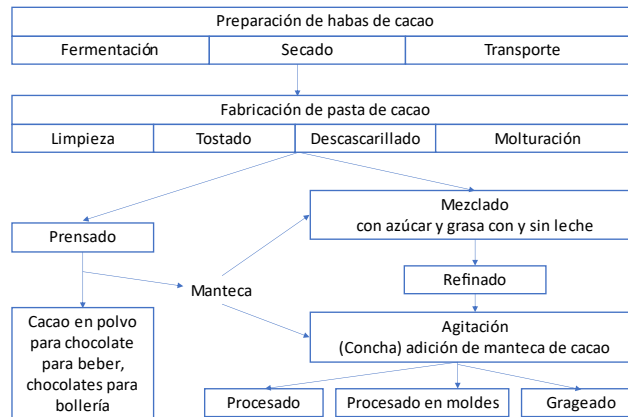


Figura 3 Diagrama proceso de fabricación del chocolate (Beckett, 2000)

Por otro lado, en los últimos años y debido a la búsqueda de una alimentación sana, ha incrementado la demanda de chocolates bajos en calorías, para lo cual se están utilizando sustitutos del azúcar, con menor aporte calórico como son los polialcoholes (polioles).

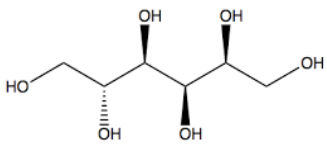
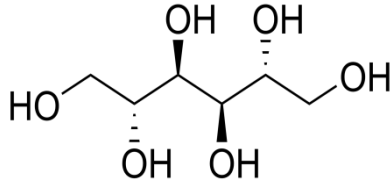
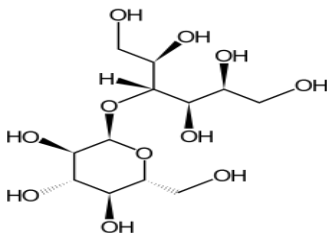
En relación con el aporte calórico, se establece que la sacarosa proporciona 4,0 kcal/g a diferencia de los polioles que aportan 2,4 kcal/g. Otro compuesto usado para sustituir a los azúcares es xilitol, que se encuentra de forma natural en muchas frutas. (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2009-2010). Entre los polialcoholes más habituales se incluyen: el sorbitol, el manitol, el maltitol y el lactitol (tabla 1).

Los alcoholes polihídricos conocidos como polioles poseen varios grupos hidroxilos, unidos a una cadena carbono hidrógeno, estos compuestos son carbohidratos de digestión lenta, que, a diferencia del azúcar tradicional, se absorben poco en el intestino delgado. La gran variedad de polioles disponibles permite su uso como sustitutos de la mayoría de los azúcares tradicionales empleados en la producción de dulces y golosinas, sin modificar su sabor o calidad.

Entre los componentes del chocolate también encontramos la leche, la cual presenta un alto porcentaje de materia grasa, la cual limita la vida útil del producto ya que sufre oxidación o lipólisis; es decir, las enzimas aceleran la ruptura de ácidos grasos, es por esta

razón que se minimiza el contacto con el oxígeno, para lo cual se sustituye el aire en el envase por nitrógeno y se emplea un material para el envasado capaz de aislar el producto del oxígeno; otra alternativa es el almacenamiento en frío y evitar la presencia de catalizadores de los procesos de oxidación como son el cobre y el hierro (Beckett, 2000)

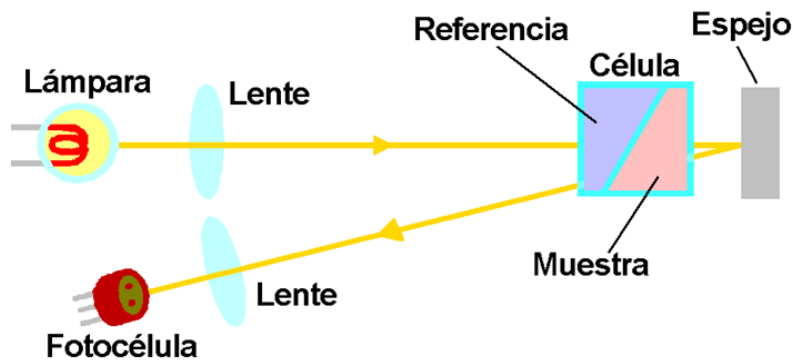
Tabla 1 Polioles empleados como edulcorantes en la matriz de chocolate

Nombre	Figura	Obtención	Usos
Sorbitol  ((2S,3R,4R,5R)-hexano-1,2,3,4,5,6-hexol)		Reducción de glucosa	Edulcorante dietético, elaboración de alimentos, cosméticos, fármacos y productos químicos.
Manitol  ((2R,3R,4R,5R)-hexano-1,2,3,4,5,6-hexol)		Hidrogenación de fructosa o manosa	Edulcorante dietético, elaboración de fármacos y resinas
Maltitol  (4-O-α-D-glucopiranosil-D-glucitol)		Hidrogenación de maltosa (obtenida de almidón)	Edulcorante bajo en calorías para productos de panadería y confitería

En el mismo contexto, se puede observar que existe una gran diversidad de chocolates en el mercado y entre ellos, podemos mencionar los chocolates con leche, los cuales contienen aproximadamente un 30% de materia grasa (manteca de cacao), un 6% de proteínas, un 61% de carbohidratos, y un 3% de humedad junto con minerales que contienen fósforo, calcio y hierro (Beckett, 2000).

Para la determinación de hidratos de carbonos, se utilizan los métodos cromatográficos, tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), esto debido a que los azúcares son polares, hidrofílicos y muy poco volátiles, por lo que la determinación de carbohidratos por la técnica HPLC ha sido ampliamente utilizada para la separación, identificación y determinación cuantitativa de estas sustancias (Skoog, Holler , & Crouch , 2008).

Para la cuantificación de analitos por medio de HPLC se cuenta con distintos tipos de detectores, donde algunos de ellos se basan en el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil como por ejemplo: el detector por índice de refracción, el cual se basa en medir el cambio de índice de refracción cuando se eluye la muestra con la fase móvil (Figura 4), comparando la variación entre la fase móvil como referencia y la muestra, razón por la cual para este tipo de detección es de suma importancia una correcta elección de la proporcionalidad de la fase móvil que se utilizará para obtener diferencia en los índices de refracción utilizados. (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992)



**Figura 4** Refractómetro de desviación de haz óptico (Yusá Marco & de Marina Bayo , 2016)

Por otra parte, la elección de la metodología de extracción del analito desde la matriz es de suma importancia, siendo la extracción líquido-líquido el método más utilizado para la matriz de chocolate, la cual consiste en la obtención de una mezcla acuosa de chocolate, para luego adicionar un disolvente orgánico, que sea inmisible con el agua y capaz de solubilizar la máxima cantidad del analito a extraer de forma selectiva, la agitación de la mezcla producirá una transferencia del analito desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad directamente proporcional a su coeficiente de reparto entre el disolvente orgánico y el agua, finalmente, debido a la diferencia de densidades entre las fases el analito se separa y puede ser analizado por HPLC-índice de refracción (Belscak-Cvitanovic, y otros, 2015).

En relación a lo mencionado anteriormente, surge la necesidad en la industria de alimentos de validar e implementar una metodología para la determinación y cuantificación de azúcares simples en la matriz de chocolate, de forma exacta y precisa usando la técnica de HPLC con detector de índice de refracción, metodología de gran importancia, ya que a través de ella será posible determinar el aporte calórico de este alimento, comparando los resultados en chocolates con distinto porcentaje de materia grasa, información que puede ser utilizada para guiar el consumo de alimentos con menor impacto para la salud.

## ***2. HIPÓTESIS***

Por los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente hipótesis:

El contenido de materia grasa presente en la matriz chocolate no influye en la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa por medio de la metodología de extracción líquido-líquido y cuantificación por HPLC-índice de refracción.

---

## ***3. OBJETIVOS***

### **3.1 GENERAL**

- Desarrollar, validar e implementar una metodología de análisis de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en matriz chocolate.

### **3.2 ESPECÍFICOS**

1. Optimizar los parámetros cromatográficos para la determinación de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa, mediante HPLC-índice de refracción.
2. Desarrollar una metodología de extracción de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa, por medio de extracción líquido-líquido en matriz chocolate.
3. Validar e Implementar una metodología analítica para el análisis de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa en chocolate.
4. Analizar muestras de chocolate.

## **4 MATERIALES**

### **4.1 MATERIALES**

- Pipetas aforadas: 10 mL; 4 mL; 1 mL; 2 mL
- Probeta graduada
- Tubos Falcon
- Frascos de vidrio
- Vasos precipitados 100 mL
- Filtro de fibra de vidrio
- Filtro Millex
- Matraz aforado 100 mL

### **4.2 REACTIVOS**

- Agua Destilada Grado HPLC, Merck
- Acetonitrilo Grado HPLC, Merck

Estándares Azúcares:

- Fructosa, Merck
- Glucosa, Merck
- Sacarosa, Merck
- Maltosa Monohidratada, Merck
- Lactosa Monohidratada, Merck



### 4.3 EQUIPOS

- Balanza Analítica, Metter Toledo modelo MS204S/01
- Centrífuga, Eppendorf modelo centrifuge 520
- Baño Termorregulado VWX
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), Chromaster, detector: índice de refracción. autosampler, horno columna.
- Columna Merck Purospher STAR-NH2 250 x 4,6 mm (5  $\mu$ m)
- Ultrasonido VWX

## **5 METODOLOGÍA**

### **5.1 ANÁLISIS DE AZÚCARES POR MEDIO DE HPLC-índice de refracción**

#### **5.1.1 Condiciones cromatográficas**

Para los análisis por medio de HPLC- índice de refracción las condiciones cromatográficas seleccionadas inicialmente se basaron en el trabajo de Ureña, 2007, usando una columna Merck Purospher STAR-NH<sub>2</sub> 5µm 250mm x 4,6mm, inicialmente se usó como fase móvil acetonitrilo: agua en proporción 50:50 v/v, con un flujo 1,5 mL/min, modificándose la proporción de acetonitrilo: agua a 80:20 v/v, con el objetivo de mejorar la separación cromatográfica.

Se realizó la determinación de los parámetros analíticos cromatográficos de la técnica para lo cual se prepararon soluciones con los 4 analitos de interés (fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa), usando como solvente de extracción acetonitrilo: agua en proporción 50:50 v/v.

Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los analitos, así como la resolución entre las señales obtenidas.

### **5.2 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES DESDE MATRIZ CHOCOLATE.**

Para el estudio se seleccionó un chocolate sin azúcar con un porcentaje de materia grasa de aproximadamente 39%, con esta muestra se trabajó en la evaluación de la metodología de extracción.

Se realizó la extracción en muestras de chocolate sin fortificar (blanco) y muestras de chocolate fortificadas con 2 veces la concentración del LC determinado para la técnica (De

Whalley, 1964). Las metodologías de extracción evaluadas fueron dos, las cuales corresponden a:

**Metodología 1** (Belscak-Cvitanovic, y otros, 2015): se pesó entre 0,02- 1,00 g de chocolate, al cual se le adicionó una solución de Agua: Acetonitrilo (30:70 V/V). Esta mezcla se agitó por 10 minutos y se centrifugó a 3000 rpm para separar el sobrenadante, el cual fue filtrado y llevado a un matraz de 10 mL aforado con la mezcla antes usada de Agua: Acetonitrilo. Antes del análisis por HPLC- índice de refracción las muestras fueron filtradas por filtros de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  de PVDF.

