



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR.

Memoria presentada como parte de los
requisitos para optar al título de
Ingeniero en Alimentos

Andrea Candelaria Foitzich Molina

Valdivia – Chile

2013

PROFESOR PATROCINANTE:



Sr. Ociel R. Muñoz Fariña

Bioquímico, Dr. Ciencias Químicas.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

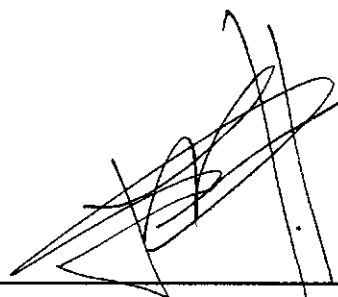
PROFESORES INFORMANTES:



Sra. Marcia E. Costa Lobo

Ingeniero Civil Bioquímico, Diplomado en Ingeniería Industrial

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



Sr. Javier A. Parada Silva

Ingeniero en Alimentos, Dr. en Ciencias de la Ingeniería

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	7
	SUMMARY	8
	GLOSARIO DE TÉRMINOS	9
1	INTRODUCCIÓN	10
2	MATERIAL Y MÉTODO	18
2.1	Ubicación del estudio	18
2.2	Materiales	18
2.2.1	Muestras de miel y pan de abeja	18
2.2.2	Muestras de complementos alimenticios para abeja	18
2.2.3	Materias primas para la elaboración de complementos alimenticios para abeja	18
2.2.4	Reactivos	18
2.2.5	Soluciones	18
2.2.6	Equipos e instrumentos	19
2.3	Métodos	19
2.3.1	Método de extracción para matrices orgánicas	19
2.3.2	Método de extracción para muestras de miel	19

2.4	Determinación de parámetros instrumentales y experimentales para la detección de carbohidratos simples por HPLC-IR	19
2.4.1	Preparación de los estándares	20
2.4.2	Preparación de la curva de calibración	20
2.5	Validación de metodología	20
2.5.1	Límite de decisión y capacidad de detección	20
2.5.2	Exactitud	21
2.5.3	Precisión	22
2.6	Cuantificación del contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en las diversas muestras biológicas	22
2.7	Análisis estadístico de los resultados	22
3	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
3.1	Determinación de los parámetros para el análisis cromatográfico	23
3.2	Validación	25
3.2.1	Curva de calibración	25
3.2.2	Sensibilidad, exactitud y precisión	25
3.3	Métodos de extracción	26
3.4	Análisis cromatográficos de las muestras	28
3.4.1	Materias primas para la elaboración de complementos alimenticios para abeja	28
3.4.2	Miel	28
3.4.3	Pan de abeja	29

3.4.4	Complementos alimenticios para abeja	29
3.5	Análisis estadístico	31
3.5.1	Comparación de las muestras analizadas con respecto al monosacárido Fructosa	31
3.5.2	Comparación de las muestras analizadas con respecto al monosacárido Glucosa	32
3.5.3	Comparación de las muestras analizadas con respecto al disacárido Sacarosa	33
4	CONCLUSIONES	35
5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
6	ANEXOS	38

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Condiciones de detección HPLC	20
2	Características analíticas de la metodología para la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa	25
3	Contenido de azúcares simples presentes en las materias primas utilizadas para la elaboración de los complementos para abeja	28
4	Contenido de carbohidratos en prototipos de alimentos para abeja	29
5	Comparación en cuanto al contenido de carbohidratos de muestras de miel y pan de abeja	30
6	Comparación en cuanto al contenido de azúcares simples en muestras de miel y complemento alimenticio para abeja calórico CF	31
7	Comparación en cuanto al contenido de hidratos de carbono en muestras de complemento alimenticio proteico AF y pan de abeja	31

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de los monosacáridos, fructosa (1) y glucosa (2) y del disacárido sacarosa (3)	13
2	Esquema general de un sistema de HPLC	15
3	Esquema de un detector de índice de refracción	16
4	Cromatograma de la mezcla de patrones, que muestra los tiempos de retención de: fructosa, glucosa y sacarosa a una concentración de 10.000 µg/ml cada analito	24
5	Cromatograma logrado al aplicar el método oficial de la AOAC 977.20 para extracción de azúcares en miel, donde se observa la diferencia entre las áreas de las muestras inyectadas por triplicado	27
6	Cromatograma de muestra de miel, obtenido con el método que utiliza el reactivo de carrez para extracción de azúcares, donde se aprecia la baja diferencia entre las áreas de cada muestra inyectada	27
7	Comparación entre los cromatogramas de los prototipos de complemento alimenticio optimizados calórico CF y proteico AF, donde se aprecian la diferencia entre las áreas de los carbohidratos en estudio	30
8	Gráfico de cajas y bigotes que ilustra la comparación de concertación del carbohidrato Fructosa entre las distintas muestras (n=4)	32
9	Gráfico de cajas y bigotes que expresa la comparación de concentración del carbohidrato Glucosa entre las distintas muestras (n=4)	33
10	Grafico de cajas y bigotes que ilustra la comparación de concertación del carbohidrato Sacarosa entre las distintas muestras (n=4)	34