**Metodología 2** (Koh, Park, Lim, Yea, & Bang, 2018): se pesó entre 0,02-1,00 g de chocolate, y se adicionó una mezcla agua: etanol 50:50 v/v, esta mezcla se calentó a 80°C por 30 minutos. Esta solución se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue separado de la solución, el cual se filtró y llevo a matraz de 10 mL, luego se aforó con la mezcla agua: etanol, usada anteriormente. Antes de los análisis por HPLC- índice de refracción las muestras fueron filtradas por filtros de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  de PVDF.

### **5.3 VALIDACIÓN METODOLOGÍA ANALÍTICA**

Se determinaron los parámetros analíticos (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, 2003) tanto para la técnica como para la metodología, incluyéndose los 4 analitos de interés (fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa).

#### **5.3.1 CURVA DE CALIBRACIÓN.**

Para la curva de calibración en solvente se prepararon dos soluciones intermedias, una de alta concentración (0,02g/mL) y otra de baja concentración (0,01 g/mL), que contenían fructosa,

glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa. La curva de calibración realizada tiene un rango de concentración de los 0,0002 g/mL a los 0,01 g/mL, usando como solvente agua grado HPLC. Para la solución intermedia de baja concentración se pesaron 2,50 g de cada azúcar en balanza analítica, la mezcla de azúcares se solubilizó en agua grado HPLC, y luego se traspasó cuantitativamente en un matraz aforado de 250 mL, enrazando con agua grado HPLC. Para la solución intermedia de alta concentración se pesaron 5,0000g de cada azúcar en balanza analítica, la mezcla de azúcares se solubilizó en agua grado HPLC, y traspasó cuantitativamente en un matraz aforado de 250 mL, se enraza con agua grado HPLC. De igual manera se prepararon curvas de calibración en matriz chocolate, para lo cual se fortificó una muestra de chocolate sin azúcar con los 4 analitos en el rango de concentración 0,05-0,1-0,3-0,4-0,5-1,0 g/100 mL y estas muestras se sometieron al proceso de extracción para obtener los extractos, los cuales fueron analizados por HPLC-índice de refracción con el objetivo de determinar el efecto matriz sobre la cuantificación de los analitos.

### **5.3.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.**

Se evaluó el *límite de detección (LD)* y *el límite de cuantificación (LC) de la técnica* para lo cual se inyectaron en el HPLC- índice de refracción, 10 veces una muestra de concentración 0,00008 g/mL, el cálculo utilizado se realiza basado en límite de detección instrumental el cual se utiliza la concentración mínima de los analitos estudiados que, **sin la presencia de la matriz.**

Para el cálculo de estos parámetros analíticos, se utilizaron las siguientes fórmulas:

**Fórmula 1:**  $LD = 3 \sigma$

**Fórmula 2:**  $LC = 10 \sigma$

Donde,  $\sigma$ : Desviación estándar.

Para determinar **los LD y LC de la metodología de extracción** se analizaron 10 muestras de chocolate sin fortificar que fue sometido a los procesos de extracción, cuyo extracto fue inyectado 2 veces por cada muestra (blancos) en un equipo de HPLC-índice de refracción.

### **5.3.3 PRECISIÓN.**

Para la determinación de la replicabilidad se preparó en matriz de chocolate una solución con concentración cercana al LC calculado del método mencionado en el punto 5.2, se tomaron 10 alícuotas de ésta y se les aplicó el método completo, respetando las siguientes condiciones: mismo analista, mismo instrumento y día. Posteriormente, se determinó la concentración de cada carbohidrato a partir de la curva de calibrado. La replicabilidad se expresó como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV) de las concentraciones.

Para la determinación de la precisión intermedia se preparó una solución con concentración cercana al LC calculado del método, se tomaron 10 alícuotas de ésta y se les aplicó el método completo, cambiando una de las siguientes condiciones: el analista, el instrumento o el día. En este caso en particular, se cambió el día. La precisión intermedia se expresó como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV) de las concentraciones.

### **5.3.4 RECUPERACIÓN.**

Para la determinación del porcentaje de recuperación de la metodología de extracción se fortificaron 4 muestras de chocolate sin azúcar (39% de materia grasa), con la mezcla de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa, en tres concentraciones diferentes: en el LC de la técnica, 5 veces el LC de la técnica y 10 veces el LC de la técnica, estas muestras fueron

sometidas al proceso de extracción, y los extractos fueron cuantificados por medio de HPLC-índice de refracción.

Para evaluar el efecto matriz sobre la cuantificación de los analitos se elaboró una curva de calibración en matriz chocolate, considerando 10 puntos de concentración (cada uno en duplicado), a partir de la cual se determinó el rango lineal, así como la sensibilidad de la metodología.

### **5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE CHOCOLATE.**

Finalmente se analizaron muestras de chocolate sin azúcar, para lo cual se seleccionaron 2 variedades de chocolate con distintos porcentajes de materia grasa. Estas muestras fueron sometidas a la metodología de extracción que presentó las mejores cifras de mérito para determinar el contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

### **5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES POR MEDIO DE HPLC-IR.

Los análisis se realizaron con elusión isocrática, con una fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua desionizada, en una proporción de acetonitrilo: agua 80:20 v/v, con un flujo de 1,5 mL/min (Tabla2).

Tabla 2 Condiciones de trabajo HPLC-IR para análisis de azúcares

Columna	Merck Purospher STAR-NH <sub>2</sub> 250 x 4,6 mm (5 μm)
Fase Móvil	Acetonitrilo/Agua 80:20 v/v
Flujo	1,5 mL/min
Presión	≤1493 psi
Temperatura	37°C
Tiempo	20 min
Detección	Índice de refracción (IR)
Volumen de Inyección	20 μL
Modo	Isocrático

Se realizaron varias pruebas, para identificar los tiempos de retención de los analitos de interés.

**Prueba 1.** Se preparó la muestra pesando 0,2000 g de los carbohidratos (sacarosa, fructosa, maltosa, glucosa, lactosa) en balanza analítica, la mezcla de azúcares se solubilizó en agua grado HPLC, y luego se traspasó a un matraz aforado de 100 mL, se agregó 50mL de acetonitrilo grado HPLC, aforando con agua grado HPLC. Luego se inyectó la muestra en HPLC- índice de refracción donde se obtuvo el Cromatograma de la Fig. 5.

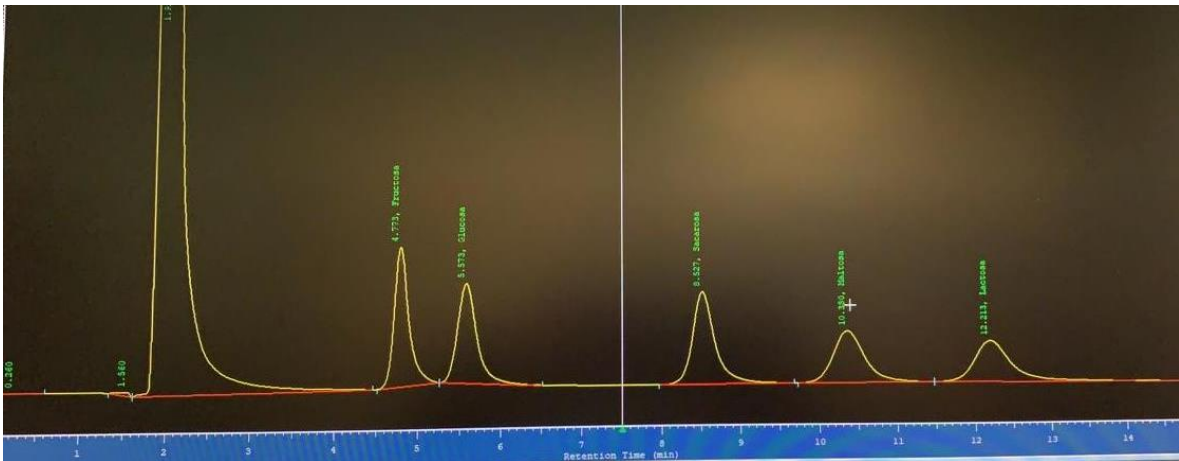


Figura 5 Cromatograma prueba 1 concentración 0,002 g/mL

**Prueba 2.** Se preparó muestras de cada carbohidrato por separado (sacarosa, fructosa, maltosa, glucosa, lactosa) en una concentración de 0,2 g/100mL. Pesando 0,1000g de los analitos en balanza analítica, se solubilizó en agua grado HPLC, y luego se traspasó a un matraz aforado de 50 mL, aforando con agua grado HPLC. Luego se sacó 10 mL de cada solución preparada [0,2 g/100mL] y se llevó a un matraz de 250 mL donde se adicionaron 100 mL de acetonitrilo grado HPLC, completando el volumen hasta el aforo con agua grado

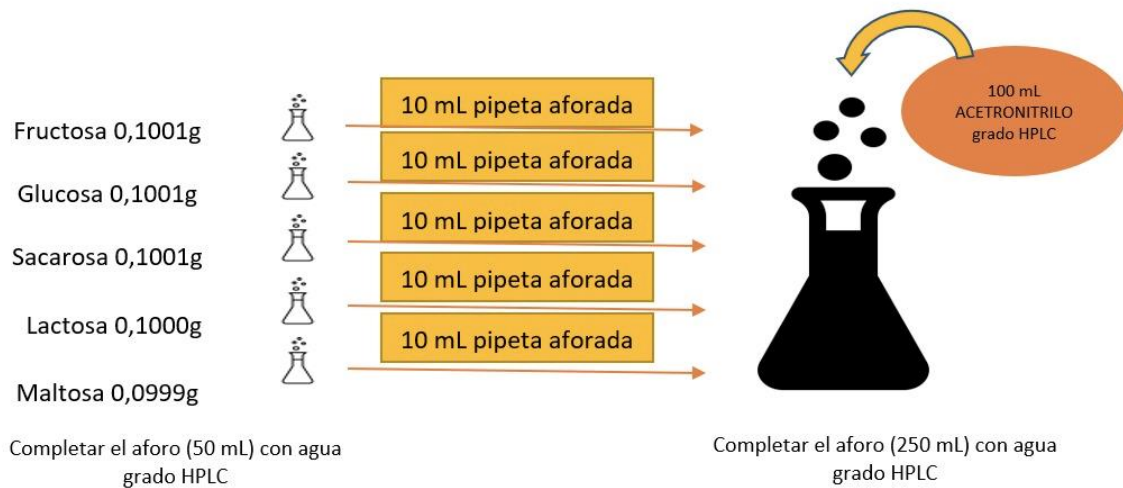
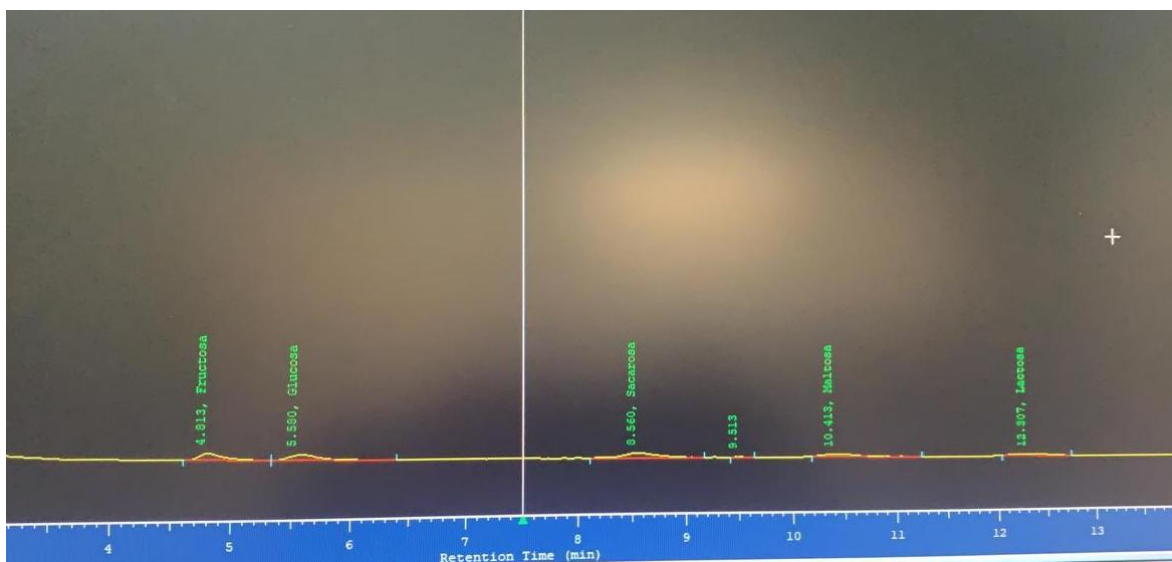


Figura 6 Preparación muestras para prueba 2, concentración  $8 \times 10^{-5}$  g/m



HPLC, considerar factor de disolución 25 (figura 6). Luego se inyectó la muestra en HPLC-índice de refracción donde se obtuvo el Cromatograma de la figura 7.

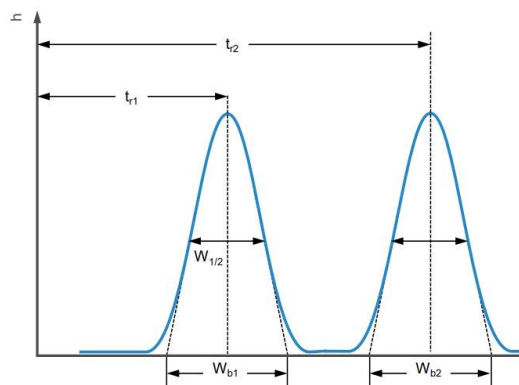


**Figura 7** Cromatograma prueba 2 concentración  $8 \times 10^{-5}$  g/mL

A partir de los resultados obtenidos se realizó el cálculo de la resolución entre las señales cromatográficas obtenidas en las pruebas 1 y 2, la cual indica la capacidad de la columna para separar los picos de interés. Se realizó el cálculo con la ecuación 1 (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992)

$$R_s = 2 \frac{[(Tr_b) - (Tr_a)]}{W_a + W_b} > 1,5 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde,  $Tr_b$  y  $Tr_a$  corresponden a los tiempos de retención de los picos 1 y 2,  $W_a$  y  $W_b$  al ancho de cada pico cromatográfico medido en su base, como se puede apreciar en la figura 8.



**Figura 8** Representación de parámetros para el cálculo de la resolución (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992)

**Tabla 3** Resultados cromatográficos prueba 1

Azúcares	Ancho peak	Tr (min)	Resolución
Fructosa	0,344	4,79	1,53
Glucosa	0,687	5,58	3,70
Sacarosa	0,892	8,50	1,80
Maltosa	1,108	10,3	1,68
Lactosa	1,148	12,2	

**Tabla 4** Resultados cromatográficos prueba 2

Azúcares	Ancho peak	Tr (min)	Resolución
Fructosa	0,287	4,81	2,64
Glucosa	0,297	5,58	9,23
Sacarosa	0,349	8,56	2,31
Maltosa	1,241	10,4	1,68
Lactosa	1,026	12,3	

Tr: tiempo de retención

Se considera que un valor igual o mayor a 1,5 en el parámetro “Resolución”, da cuenta de una separación entre las señales cromatográficas de los analitos adecuada, que permitirá la integración del área bajo al señal cromatográfica de manera más exacta y precisa (López , y

otros, 2017) por lo tanto las condiciones cromatográficas presentadas en la tabla 2, permiten la obtención de resultados con una adecuada resolución para el análisis de los 4 azúcares seleccionados en este estudio. Sin embargo, se presenta una resolución al límite de lo esperado entre la fructosa y la glucosa, esto se debe a que ambos son isómeros entre sí.

## 6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

Los resultados del análisis de las soluciones de la curva de calibración preparada en solvente para fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa se presentan en figura 9. Para este estudio se consideró la lactosa con el objetivo de poder identificar su tiempo de retención y de esta manera determinar que la señal cromatográfica del analito no interfiera en la cuantificación de los otros hidratos de carbono.

Los resultados presentaron una buena correlación en el rango de concentración entre 0,0002-0.01 g/mL (tabla 5), con un coeficiente de determinación para los azúcares superiores a 0,9928 (Eurolab España.P.P. Morillas y colaboradores , 2016). La sensibilidad, expresada como la pendiente de la recta fue similar para los 4 analitos, siendo del orden de  $10^8$  (Skoog, Holler , & Crouch , 2008).

Los estándares de la curva de calibración se analizaron en cuadruplicado, donde la precisión obtenida expresada como la desviación estándar relativa fue menor a 2,6 % para todas las concentraciones de las azúcares analizadas.

**Tabla 5** Curvas de calibración en solvente de los azúcares seleccionados para este estudio

Compuesto	Curva de Calibración	Coefficiente de determinación
Fructosa	$A = 2 \times 10^8 \times C + 41292$	$R^2 = 0,9928$
Glucosa	$A = 2 \times 10^8 C + 31888$	$R^2 = 0,9974$
Sacarosa	$A = 2 \times 10^8 C + 26910$	$R^2 = 0,9986$
Maltosa	$A = 2 \times 10^8 C - 7127,7$	$R^2 = 0,9996$

Lactosa

$$A = 2 \times 10^8 C - 34945$$

$$R^2 = 0,9971$$

A: Área, C: Concentración

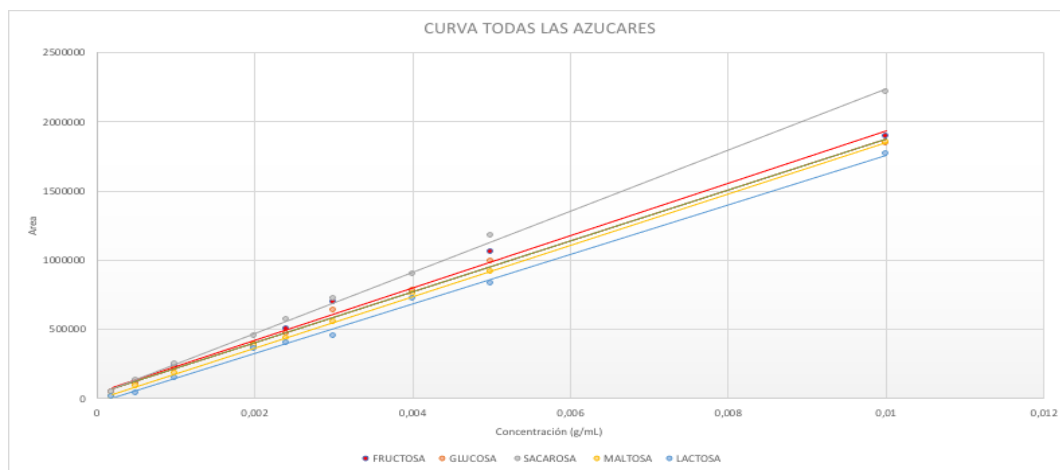


Figura 9 Curva de calibración en solvente de los azúcares en estudio, análisis realizados por HPLC- índice de refracción

### 6.3 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LA TECNICA

Se utilizaron los resultados de la curva de calibración de la tabla 5 para determinar la concentración mínima cuantificable (LC) y la concentración mínima detectable (Harvey , 2002) de la técnica (LD), de acuerdo a lo indicado en 5.3.2. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6 Límites de detección y cuantificación en solventes

Azúcar	LD (g/mL)	LC (g/mL)
Fructosa	0,00001	0,00052
Glucosa	0,00007	0,00061
Sacarosa	0,00018	0,00090
Maltosa	0,00014	0,00038
Lactosa	0,00044	0,00105

## 6.4 METODOLOGIA DE EXTRACCIÓN

En este estudio se evaluaron dos métodos de extracción, de acuerdo con lo descrito en el punto 5.2. Durante la evaluación de la metodología 1, se observó que la muestra no se disolvió y decanto en el matraz, por lo que se decidió aumentar el tiempo de agitación a 30 minutos, a pesar de esta modificación no se solubilizó totalmente el chocolate (Figura 10).



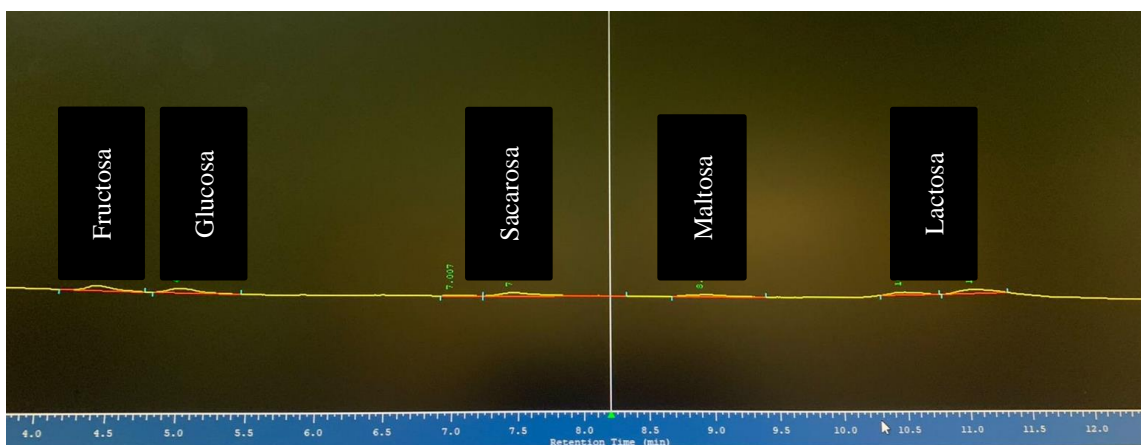
**Figura 10** Muestra obtenida tras la extracción según metodología 1

Se probó la metodología 2, en la cual se utiliza etanol como solvente de extracción, una vez realizada la extracción se observó la disolución incompleta de la muestra, en la cual se puede apreciar el chocolate aglomerado en el fondo del matraz (figura 11).