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Fotografías del equipo utilizado en la determinación de carbohidratos	38
2	Curvas de Calibración de azúcares simples: Fructosa, Glucosa y Sacarosa	39
3	Curvas Promedio	42
4	Límite de decisión $Cc\alpha$ para Fructosa, Glucosa y Sacarosa	44
5	Capacidad de detección $Cc\beta$ para Fructosa, Glucosa y Sacarosa	46
6	Exactitud y precisión	47
7	Resumen y presentación de la cuantificación de las muestras expresadas en g/100g	48
8	Análisis estadístico	51

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue desarrollar y validar un método de extracción, determinación y cuantificación simultánea de tres carbohidratos: fructosa, glucosa y sacarosa, por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción, en muestras de miel, pan de abeja, dos complementos alimenticios para abeja (proteico AO y calórico CO, además de su formulación optimizada, proteico final AF y calórico final CF) y las materias primas para la elaboración de estos últimos, que son investigadas en esta memoria bajo el marco del proyecto del Consorcio de Desarrollo Tecnológico Apícola CAPI_ID0904.

Para ello se recurrió a la metodología de HPLC-IR, utilizando una columna cromatográfica "amino NH₂", y una mezcla de acetonitrilo: agua desionizada (83:17), como fase móvil.

Se comprobó la separación, y se obtuvieron los tiempos de retención de los picos cromatográficos de los azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa), lográndose definir y validar el método para cuantificar estos carbohidratos.

Se determinó la concentración de estos analitos en las muestras estudiadas. Todas ellas presentaron contenidos de los azúcares fructosa y glucosa, también se pudo detectar sacarosa, sin embargo, este disacárido no está presente en todas las matrices analizadas. Las muestras de miel y de los prototipos denominados proteico (AO) y proteico final (AF) no la presentan.

SUMMARY

The purpose of this work was to develop and validate a method of extraction, simultaneous determination and quantitation of three carbohydrates: fructose, glucose and sucrose, by high resolution liquid chromatography coupled to a refractive index detector, in honey samples, bee bread, two for bee food supplements (protean AO and caloric CO, in addition to its optimized formulation, final protean AF and final caloric CF) and raw materials for the production of the latter, are investigated in this report under the framework of the Technology Development Consortium CAPI_ID0904 Beekeeping .

This was done by methodology HPLC-IR, using a chromatographic column "amino NH₂," and a mixture of acetonitrile: deionised water (83:17) as mobile phase.

Separation was found and were obtained the retention times of the chromatographic peaks sugars (fructose, glucose and sucrose), achieving define and validate a method for quantifying these carbohydrates.

The concentration of these analytes in the samples studied. All of them showed contents of sugars fructose and glucose, sucrose could also be detected, however, this disaccharide is present in all matrices analyzed. Honey samples and prototypes called protean (AO) and final protean (AF) without.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-IR: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción

ACN: Acetonitrilo

Cc α : Límite de decisión.

Cc β : Capacidad de detección.

σ : Desviación estándar.

Cv: Coeficiente de variación.

ppm: Partes por millón.

mV: Milivolt.

F: Fructosa.

G: Glucosa.

S: Sacarosa.

CO: Alimento calórico.

AO: Alimento proteico.

CF: Alimento calórico final.

AF: Alimento proteico final.

%R: Porcentaje de recuperación (exactitud).

%CV: Porcentaje de coeficiente de variación (precisión).

1. INTRODUCCIÓN

Esta memoria se lleva a cabo bajo el marco del proyecto “Desarrollo de alimentos para fortalecer el estado nutricional de abejas melíferas” del Consorcio de Desarrollo Tecnológico Apícola CAPI_ID0904, dentro de las necesidades de este proyecto se debió desarrollar una metodología por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar el contenido de los perfiles de azúcares de diferentes matrices, como: miel, pan de abeja, además de las materias primas para la elaboración de dos formulaciones de complementos alimenticios para abeja denominados: calórico CO y proteico AO, con su respectiva formulación optimizada CF y AF, los cuales también fueron analizados.

Varios son los métodos que se han utilizado, para determinar los contenidos de carbohidratos. Dentro de éstos, los métodos cromatográficos son en la actualidad una herramienta imprescindible para la determinación rápida y específica de azúcares. Esto supone una notable mejora frente a los análisis tradicionales donde las interferencias presentes en la matriz y el consumo elevado de tiempo suponen serios inconvenientes. Hoy en día la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha llegado a ser una de las técnicas de laboratorio más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Esta técnica permite la separación, identificación y cuantificación de los azúcares presente en muestras orgánicas.