**Figura 11** Muestra obtenida tras la extracción según metodología 2

Ambas metodologías no lograron la disolución cuantitativa de la muestra, debido a esto se realizó un nuevo proceso de extracción, integrando ambas metodologías (Belscak-Cvitanovic, y otros, 2015) (Koh, Park, Lim, Yea, & Bang, 2018) Para esto se pesó 0,05 g de chocolate en balanza analítica y se adicionó 10 mL de una solución de Agua: Acetonitrilo (30:70 v/v). Esta mezcla se llevó a un baño de ultrasonido a 25°C durante 20 minutos, una vez terminado este tiempo, la solución resultante se traspasó cuantitativamente a un matraz de 100 mL, se aforó con la mezcla antes usada de Agua: Acetonitrilo y se homogenizó. Se traspasó esta solución a un tubo Falcon, se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante fue separado de la solución, el cual fue filtrado. Se tomó una alícuota de 10 mL del filtrado y se adicionó 4 mL de agua. Para el análisis por HPLC-índice de refracción las muestras fueron filtradas por filtros de jeringa (Figura 12)



**Figura 12** Cromatograma por HPLC-IR de extracto de muestra de chocolate sin fortificar

## 6.5 CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ

Para la determinación del efecto matriz sobre la cuantificación de los 4 analitos se prepararon muestras de chocolates con el método descrito en el punto 5.3.1, para lo cual se masaron 0,05 g de chocolate en balanza analítica y se añadieron 3 mL de los estándares de concentración

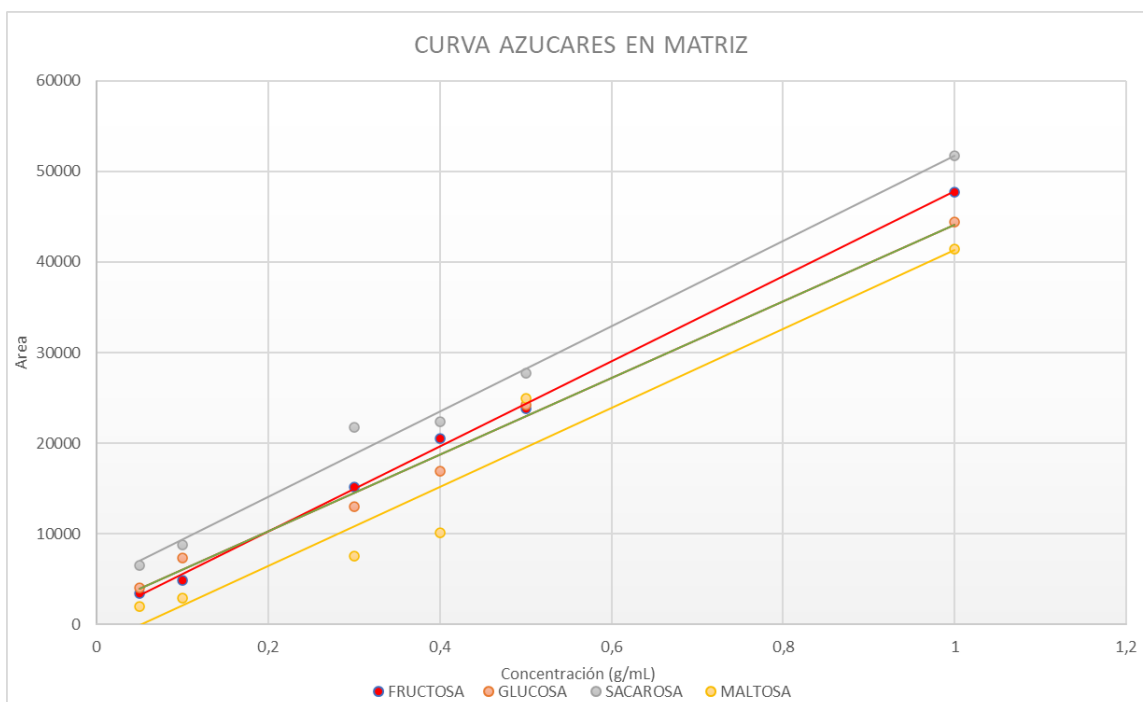
0,05-0,1-0,3-0,4-0,5-1,0 g/100mL, estas muestras fueron sometidas a la metodología de extracción optimizada (según 6.4).

Los resultados del análisis de las soluciones de la curva de calibración en matriz de chocolate fortificada con fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa se presentan en figura 13.

**Tabla 7** Curvas de calibración en matriz de los azúcares seleccionados para este estudio

Compuesto	Curva de Calibración	Coefficiente de determinación
Fructosa	$A = 46986 \times C + 858,2$	$R^2 = 0,9988$
Glucosa	$A = 41683x + 2248,3$	$R^2 = 0,9902$
Sacarosa	$A = 47092x + 4688,2$	$R^2 = 0,9919$
Maltosa	$A = 43577x + 2237,9$	$R^2 = 0,9406$

A: Área, C: Concentración



**Figura 13** Curva de calibración en matriz de los azúcares en estudio, análisis realizado por HPLC-IR

Los resultados del análisis de las soluciones de la curva de calibración preparada en matriz para fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa se presentan en figura 14. Los resultados presentaron una buena correlación, con un  $R^2$  para fructosa, glucosa y sacarosa superiores a 0,95 (tabla 7), sin embargo, para la maltosa su coeficiente de correlación fue menor a 0,95 por lo que se aprecia que el efecto matriz afecta a la maltosa de una forma mayor que para las otras azúcares. Las muestras fortificadas de la curva de calibración se analizaron en triplicado. (Brunetto de Gallignani, 2014). Al comparar las pendientes de las curvas de calibración tanto en solvente (punto 6.2) como en matriz, podemos apreciar que la sensibilidad es del orden  $10^9$  veces mayor en solvente, indicando la presencia de un efecto matriz. Por lo tanto, para la cuantificación posterior se decidió utilizar la curva en matriz.

## **6.6 CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ PARA MEDIR LACTOSA**

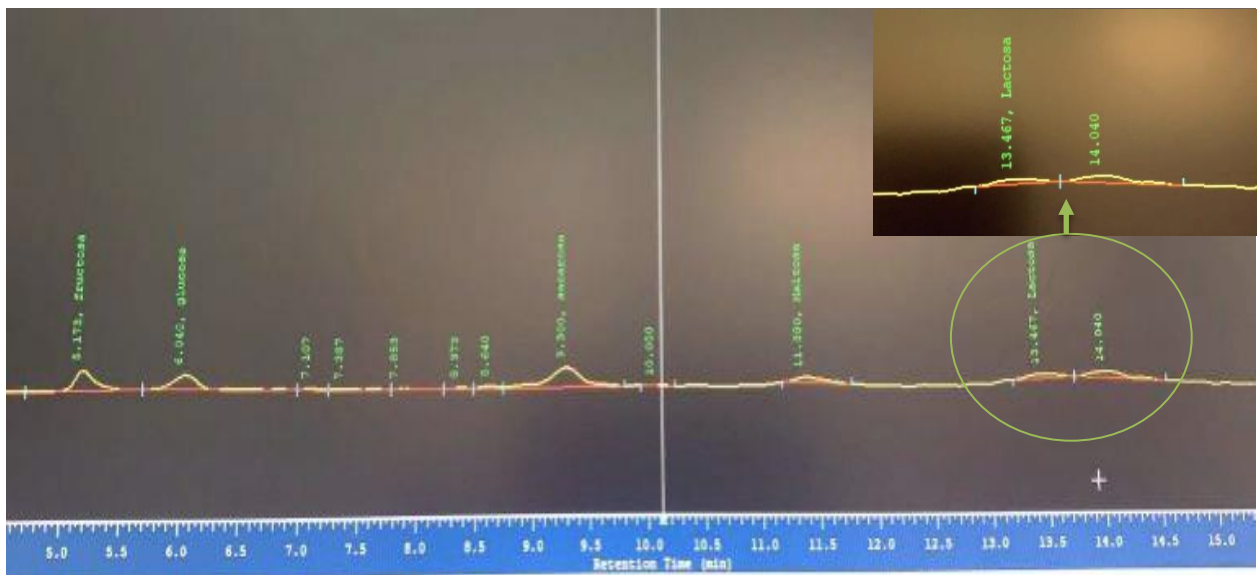
Como se mencionó anteriormente se incluyó la lactosa en el estudio como posible interferente, ya que la gran mayoría de los chocolates incluyen este analito en sus ingredientes.

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el punto 6.5 para realizar la curva de calibración de lactosa, en donde se aprecian dos peak para las concentraciones de fortificación menor 0,05-0,5 g/100 mL (Figura 14) y en la concentración de 1,0 g/mL se aprecia un peak (Figura 15). Esto se puede deber a que las muestras utilizadas eran a base de leche, por lo que en bajas concentraciones se pueden apreciar ambos isómeros de la lactosa,  $\beta$ -lactosa y  $\alpha$ -lactosa monohidratada, la última nombrada es la utilizada para la fortificación

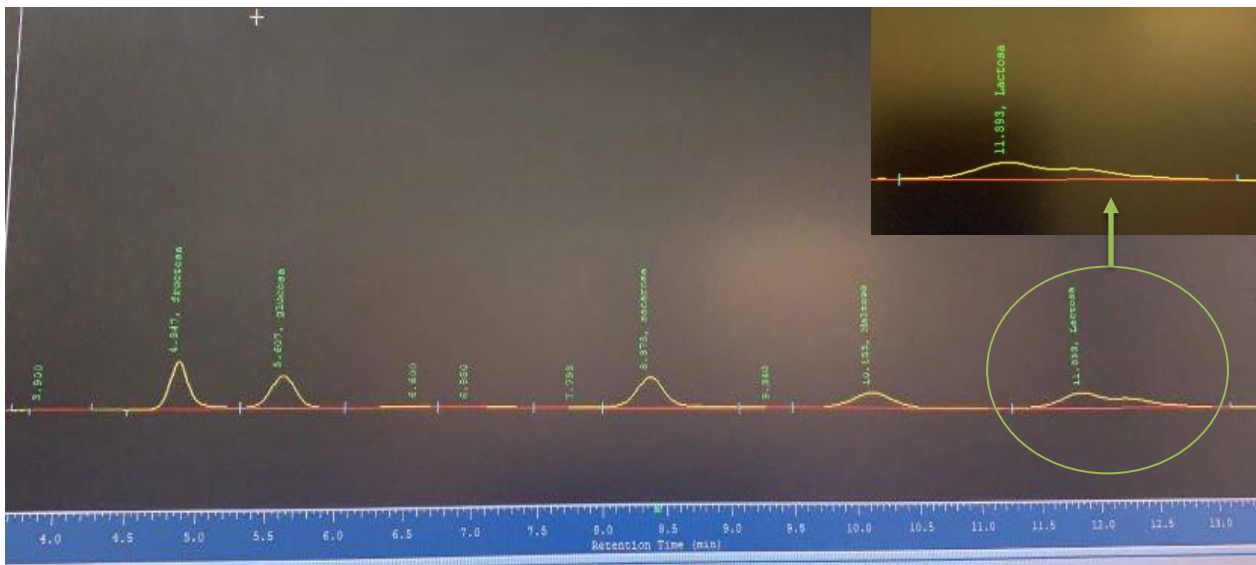


de las muestras. Cabe mencionar que la lactosa es un disacárido, producto de la unión de glucosa y galactosa por medio de un enlace 1-4 glucosídico.

Es un polvo cristalino blanco, libre de moléculas de agua; consiste principalmente en beta-lactosa o una mezcla de alfa y beta-lactosa (López , y otros, 2017)



**Figura 14** Cromatograma muestra de chocolate fortificado según punto 6.5 con 0,03 g/100 mL de los hidratos de carbono estudiados.



**Figura 15** Cromatograma muestra de chocolate fortificado según punto 6.5 con 0,1 g/100 mL glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

Los resultados del análisis de las soluciones de la curva de calibración en matriz de chocolate fortificada para lactosa según punto 6.5, sólo presentó una correlación lineal entre los puntos 0,3-0,5 g/100 mL (Tabla 8).

**Tabla 8** Curvas de calibración en matriz para lactosa

Azúcar	Curva de Calibración	Coefficiente de correlación lineal
Lactosa todos los puntos	$A = 4E+06C + 12296$	$R^2 = 0,4446$
Lactosa 0,3-0,5 g/100mL	$A = -1E+06C + 21435$	$R^2 = 0,9662$

A: Área, C: Concentración

Estudios realizados en alimentos, que poseen una matriz láctea, por ejemplo, leche, señalan que la lactosa puede existir en formas cristalinas y no cristalinas, dentro de las cristalinas están las  $\alpha$ -lactosa monohidratada,  $\beta$ -lactosa y formas anhidras de  $\alpha$ - y  $\beta$ -lactosa en proporciones molares de 5:3 y 4:1 (López , y otros, 2017), estas diferentes formas afectan la

cuantificación de la lactosa en los productos que la contiene. Además, cabe destacar que la lactosa es unas 10 veces menos soluble que la sacarosa, y que la capacidad de disolución de la  $\alpha$ -lactosa monohidratada aumenta con el tiempo debido a que a través del fenómeno de mutorrotación pasa a  $\beta$ -lactosa, que es 7 veces más soluble (Luquet, 1991). La solubilidad de la lactosa aumenta con la temperatura, por lo tanto cristaliza al enfriar sus soluciones concentradas, sumado a que el etanol reduce la solubilidad de la lactosa, precipitando primero la forma  $\alpha$  (Alais, 1985), esta puede ser la razón por la cual en los cromatogramas se pueden observar dos peak a bajas concentraciones ya que un isómero se encuentra en mayor cantidad. La lactosa tiene un bajo dulzor (aproximadamente el 15% menos que la sacarosa), es menos soluble que los monosacáridos y menos soluble que la mayoría de los azúcares (Illanes, y otros, 2016). El débil sabor dulce de la lactosa se considera como una cualidad desde el punto de vista dietético (Alais, 1985) Si bien el tiempo de retención de la lactosa no interfiere en la determinación de los parámetros analíticos de la metodología, se puede apreciar que no hay una respuesta lineal en relación a la concentración presente en la matriz de chocolate, es por esta razón que la metodología propuesta no es adecuada para la determinación y cuantificación de dicho analito.

## 6.7 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LA METODOLOGIA

Los resultados de la determinación del límite de cuantificación y detección de la metodología en matriz se presentan en la tabla 9, para el cálculo se utilizaron las siguientes formulas:

**Fórmula 3:**  $LD = Y + 3 \sigma$

**Fórmula 4:**  $LC = Y + 10 \sigma$

$\sigma$ : Desviación estándar,  $Y_b$ : área bajo el peak cromatográfico.

**Tabla 9** Límites de detección y cuantificación en matriz

<b>Azúcares</b>	<b>LD (g/mL)</b>	<b>LC (g/mL)</b>
Fructosa	0,00048.	0,00208.
Glucosa	0,00046	0,00191
Sacarosa	0,00061	0,00235
Maltosa	0,00022	0,00064

Se determinaron los límites de detección y cuantificación para el método, donde se apreció LD- LC son mayores a los obtenidos para la técnica (tabla 6). Para el caso de la lactosa no se determinó su LD-LC en matriz. Se ha reportado que para la lactosa el LD fue 0,00013 g/mL (Petkova, Brabant, Masson , & Denev, 2013) en una matriz similar, cabe mencionar que no existen datos reportados para lactosa en muestras de chocolate, ya que en general los estudios determinan lactosa en muestras de cacao u otros alimentos.

## **6.8 EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD**

Se evaluó la precisión mediante la repetibilidad y reproducibilidad del método en matriz, utilizando el coeficiente de variación de seis repeticiones. El criterio de aceptación es de valores de CV<16%, para matriz compleja (Rivera Orozco & Rodríguez Báez, 2010).

$$CV = \frac{\sigma_x}{\bar{x}} * 100$$

Donde,  $\bar{x}$  es el promedio de los datos y  $\sigma_x$  es la desviación estándar de las replicas.

La reproducibilidad, es el grado de concordancia entre ensayos obtenidos bajo condiciones estipuladas ISO 3534-1:19932 (Suarez, Arévalo, Linares, Ustáriz, & Hernández , 2009 ). Esta se verificó en igual condiciones, mismo día, mismo equipo, mismo analista (Tabla 10).

La evaluación de la repetibilidad se realizó en matriz utilizando las mismas condiciones, donde se analizaron muestras en duplicado en diferentes concentraciones, para la reproducibilidad se realizó la medición en distintos días, para lo cual se prepararon soluciones de 0,3 g/100 ml y 0,4 g/10 ml cuatro veces en el mismo día (n=4) y en dos días diferentes (n=8), determinando el coeficiente de variación (CV%), los resultados se presentan en la tabla 11.

Los valores obtenidos tanto para la reproducibilidad como para la repetibilidad se encuentran dentro del límite de aceptación en matriz compleja indicados por Horwitz.

**Tabla 10** Evaluación de la repetibilidad

Concentración 0,3 (g/100 ml)	<b>Analito</b>	<b>Repetibilidad (CV%)</b>
	fructosa	7,84
	glucosa	8,84
	sacarosa	15,4
	maltosa	6,62
	lactosa	11,0
Concentración 0,4 (g/100 ml)	<b>Analito</b>	<b>Repetibilidad (CV%)</b>
	fructosa	3,57
	glucosa	7,60
	sacarosa	7,96
	maltosa	13,7
	lactosa	4,72

**Tabla 11** Evaluación de la reproducibilidad

Concentración 0,3 (g/100 ml)	Reproducibilidad	
	Analito	(CV%)
	fructosa	6,88
	glucosa	10,8
	sacarosa	15,3
	maltosa	5,29
lactosa	9,29	
Concentración 0,4 (g/100 ml)	Reproducibilidad	
	Analito	(CV%)
	fructosa	4,05
	glucosa	15,6
	sacarosa	7,96
	maltosa	13,7
lactosa	15,2	

## 6.9 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA METODOLOGIA

Con el fin de evaluar la exactitud se determinó el porcentaje de recuperación. Se emplearon muestras de chocolate fortificado con concentraciones 0,5 g/mL de cada analito, incluyendo un blanco el cual corresponde a muestras de chocolate sin fortificar, esto se realizó en triplicado. Las muestras fueron sometidas al mismo proceso de extracción descrito en la optimización de la metodología del punto 6.4, para luego realizar el análisis de las muestras por HPLC- IR, donde se calcularon las concentraciones a partir del área bajo la curva entregada por el equipo. Finalmente, se aplicó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de recuperación (Suarez, Arévalo, Linares, Ustáriz, & Hernández , 2009 ):

$$\%R = \frac{C_F - C}{C_a} * 100$$

$C_f$ : Concentración de la muestra fortificada

$C$ : Concentración de la muestra no fortificada

$C_a$ : Concentración de la muestra agregada

Los resultados se presentan en la tabla 12, donde se calcularon las concentraciones a partir de la curva de calibración realizada en matriz, se informa el porcentaje de recuperación individual de las muestras.

**Tabla 12** Porcentaje de recuperación de la metodología

<b>Azúcares</b>	<b>% Recuperación</b>
Fructosa	102,0
Glucosa	102,1
Sacarosa	99,3
Maltosa	100,0

Se puede apreciar que, para sacarosa, glucosa, fructuosa y maltosa, la recuperación fue superior a 99 %, de esta manera el análisis tiene una adecuada exactitud para la determinación de estos analitos. Debido a los problemas presentados para la cuantificación de lactosa no se consideró para evaluar su recuperación.

## 6.9 ANALISIS MUESTRAS DE CHOCOLATE

Se realizó el análisis de diferentes muestras de chocolates sin azúcar, ya que como una necesidad de la empresa se debe verificar en el caso de estos chocolates que las concentraciones presentes de fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa estén dentro de los parámetros establecidos para la aplicación del sello libre de azúcar, sumado a que las muestras elegidas contienen distinto porcentaje de materia grasa. (Tabla 13).

**Tabla 13** Características de las muestras de chocolate sin azúcar

Muestras	Características
1	Chocolate de leche con 40% de grasa
2	Chocolate gluten free 34% de grasa
3	Chocolate con 85% cacao y 44% de grasa

Para las muestras se realizó el procedimiento descrito en el punto 6.4, masando 0,05 g de chocolate, donde los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas 14 15 y 16 para las 3 muestras.

**Tabla 14** Resultados del análisis de muestra 1

Azúcares	Concentración en 0,05 g
Fructosa	0
Glucosa	n.d.
Sacarosa	n.d.
Maltosa	n.d.
Lactosa	0,00154

**Tabla 15** Resultados del análisis de muestra 2

Azúcares	Concentración muestra 0,05 g
Fructosa	n.d.
Glucosa	n.d.
Sacarosa	n.d.
Maltosa	0,00244
Lactosa	n.d.



**Tabla 16** Resultados del análisis de muestra 3

Azúcares	Concentración en 0,05 g
Fructosa	n.d.
Glucosa	n.d.
Sacarosa	0,0133
Maltosa	n.d.
Lactosa	n.d.