Una de las matrices biológicas con altos contenidos de carbohidratos es la miel, la cual es definida por GIL, (2010) como la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de las flores (miel de flores o de néctar) o de las secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de los insectos succionadores, presentes en las partes vivas de las plantas (miel de mielada) que las abejas recolectan, transforman (combinándolas con sustancias específicas propias), depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure .

La miel es un producto biológico muy complejo; varía notablemente en su composición como consecuencia de la microbiota de origen, la zona, las condiciones climáticas, la conservación, etc. Su color va desde casi incoloro a pardo oscuro; su consistencia

puede ser fluida viscosa total o parcialmente cristalina. El sabor y el aroma varían, dependiendo de las plantas de origen; por todo ello, es más apropiado hablar de “mieles” que de “miel” (GIL, 2010).

En cuanto a su composición general la miel está constituida principalmente de carbohidratos disueltos en agua, la fracción de azúcares en la miel generalmente representa niveles que oscilan entre 95 y 99% de los sólidos totales, otorgándole a cada tipo de miel propiedades físicas características, como son el índice de refracción, la actividad de agua, higroscopicidad, tendencia a la granulación, así como su poder rotatorio, refiriéndose éste a la acción de la miel sobre la luz polarizada, la mayoría de las mieles hacen girar a la izquierda el plano de polarización (levógiras) (JEAN – PROST, 1995).

Los principales azúcares encontrados en miel son la glucosa y fructosa, que componen más del 70% del producto, lo que indica la riqueza de carbohidratos de la miel. Su contenido de azúcares reductores es normalmente 72 a 73%, y a ello debe la miel su consistencia pegajosa y viscosa, y su alta densidad, (1,3 a 1,4 g/ml), así como también su alto poder edulcorante, 25% más que el azúcar de mesa (CORNEJO, 1993). Los azúcares no se encuentran en el néctar, sino que se forman durante la maduración y almacenamiento de la miel (BIANCHI, 1990). Junto con otras sustancias como los ácidos, los compuestos nitrogenados y minerales, contribuyen decisivamente en el sabor de la miel (HUIDOBRO *et al.*, 1984).

Durante mucho tiempo se pensó que la fracción de azúcares en la miel estaba compuesta básicamente por glucosa y fructosa, con algo de sacarosa y dextrinas en cantidades menores, sin embargo, los nuevos métodos de análisis y separación de azúcares han puesto en evidencia la presencia de más de 30 azúcares diferentes (WHITE *et al.*, 1975).

Los oligosacáridos en la miel son una mezcla compleja de al menos 12 disacáridos, alrededor de 11 trisacáridos, al menos un tetrasacárido y un pentasacárido (GOMEZ *et al.*, 1999). PERSANO *et al.* (1999), señalan que estos oligosacáridos corresponden a: disacáridos como maltosa, sacarosa, isomaltosa, gentobiosa, maltulosa, trehalosa, turanosa, kojibiosa; trisacáridos y azúcares superiores como, erlosa, isomaltotriosa, maltotriosa, melicitosa, rafinosa, isomaltopentosa. Estos azúcares son derivados de

diferentes combinaciones de sólo dos monosacáridos, por formación de enlaces, glucosa – glucosa o glucosa – fructosa a través de diferentes átomos de carbono, resultando esto en una alta similitud estructural (GOMEZ *et al.*, 1999).

Los carbohidratos de la miel son analizados en muchos casos, para obtener información sobre diferentes aspectos de su calidad, de esta forma se tiene la determinación de azúcares reductores (glucosa y fructosa representan más del 90% de todos los azúcares reductores), de sacarosa, azúcar total, y glucosa comercial (BOGDANOV *et al.*, 1997).

Las proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, minerales, polen y otras sustancias como levaduras, algas, vestigios de hongos y partículas sólidas se encuentran en menor cantidad en la miel (CRANE, 1990).

Las abejas no sólo producen miel, también fabrican otros productos como el “pan de abeja”, con este término se designa a los gránulos de polen, que son almacenados en las celdas, a esta masa de polen se le añade, miel, néctar, y secreciones glandulares propias de la abeja. El polen almacenado de esta manera se somete a una fermentación ácido láctica y se convierte en lo que se llama; pan de abejas. El cual, tiene una flora bacteriana específica, encontrándose además tres géneros microbianos: *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces*. Esto sugiere que los microorganismos están probablemente implicados en el almacenamiento del polen (HERBET *et al.*, 1978).

En cuanto a su composición, es rico en vitaminas del complejo B, aminoácidos esenciales y ácidos grasos. Los carbohidratos son las sustancias principales de los gránulos de polen, que llegan a alcanzar un 49%, contiene un 20-40% de azúcares reductores y 0-20% de no reductores. En el pan de abejas después de la hidrólisis fermentativa del almidón, la sacarosa, polisacáridos y otras combinaciones sacaríferas, se recopila gran cantidad de monosacáridos y azúcares fermentables. Se ha determinado fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa e inosina. El contenido total de azúcares y sustancias sacaríferas es de 43-70% y de ácido láctico 0,7-1,1%. Un contenido más alto de disacáridos en algunas muestras se caracteriza por la baja presencia de ácido láctico. De los azúcares la mayor parte son monosacáridos, con un 12,5-20% de fructosa, 18,5-29% de glucosa, 0,0-3,4% de

galactosa y un contenido más estable de inosina. Se detectan trazas de sacarosa, 3-7,8% de maltosa. Se encuentra rafinosa sólo en el pan de abeja (CALZADA, 2008).