Se puede observar que la concentración para fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa, se encuentran bajo el LC, sin embargo, para la lactosa en la muestra 1 se obtiene un resultado bajo, siendo lo esperado, ya que es una muestra a base de leche. Para la muestra 2 solo es posible identificar la maltosa en los resultados obtenidos, sin embargo, los peak entre maltosa y lactosa se encuentran superpuestos (Figura 16), ya que la maltosa y la lactosa están compuestas por una molécula de glucosa o una de galactosa a través de un enlace glucosídico  $\alpha$ -(1-4) para conectar otra glucosa, respectivamente, tienen estructuras muy similares, (Weizheng, Yaqui, Feng, & Fuping, 2021)

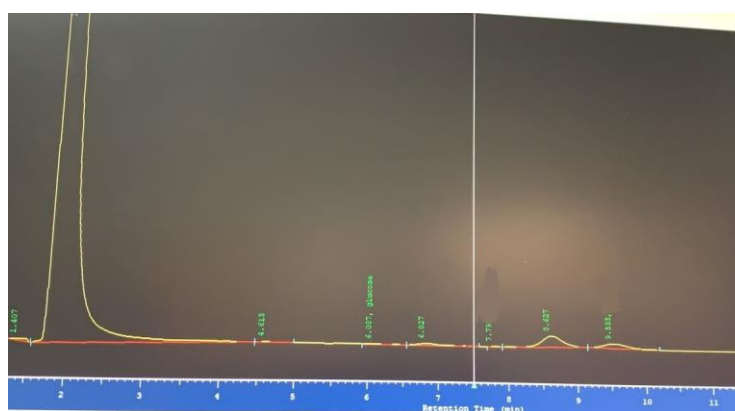
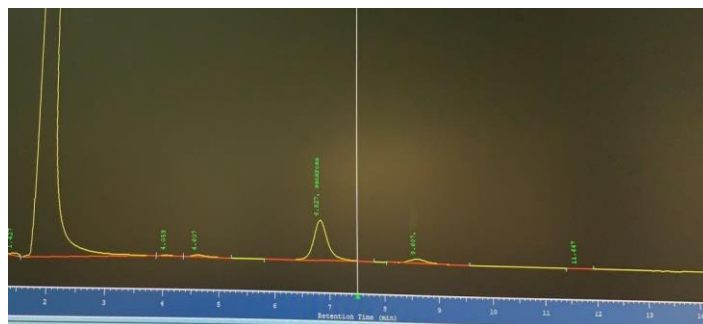


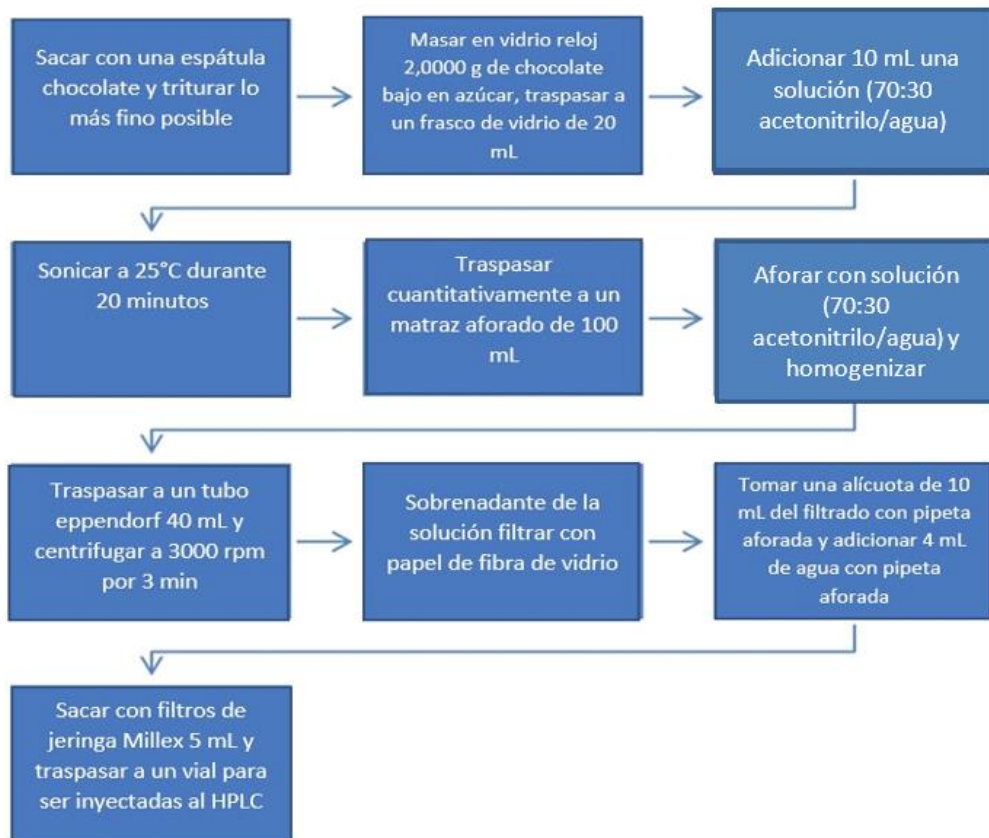
Figura 16 Cromatograma de la muestra 2 de chocolate, libre de gluten con 34% de grasa

Los resultados del análisis de la muestra 3 de chocolate con 85% cacao sin leche muestran una concentración de concentración de 26,6 g de sacarosa en 100 gramos de muestra de chocolate (Tabla 16, figura 17).



**Figura 17** Cromatograma de la muestra 3 de chocolate con un 85% cacao

Los resultados obtenidos corresponden a lo esperado para muestras sin el sello “ALTO EN AZUCAR”, por lo que dentro de la legislación chilena el contenido de carbohidratos debería ser menor a 10 g cada 100g (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2009-2010). Si bien la metodología permite cuantificar los azúcares en estudio, es necesario mejorar el procedimiento realizado, ya que la masa de muestra usada da origen a señales cromatográficas cercanas al LD, lo cual puede llevar a errores en la cuantificación de dichos azúcares, es por ello que en la figura 18 se presenta un procedimiento optimizado, considerando aumentar la cantidad de azúcar que se tendría que masar para realizar el análisis a chocolates sin azúcar.



**Figura 18** Propuesta de procedimiento optimizado para el análisis de chocolate

## ***7. CONCLUSIONES***

Se logró determinar de forma simultánea los carbohidratos, fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa por medio de HPLC acoplada a un detector índice de refracción, utilizando columna NH<sub>2</sub>, con una composición de fase móvil 80% acetonitrilo / 20% agua grado HPLC a un flujo de 1,5 mL/min.

Las señales cromatográficas obtenidas en las condiciones optimizadas dieron tiempo de retención de 4,79-5,58-8,50 y 10,3 min para Fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa respectivamente, con una buena resolución (Rs mayor a 1,5)

Se pudo determinar que el método de extracción usando agua: acetonitrilo (50:50 v/v) con ultrasonido fue adecuado para realizar la extracción de los azúcares en estudio, presentes en 0,05 g de chocolate.

El límite de detección de la metodología para glucosa, sacarosa y maltosa fue inferior a 0,00061 g/mL, con una repetibilidad y reproducibilidad menores a 16% presentando valores aceptables para una matriz compleja según Horwitz. La recuperación fue mayor a 99 % para glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa,

A partir del análisis de muestras de chocolate sin azúcar con distinto porcentaje de materia grasa, se pudo determinar que un parámetro a considerar en esta matriz es la cantidad de muestra que se utilizará, ya que, con la metodología de extracción desarrollada en esta tesis,

los resultados obtenidos para los chocolates “sin azúcar” están cercanos a los límites de detección de la metodología.

## *Bibliografía*

- Alais, C. (1985). *Ciencia de la Leche, principios de la técnica lechera*. Barcelona : Reverté S.A.
- Anderson, G., Foreyt, J., Sigman-Grant, M., & Allison, D. (2012). The use of low-calorie sweeteners by adults: impact on weight management. *The journal of nutrition*, 142(6). doi:10.3945/jn.111.149617
- Asociación de Químicos Analíticos Oficiales. (2003). AOAC PEER-VERIFIED METHOD PROGRAM, Manual on policies and procedures. Ed. Association of Official Analytical Chemists.
- Beckett, S. (2000). *The Science of Chocolate*. RSC Paperbacks.
- Belscak-Cvitanovic, A., Komes, D., Dujmovic, M., Karlovic, S., Biskic, M., Brncic, M., & Jezek, D. (2015). Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolate formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.064
- Brunetto de Gallignani, M. d. (2014). *Desarrollo de un método analítico para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacao criollos venezolanos* (Vol. 26).
- Chen, J. (1999). *Manual del azúcar de caña para fabricantes de azúcar de caña y químicos especializados*. Mexico: Limusa.
- De Whalley, H. (1964). *ICUMSA Methods of sugar Analysis: Official and tentative Methods recommended by the international Commission for uniform Methods of sugar analysis (ICUMSA)*. Elsevier Science.
- EuroLab España.P.P. Morillas y colaboradores. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Eurachem.
- Foreyt, J., Sigman-Grant, m., B Allison, D., & Anderson, G. (2012). The use of low-calorie sweeteners by adults: impact on weight management. *National Library of Medicine*. doi:10.3945/jn.111.149617
- García-Almeida, J., Gracia-Casado, M., & García Alemán, J. (julio de 2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutri. Hosp.*, vol28.
- Harvey, D. (2002). *Química analítica moderna*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Illanes, A., Guerrero, C., Vera, C., Wilson, L., Conejeros, R., & Scott, F. (2016). *Lactose-derived prebiotics: A process perspective*. Elsevier Inc.
- Koh, D.-W., Park, J.-W., Lim, J.-H., Yea, M.-J., & Bang, D.-Y. (2018). A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.142
- López, P., López Martínez, L., Martínez Juárez, L., Leyva Porras, C., Silva Cázares, & MB y Saavedra, L. (2017). *Caracterización físico química y térmica de dos polimorfos de la lactosa y la comparación de sus propiedades para uso como excipientes*. Universidad autónoma de Guadalajara.
- Luquet, F. (1991). *Leche y productos Lácteos* (Vol. Vol1). Zaragoza: acribia.
- Michavila Fossati, D., & Pardavila, M. (2020). *El mercado del chocolate y cacao en Chile*. ICEX.

- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (1997). *Reglamento Sanitario de Los Alimentos DTO N°977/96*. Ministerio de Salud , División Jurídica.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2009-2010). *Encuesta Nacional de Salud ENC Chile* (Vol. Tomo I). Santiago.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2022). *Manual de etiquetado nutricional de alimentos* ( 3° edición ed.).
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a ed ed.). Barcelona: Omega.
- Pérez Zuñiga, J. (2009). Evaluación y caracterización de selecciones clonales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del Programa de Mejoramiento del CATIE. *Catie, solutions for environment and development*.
- Petkova, T., Brabant, A., Masson , A., & Denev, P. (October de 2013). HPLC Analysis of mono and disacccharides in food products. *Food science engineering and thecnology , Vol LX 18-19*.
- Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. (A. G. Farro, Ed.) Argentina.
- Rivera Orozco, C., & Rodríguez Báez, M. ( 2010). Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006. *Centro nacional de metrologia*.
- Skoog, D., Holler , F., & Crouch , S. (2008). *Principios de análisis instrumental* (Sexta Edición ed.). Cengage Learning.
- Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F., & Hernández , G. (2009 ). Validación de un método analítico para la determinación de magenesio eritrocitario . *Avances en Química* .
- Weizheng, W., Yaqui, W., Feng, C., & Fuping, Z. (2021). Comparison of determination of sugar-PMP derivates by two different stationary phases and two HPLC detectors: C18 vs. amide columns and DAD vs ELSD. *Journal of Food Composition and Analysis*. doi:10.1016/j.fca.2020.1'3715
- Yusá Marco, D., & de Marina Bayo , A. (2016). *HPLC instrumental* (Primera Edición ed.). Universitat Politècnica de València.

## *Anexos*

### **Anexo 1. Curvas promedio en solvente para: fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa.**

**TABLA A1 1** Masa de azúcar para muestras de baja concentración 1,0 g/mL

<b>Azúcar</b>	<b>gramos</b>
<b>Fructosa</b>	2,5007
<b>Glucosa</b>	2,5010
<b>Sacarosa</b>	2,5010
<b>Maltosa</b>	2,5017
<b>Lactosa</b>	2,4999

**TABLA A1 2** Masa de azúcar para muestras de alta concentración 2,0 g/mL

<b>Azúcar</b>	<b>gramos</b>
<b>Fructosa</b>	4,9999
<b>Glucosa</b>	5,0002
<b>Sacarosa</b>	5,0000
<b>Maltosa</b>	5,0000
<b>Lactosa</b>	5,0001

**TABLA A1 3** Área promedio en solvente para fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

<b>FRUCTOSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>Desviación</b>	<b>Cv</b>
<b>0,0002</b>	45616	707	1,55
<b>0,0005</b>	114647	1112	0,97
<b>0,001</b>	231817	1103	0,48
<b>0,002</b>	377958	2975	0,79
<b>0,0024</b>	505152	461	0,10
<b>0,003</b>	694777	504	0,10
<b>0,004</b>	765344	7129	0,93
<b>0,005</b>	1059702	2525	0,24
<b>0,01</b>	1890520	7312	0,39



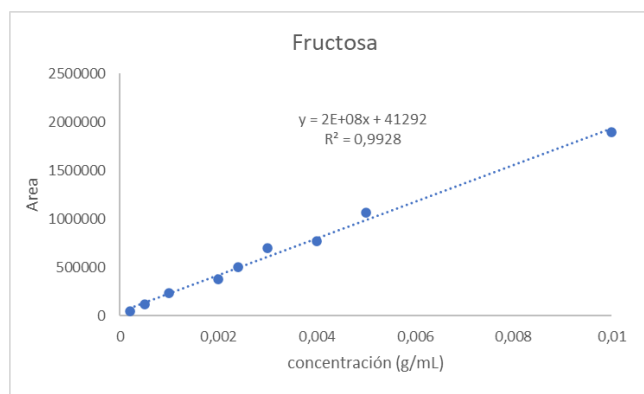
<b>GLUCOSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>Desviación</b>	<b>Cv</b>
0,0002	43339	2911	6,72
0,0005	103093	2930	2,84
0,001	210468	3287	1,56
0,002	388446	3791	0,98
0,0024	470288	4494	0,96
0,003	637891	3224	0,51
0,004	782693	6886	0,88
0,005	987890	2121	0,21
0,01	1841775	48271	2,62

<b>SACAROSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>Desviación</b>	<b>Cv</b>
0,0002	47366	1719	3,63
0,0005	126304	3789	2,99
0,001	244639	2587	1,06
0,002	454440	1549	0,34
0,0024	569068	5429	0,95
0,003	724222	4224	0,58
0,004	900783	7265	0,81
0,005	1178205	2532	0,21
0,01	2211214	44514	2,01

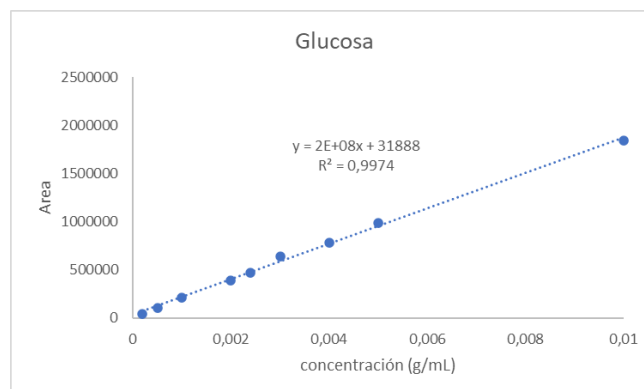
<b>MALTOSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>Desviación</b>	<b>Cv</b>
0,0002	12289	175	1,42
0,0005	86105	2882	3,35
0,001	179597	5432	3,02
0,002	381849	1336	0,35
0,0024	435695	2209	0,51
0,003	548627	4079	0,74
0,004	753950	3875	0,51
0,005	915594	2013	0,22
0,01	1847208	52842	2,86

LACTOSA			
Concentración (g/mL)	Promedio área	Desviación	Cv
0,0002	9840	575	5,84
0,0005	40407	1106	2,74
0,001	149543	3628	2,45
0,002	360607	9627	2,67
0,0024	397239	1409	0,35
0,003	452789	16591	3,66
0,004	720432	11852	1,65
0,005	828532	5683	0,69
0,01	1769334	30594	1,73

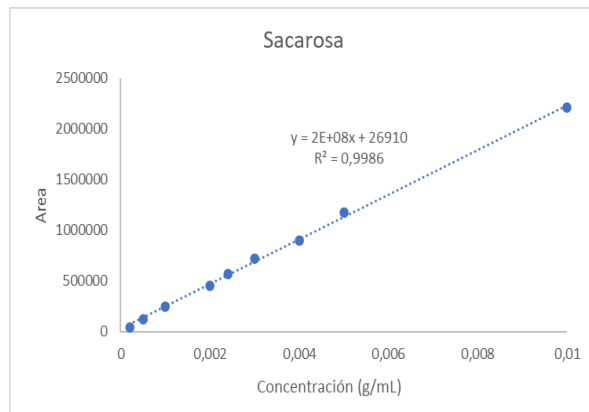
**Anexo 2. Curvas de calibración en solvente para: fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa.**



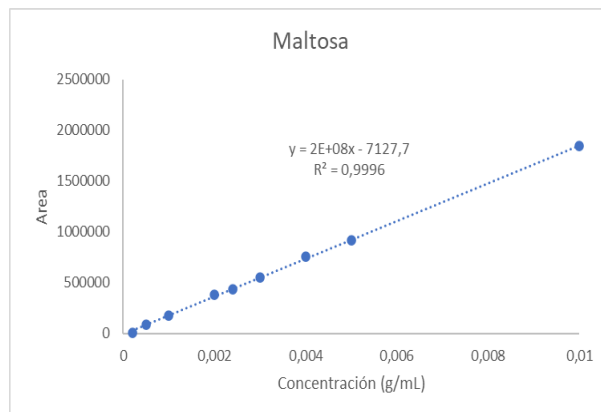
**Figura 2 1** Curva de calibración solvente Fructosa



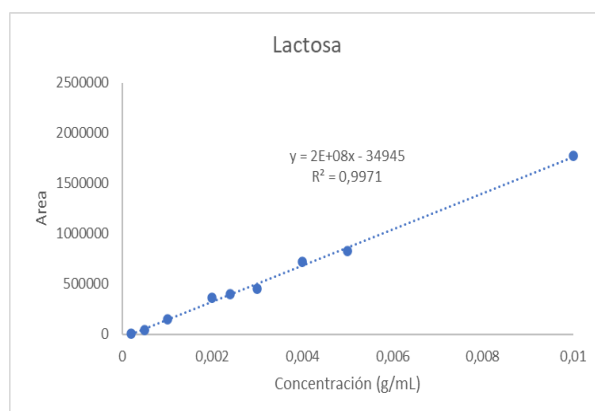
**Figura 2 2** Curva de calibración solvente Glucosa



**Figura 2 3** Curva de calibración solvente Sacarosa



**Figura 2 4** Curva de calibración solvente Maltosa



**Figura 2 5** Curva de calibración solvente Lactosa

**Anexo 3. Tablas de Curvas promedio en matriz para: fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa.**

**TABLA 3 1** Curvas promedio en matriz para fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa

<b>FRUCTOSA</b>			
<b>concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>desviación</b>	<b>Cv</b>
<b>0,0005</b>	3396	366	10,77
<b>0,001</b>	4862	330	7,18
<b>0,003</b>	15204	249	1,75
<b>0,004</b>	20504	167	0,84
<b>0,005</b>	23868	651	2,73
<b>0,01</b>	47725	532	1,09

<b>GLUCOSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>desviación</b>	<b>Cv</b>
<b>0,0005</b>	5069	932	22,86
<b>0,001</b>	7364	84	1,14
<b>0,003</b>	12475	1116	8,56
<b>0,004</b>	17765	374	2,21
<b>0,005</b>	24562	173	0,71
<b>0,01</b>	44209	143	0,32

<b>SACAROSA</b>			
<b>concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>desviación</b>	<b>Cv</b>
<b>0,0005</b>	6514	514	7,89
<b>0,001</b>	8769	2458	21,77
<b>0,003</b>	21717	190	0,84
<b>0,004</b>	22380	257	1,10
<b>0,005</b>	27685	1855	5,17
<b>0,01</b>	51732	258	0,49

<b>MALTOSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>desviación</b>	<b>Cv</b>
<b>0,0005</b>	1992	285	13,61
<b>0,001</b>	2889	2768	55,92

<b>0,003</b>	7554	282	4,87
<b>0,004</b>	10095	1084	10,20
<b>0,005</b>	24981	3239	12,08
<b>0,01</b>	41468	252	0,64

**TABLA 3 2** Tabla de gramos utilizados por estándar y muestra de chocolate para la curva en matriz

<b>STD 0,05</b>		<b>STD 0,1</b>		<b>STD 0,3</b>	
<b>Azúcar</b>	Gramos	<b>Azúcar</b>	Gramos	<b>Azúcar</b>	Gramos
<b>Fructosa</b>	0,0522	<b>Fructosa</b>	0,1010	<b>Fructosa</b>	0,3013
<b>Glucosa</b>	0,0507	<b>Glucosa</b>	0,1017	<b>Glucosa</b>	0,3008
<b>Sacarosa</b>	0,0513	<b>Sacarosa</b>	0,1020	<b>Sacarosa</b>	0,3007
<b>Maltosa</b>	0,0507	<b>Maltosa</b>	0,1005	<b>Maltosa</b>	0,3022
<b>Lactosa</b>	0,0515	<b>Lactosa</b>	0,1009	<b>Lactosa</b>	0,3028
<b>Muestra chocolate</b>		<b>Muestra chocolate</b>		<b>Muestra chocolate</b>	
<b>muestra</b>	gramos	<b>muestra</b>	gramos	<b>muestra</b>	gramos
<b>M1</b>	0,0530	<b>M1</b>	0,0505	<b>M1</b>	0,0510
<b>M2</b>	0,0507	<b>M2</b>	0,0529	<b>M2</b>	0,0510

<b>STD 0,4</b>		<b>STD 0,5</b>		<b>STD 1,0</b>	
<b>Azúcar</b>	Gramos	<b>Azúcar</b>	Gramos	<b>Azúcar</b>	Gramos
<b>Fructosa</b>	0,4001	<b>Fructosa</b>	0,5004	<b>Fructosa</b>	1,0006
<b>Glucosa</b>	0,4008	<b>Glucosa</b>	0,5017	<b>Glucosa</b>	0,9999
<b>Sacarosa</b>	0,4011	<b>Sacarosa</b>	0,5013	<b>Sacarosa</b>	1,0016
<b>Maltosa</b>	0,4008	<b>Maltosa</b>	0,5008	<b>Maltosa</b>	1,0013
<b>Lactosa</b>	0,4017	<b>Lactosa</b>	0,5005	<b>Lactosa</b>	1,0019
<b>Muestra chocolate</b>		<b>Muestra chocolate</b>		<b>Muestra chocolate</b>	
<b>muestra</b>	gramos	<b>muestra</b>	gramos	<b>muestra</b>	gramos
<b>M1</b>	0,0523	<b>M1</b>	0,0520	<b>M1</b>	0,0502
<b>M2</b>	0,0513	<b>M2</b>	0,0523	<b>M2</b>	0,0538