En lo que concierne a los carbohidratos, estos se pueden definir químicamente como derivados aldehídos o cetónicos de alcoholes superiores o polivalentes (con mas de un grupo OH) o como compuestos que por hidrólisis forman estos derivados (TEIJÓN, 2001). En la Figura 1 se muestran los azúcares más comunes encontrados en miel y pan de abeja.

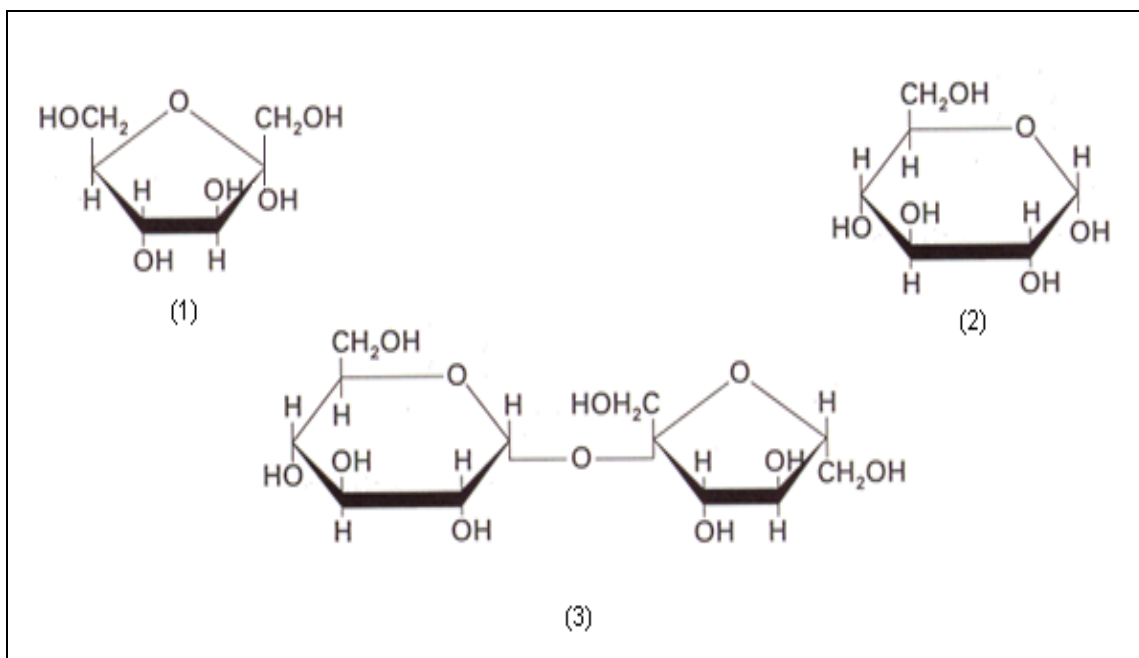


Figura 1. Estructura química de los monosacáridos, fructosa (1) y glucosa (2) y del disacárido sacarosa (3).

Fuente: Teijón (2001).

Existen tres clases principales de hidratos de carbono: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos consisten en una sola unidad de polihidroxicetona o polihidroxialdehído; el monosacárido más abundante en la naturaleza es la glucosa. Los oligosacáridos consisten en cadenas cortas de unidades de monosacáridos unidas por enlaces glucosídicos, los más abundantes son los disacáridos siendo el más común de éstos la sacarosa. Los polisacáridos consisten en cadenas largas de cientos o miles de unidades de monosacáridos, como son la celulosa (cadena lineal) o el

glucógeno (cadenas ramificadas). Los más comunes de este grupo son el almidón y la celulosa, fabricados por las plantas (LEHNINGER, 1995).

De acuerdo a las exigencias nutricionales de las abejas, los carbohidratos juegan un papel importante en el suministro de energía que se utiliza en la síntesis de materia orgánica, contracción muscular, conducción del impulso nervioso, producción de aminoácidos, producción de cera, entre otros (DIETZ, 1975). Las abejas en etapa adulta pueden sobrevivir con una dieta compuesta sólo de hidratos de carbono y agua. Proteínas, lípidos, vitaminas y minerales son nutrientes esenciales en la creación y desarrollo de las larvas. Las fuentes de energía utilizadas por las abejas proceden del glucógeno almacenado en la grasa corporal y de los alimentos contenidos en la cosecha de la miel o la hiel de la miel. Sin embargo, no todos los azúcares pueden ser metabolizados por las abejas, estas ya adultas utilizan glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, trehalosa y melezitosa (STANDIFER *et al*, 1997).