#### Anexo 4. Curvas de calibración en matriz para: fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa.

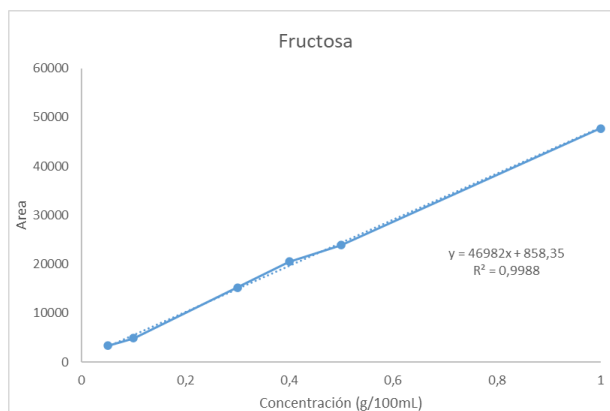


Figura 4 1 Curva de calibración en matriz Fructosa

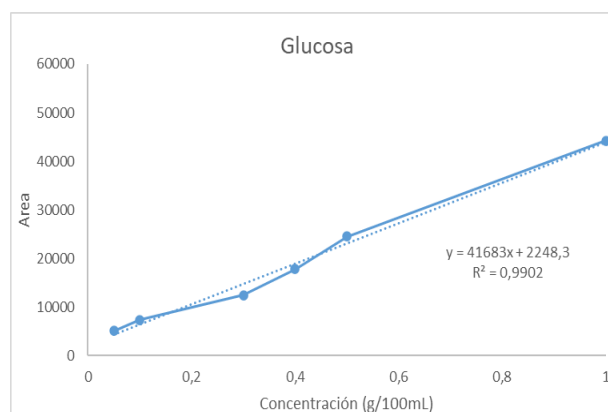


Figura 4 2 Curva de calibración en matriz Glucosa

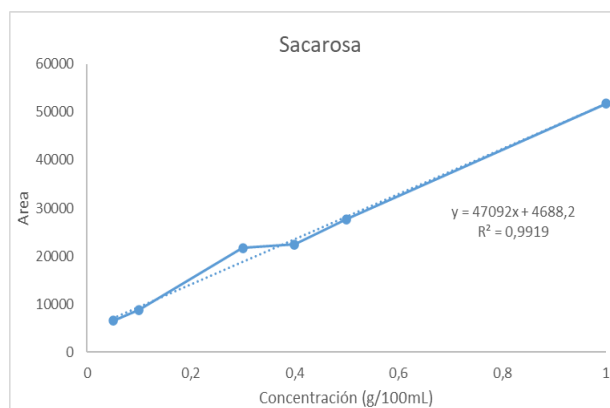
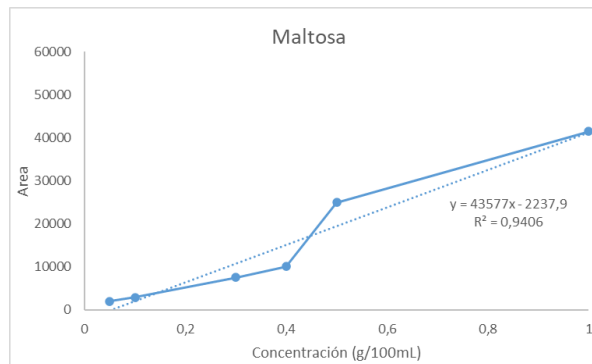


Figura 4 3 Curva de calibración en matriz Sacarosa



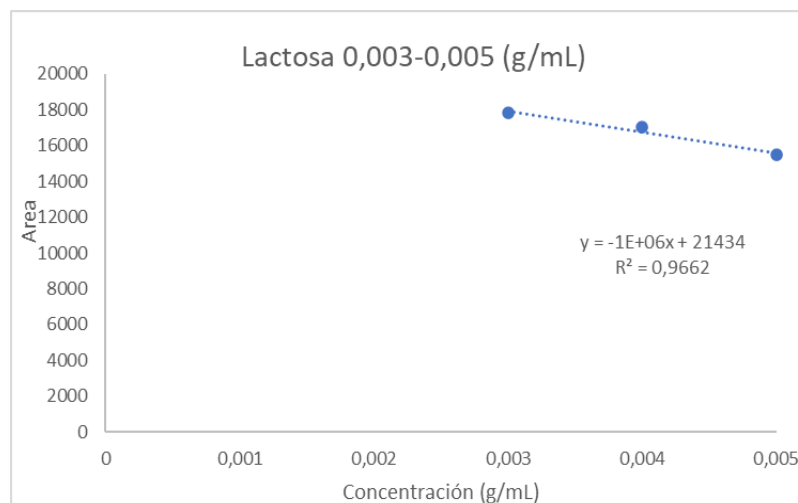
**Figura 4 4** Curva de calibración en matriz Maltosa

**Anexo 5. Curva promedio en matriz para lactosa.**

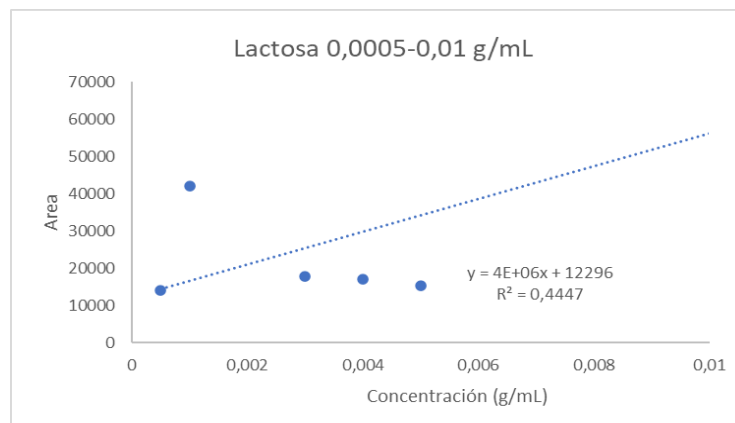
**TABLA 5 1** Curva promedio en matriz para Lactosa

<b>LACTOSA</b>			
<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Promedio área</b>	<b>desviación</b>	<b>Cv</b>
<b>0,0005</b>	14131	505	3,57
<b>0,001</b>	42135	8495	20,16
<b>0,003</b>	17807	154	0,87
<b>0,004</b>	17018	865	5,09
<b>0,005</b>	15473	153	0,99
<b>0,01</b>	70688	890	1,26

**Anexo 6. Curva de calibración en matriz para lactosa con todos los puntos y con 3 puntos**



**Figura 6 1** Curva de calibración en matriz Lactosa seleccionando 3 puntos



**Figura 6 2** Curva de calibración en matriz Lactosa seleccionando todos los puntos

### Anexo 7. Limite de detección y cuantificación de la técnica

Se realiza según lo mencionado punto 5.3.2 la cual es realizada para la técnica según LD instrumental, lo que quiere decir que calcula con la concentración mínima 0,00008 g/mL

Area	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Maltosa
1	14814	16259	20684	22927	5290
2	14690	15830	16378	16122	5999
3	14714	13805	18826	22241	5264
4	14071	23802	18784	18758	5637
5	15155	15099	28070	14257	6116
6	14386	14579	21134	21113	5476
7	15114	14848	19020	14275	4016
8	13629	16355	21629	15637	11269
9	14231	16344	17627	19357	7451
10	14353	14793	16365	20043	6818
<b>Promedio</b>	14478	15336	20641	17447	6858
<b>Desvest</b>	577,71	802,08	4157,04	3077,03	2463,64



### Anexo 8. Repetibilidad y reproducibilidad.

Se realiza según lo mencionado en el punto 6.5, adicionando estándar de concentración 0,3 y 0,4 g/100mL se realiza el estándar según lo indicado en el punto 6.1 prueba 2.

		FRUCTOSA	GLUCOSA	SACAROSA	MALTOSA	LACTOSA
Día	Concentración (g/100mL)	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA
Día 1	0,3	14397	13391	22530	5587	15676
	0,3	14045	13828	22799	5986	14117
	0,3	16594	11348	16073	6380	17916
	0,3	15780	12250	19823	6270	17698
	0,4	21196	19454	24554	11610	15748
	0,4	19760	17185	23593	9464	16777
	0,4	19996	16656	20316	8504	17630
Día 3	0,4	21064	19059	23230	10800	16406
	0,3	14299	15981	22221	6174	16777
	0,3	14145	14100	21899	5893	13987
	0,3	15994	13299	19064	6121	16971
	0,3	16111	12119	18998	11133	16757
	0,4	21086	18919	24474	10672	11976
	0,4	20069	18101	24682	8996	10112*
	0,4	18896	16441	21119	8601	16523
	0,4	21121	22012	22461	11201	11666

Nota: El dato de lactosa marcado (\*) fue eliminado, ya que se alejaba de los valores obtenidos

**TABLA 7 1** Datos de gramos de muestras para std 0,3-0,4 g/100mL

STD 0,4		STD 0,3	
<b>Azúcar</b>	Gramos	<b>Azúcar</b>	Gramos
<b>Fructosa</b>	0,4001	<b>Fructosa</b>	0,3013
<b>Glucosa</b>	0,4008	<b>Glucosa</b>	0,3008
<b>Sacarosa</b>	0,4011	<b>Sacarosa</b>	0,3007
<b>Maltosa</b>	0,4008	<b>Maltosa</b>	0,3022
<b>Lactosa</b>	0,4017	<b>Lactosa</b>	0,3028
<b>Muestra chocolate</b>		<b>Muestra chocolate</b>	
<b>muestra</b>	gramos	<b>muestra</b>	gramos
<b>M1</b>	0,0523	<b>M1</b>	0,051
<b>M2</b>	0,0513	<b>M2</b>	0,051

## Anexo 9. Áreas de cálculo de recuperación en muestra de chocolate

**TABLA 8 1** áreas utilizadas para cálculo de recuperación en muestras de chocolate

<b>Azúcares</b>	<b>Área de Chocolate sin Fortificar</b>	<b>Área de Chocolate fortificado</b>
<b>Fructosa</b>	5867	12532
<b>Glucosa</b>	6540	14340
<b>Sacarosa</b>	6250	19787
<b>Maltosa</b>	3642	14641
<b>Lactosa suma</b>	10422	11419

**TABLA 8 2** Gramos de muestras de chocolate y muestras del estándar utilizadas para fortificar

<b>Azúcares</b>	<b>Gramos muestras std fortificar (g/100mL)</b>
<b>Fructosa</b>	0,0502
<b>Glucosa</b>	0,0507
<b>Sacarosa</b>	<b>0,051</b>
<b>Maltosa</b>	0,0508
<b>Lactosa suma</b>	0,0509
<b>Muestra Chocolate</b>	Gramos muestras chocolate (g)
<b>muestra 1</b>	0,0526 g
<b>muestra 2</b>	0,0530 g