De los métodos de análisis que actualmente se utilizan para separación, identificación y cuantificación de azúcares, se destacan la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y en menor medida, electroforesis capilar (CE) (CHENG *et al.*, 2006). Debido a que los azúcares son altamente polares, muy hidrofílicos y muy poco volátiles, antes de ser analizados por métodos de cromatografía de gas, los carbohidratos deben ser convertidos en sus derivados volátiles estables, como derivados trimetilsilil o acetato, lo que lo hace un método complejo. Sin embargo la determinación de carbohidratos por HPLC es un método sencillo que no requiere derivatizar los azúcares para su identificación.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se define como la técnica analítica de separación ampliamente utilizada dada su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies y, sobre todo, su aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, así como en muchos campos de la ciencia y la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies órgano-metálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (SKOOG, 2001). En la Figura 2 se muestra un esquema que representa un HPLC.

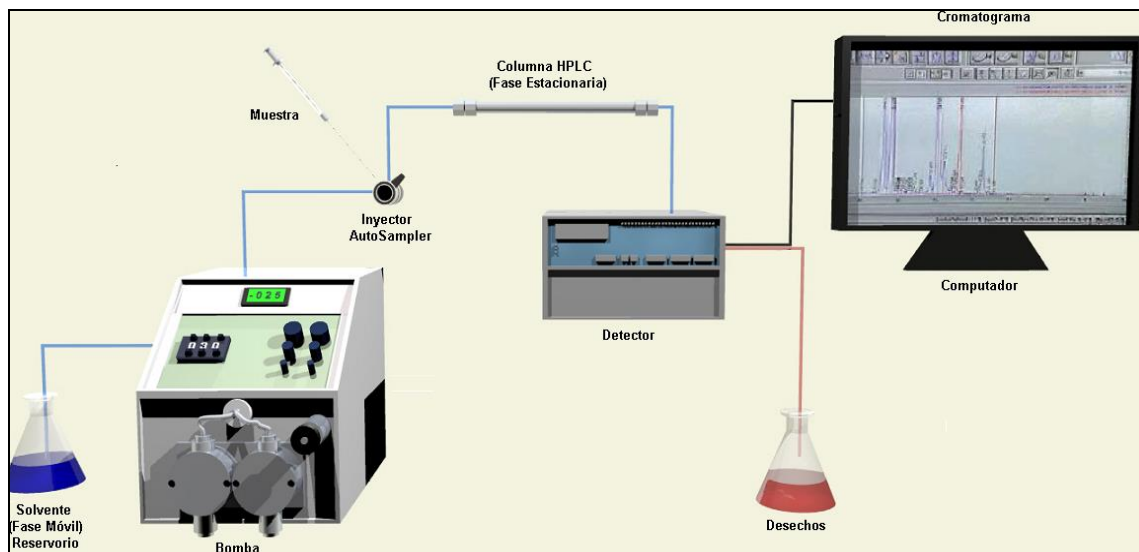


Figura 2. Esquema general de un sistema de HPLC.

Fuente: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=es_ES¹.

Se utilizan diversos detectores acoplados a los métodos cromatográficos, como por ejemplo, el detector de índice de refracción (IR), detector de ultra violeta/visible (UV/Vis), detector de fluorescencia y detección de la dispersión de luz por evaporación (ELSD), son los detectores más comúnmente usados para HPLC (MEDEIROS *et al.*, 2007).

Para la determinación de carbohidratos el sistema de cromatografía líquida de alta resolución debe ser acoplado a un detector de índice de refracción (Figura 3), este mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal, ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente. Como inconveniente tiene la desventaja de ser muy poco sensible, esto limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No se puede utilizar con programación de solventes porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción, como consecuencia no se estabiliza la línea base. Existen tres tipos diferentes de detectores de Índice de Refracción: Fresnel, Deflexión e Interferométrico (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

¹ http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=es_ES (Consultado el 6 de enero 2012).

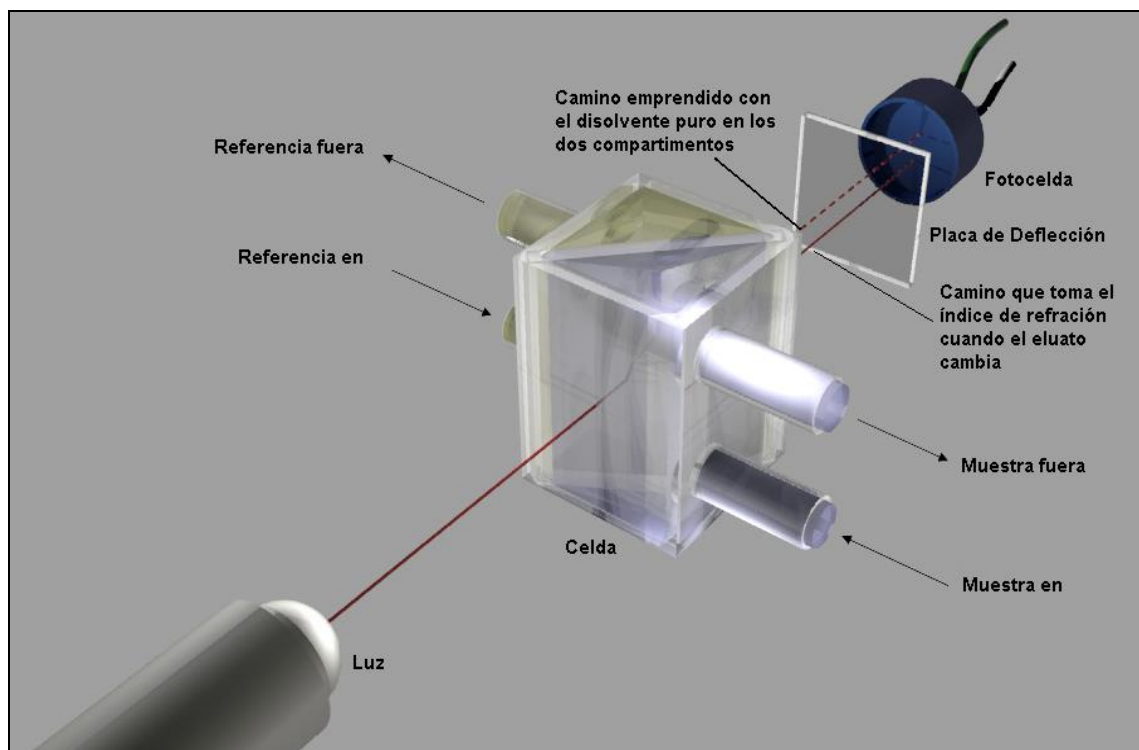


Figura 3. Esquema de un detector de índice de refracción.

Fuente: Skoog, (2001).

En el caso de esta memoria el detector a utilizar es el de deflexión un detector diferencial que, al contrario del Fresnel, sólo usa un prisma para todo el rango de índices de refracción, pero emplea celdas de mayor tamaño, del orden de 8 a 10 μl . Una celda contiene la fase móvil pura, y a través de otra celda fluye el eluido de la columna (muestra). Cuando se produce un cambio del índice de refracción en la celda de la muestra, se produce un cambio en la trayectoria del haz luminoso que es registrado por el sistema óptico (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

De los antecedentes anteriores se ha planteado la siguiente hipótesis de trabajo: es posible mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de índice de refracción determinar y cuantificar simultáneamente fructosa, glucosa y sacarosa en muestras orgánicas.

El objetivo general de este trabajo es, desarrollar y validar un método de extracción, separación y cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa, por cromatografía líquida

de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de índice de refracción (IR), en muestras biológicas.

Objetivos Específicos.

1. Desarrollar un método de extracción de azúcares desde matrices orgánicas.
2. Desarrollar y validar un método para la determinación simultánea y cuantificación de tres azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC – IR).
3. Cuantificar fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de miel, pan de abeja, complementos para abeja y otras matrices orgánicas.

2. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Ubicación del estudio

El desarrollo de la parte experimental fue realizado en el laboratorio de análisis instrumental, ubicado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos ICYTAL, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile. Los recursos para la realización de esta investigación se obtuvieron del proyecto “Desarrollo de alimentos para fortalecer el estado nutricional de abejas melíferas” CAPI_ID0904.

2.2 Materiales

2.2.1 Muestras de miel y pan de abeja. Todas las muestras utilizadas para los análisis cromatográficos, provienen de apiarios de las regiones segunda, tercera y cuarta.

2.2.2 Muestras de complementos alimenticios para abeja. Estas fueron elaboradas en el laboratorio de análisis instrumental, de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

2.2.3 Materias primas para la elaboración de complementos alimenticios para abeja. Algunas materias primas como: levadura de cerveza, azúcar y aceite fueron obtenidas en diferentes supermercados, otras como la harina de quínoa y lupino fueron adquiridas en la empresa AVELUP y la albúmina de huevo proviene de PRINAL.

2.2.4 Reactivos. Acetonitrilo (PA), acetato de zinc, ácido acético glacial, ferrocianuro de potasio adquiridos en Merck; los patrones fructosa (para biología molecular), glucosa y sacarosa (para análisis) fueron obtenidos de Winkler.

2.2.5 Soluciones. En la extracción de carbohidratos se utilizó:

Solución de Carrez I. Se prepara disolviendo 24 g de acetato de zinc $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ y 3 g de ácido acético glacial en 50 ml de agua desionizada, aforado a 100 ml con agua (calidad HPLC).

Solución de Carrez II: se disuelven 10,6 g ferrocianuro potásico $Fe(CN)_6 K_4 \cdot 3H_2O$ en 50 ml de agua (calidad HPLC) y se afora a 100 ml con agua desionizada.

2.2.6 Equipos e instrumentos. Se utilizaron los siguientes equipos e instrumentos: cromatógrafo de alta resolución Constant Metric® 3200 solvent delivery system LDC analytical, detector RI MERCK differential refractometer RI-71, Waters™ 717 plus autosampler, horno columna Waters™ temperature control Module II, Jeringa Hamilton® de 50 µl; columna: cartridge Merck Purospher STAR-NH₂ 250 x 4,6 mm (5 µm) con precolumna; la integración de los picos cromatográficos se realizó mediante el Software integrador Clarity®.

2.3 Métodos

2.3.1 Método de extracción para matrices orgánicas. Pesar 5 g de muestra homogeneizada (muestra sólida) o 10 ml de muestra líquida, trasladar a un matraz aforado de 100 ml, se adicionan 20 ml de agua desionizada y se calienta a 60°C por 30 min. Luego se enfría y se agregan 10 ml de Carrez I y 10 ml de Carrez II, se agita y se enraza a 100 ml con agua grado HPLC, se deja decantar, y se toma con pipeta automática 1,5 ml (una cantidad suficiente para realizar las determinaciones por HPLC) del sobrenadante, el cual es trasladado a un tubo eppendorf, éste es ultracentrifugado a 12.000 rpm por 12 min, una vez que la muestra este trasparente es inyectada en el HPLC-IR (ANEXO 1). (Método adaptado, determinación de ácido sórbico y benzoico por HPLC/UV visible en alimentos de origen vegetal).

2.3.2 Método de extracción para muestras de miel. Pesar 5 g de muestra de miel dentro de un matraz aforado de 50 ml, luego se añade 25 ml de agua desionizada disolviendo la muestra y se afora con acetonitrilo grado HPLC hasta completar 50 ml, se agita para luego filtrar utilizando papel Whattman N°1. Se toma una alícuota con pipeta automática y se traslada a un tubo eppendorf, ultracentrifugar a 10.000 rpm por 10 min, la solución clarificada es inyectada en el cromatógrafo de alta eficacia HPLC-IR (Método oficial AOAC 977.20).

2.4 Determinación de parámetros instrumentales y experimentales para la detección de carbohidratos simples por HPLC-IR

Primero se realizó la preparación de los patrones para obtener las curvas de calibración, y lograr validar esta metodología. Una vez validado el método se lleva a cabo el proceso de extracción de cada muestra la cual es inyectada en el HPLC-IR, este entrega los cromatogramas con las áreas de cada analito. Finalmente se

cuantifican las muestras, para determinar los azúcares presentes y su concentración. El Cuadro 1 presentan las condiciones instrumentales para la determinación de carbohidratos.

Cuadro 1. Condiciones de detección HPLC.

Columna	Cartridge Merck Purospher STAR-NH ₂ 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula.
Fase móvil	Acetonitrilo/Agua , 83:17 v/v
Flujo	1,2 ml/min.
Presión	98 PSI x 100
Temperatura	30°C
Tiempo	25 min
Detección	Índice de refracción (refractómetro diferencial).
Volumen de inyección (muestras)	20 µl
Modo	Isocrático

2.4.1 Preparación de los estándares. Los patrones de fructosa, glucosa y sacarosa se prepararon pesando 1,0 g de cada azúcar en un matraz aforado, enrazado con agua grado HPLC a 25 ml. Cada estándar queda a una concentración de 40.000 µg/ml.

2.4.2 Preparación de la curva de calibración. La curva de calibración se realizó preparando en un matraz aforado una solución que contenía 6,25 ml de cada uno de los tres patrones de 40.000 µg/ml, luego se llevo al aforo (25 ml) con agua desionizada, obteniendo una mezcla de fructosa, glucosa y sacarosa a una concentración de 10.000 µg/ml cada azúcar. Esta mezcla de patrones fue inyectada en el cromatógrafo, se analizó 6 veces, obteniendo de ella 6 curvas de calibración (ANEXO 2).

2.5 Validación de Metodología

Para validar la metodología se determinaron los límites de decisión, capacidad de detección, precisión y exactitud.

2.5.1 Límite de decisión y capacidad de detección. Son los valores establecidos por la norma ISO 11.843. Ccα corresponde, según la definición ISO, al límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error “α” que una muestra no es conforme. Dicho límite igualmente corresponde a una concentración mínima, que

establece en este caso una probabilidad de un falso positivo de un 1%. Se obtiene con el valor del intercepto de una curva de calibración promedio y_0 , pero se le suma la desviación estándar (σ) del valor multiplicado por 2,33 (que representa un $\alpha=0,01$ con una varianza constante en el intervalo del ruido a σ) (2.1) (ANEXO 4).

$Cc\beta$ es la capacidad de detección que por definición corresponde al contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β .

Estadísticamente corresponde a la probabilidad de obtener un falso negativo en un 5%.

Se procede analizando un blanco de muestra enriquecido con analito hasta el límite de decisión ($Cc\alpha$). Este blanco enriquecido pasa por todo el proceso analítico del método. El proceso se repite 20 veces. Se analiza y se calcula desviación estándar (σ) de la determinación. El resultado se obtiene sumando al límite de decisión la σ obtenida multiplicada por 1,64 (2.2) (ANEXO 5).

$$Cc\alpha = y_0 + (2,33 * \sigma) \quad (2.1)$$

$$Cc\beta = Cc\alpha + (1,64 * \sigma) \quad (2.2)$$

2.5.2 Exactitud. Es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado, también la exactitud indica la proximidad de la medición con respecto del valor de referencia que se ha usado para calibrar el instrumento, expresándose como % de recuperación.

Para calcular la exactitud, en el caso de no existir patrones de referencia certificados para el analito en cuestión se recurre a la determinación de la "Recuperación", para ello debe usarse un blanco de muestra adicionado de una cantidad conocida de analito, sometido al procedimiento analítico. Esto debe repetirse a lo menos 3 veces (ANEXO 6).

$$\%R = \frac{(CF - CV)}{CA} \times 100 \quad (2.3)$$

Donde:

%R: Porcentaje de recuperación.

CF: Concentración del analito medida en la muestra fortificada.

CV: Concentración del analito medida en la muestra sin fortificar.

CA: Concentración del analito adicionada.

2.5.3 Precisión. Describe la reproducibilidad de los resultados, concordancia entre los valores numéricos de diferentes mediciones obtenidos analíticamente determinados en el mismo equipo bajo las mismas condiciones, se expresa habitualmente como el coeficiente de variación (CV) (ANEXO 6).

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.4)$$

Donde:

%CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

σ : Desviación estándar.

\bar{X} : Promedio.

2.6 Cuantificación del contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en las diversas muestras biológicas

Los cromatogramas de cada muestra fueron solapados con los obtenidos al inyectar la mezcla de patrones, esto se hizo con la finalidad de comparar los picos conseguidos en cada muestra con los estándares evaluados y saber si realmente correspondían a los azúcares en estudio, hay que tener en cuenta que en un equipo HPLC acoplado a un detector de índice de refracción IR los cambios de temperatura, afectan el tiempo de retención de los analitos, y las muestras biológicas pueden poseer distintos carbohidratos, es por eso que se usa un horno columna para mantener la temperatura constante mientras dure el análisis. Colocando una mezcla que contenía los tres patrones cada diez muestras inyectadas se mantenía un control y así se pudo estimar a cual patrón correspondían los picos observados en las matrices. Este análisis permitió determinar con claridad la separación de los carbohidratos: fructosa, glucosa y sacarosa.

Con las curvas promedio (ANEXO 3) y las áreas obtenidas en los cromatogramas, se cuantifica la cantidad de cada analito presentes en las muestras analizadas, el resultado es expresado en g/100 g (ANEXO 7).

2.7 Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos de los carbohidratos presentes en las muestras, se analizaron con el programa STATGRAPHICS centurión (ANEXO 7).

3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el proceso de desarrollar el método analítico cromatográfico el cual permita la separación y la cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa se probaron distintas condiciones hasta conseguir la separación cromatográfica y detección. Luego de esto se optimizó un método de extracción de los carbohidratos presentes en las muestras.

3.1 Determinación de los parámetros para el análisis cromatográfico

En este estudio se utilizó una columna NH₂ (amino), que es una columna de intercambio iónico diseñado para la separación de carbohidratos (mono y disacáridos tales como fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa), además de aniones, y ácidos orgánicos. Debe ser usada con una fase móvil compuesta principalmente por acetonitrilo y agua.

Debido a que en la determinación de carbohidratos el HPLC esta acoplado a un detector de índice de refracción, no se puede realizar una elución en gradientes, por lo que las preparaciones de fase móvil, se diseñaron en la utilización de sistema de elución en forma isocrática. UREÑA *et al.* (2007), propone que la fase móvil utilizada para determinar carbohidratos, debe contener los solventes acetonitrilo y agua desionizada, este autor recomienda una proporción de acetonitrilo/agua 80/20 v/v a una temperatura de columna de 30° C y un flujo de 1,5 ml/min. Por otra parte, la Norma chilena, NCh 574 plantea una fase móvil de acetonitrilo/agua, 80/20 v/v, un flujo de 1,3 ml/min y una temperatura de horno columna de 30°C, sin embargo al probar estas proporciones de fase móvil no se observó una clara separación de los picos cromatográfico por lo cual se modificaron los volúmenes hasta alcanzar una proporción de ACN/H₂O desionizada, 83/17 v/v.

Una vez definida la proporción de la fase móvil, se comenzó a determinar el flujo, Ureña *et al.* (2007), propone un flujo de 1,5 ml/min, la Norma chilena plantea un flujo de 1,3 ml/min, no obstante con el fin de ahorrar fase móvil se compararon los flujos 1,0 y 1,2 ml/min siendo este último el adecuado, ya que se observo mayor definición de los picos.

En cuanto a la temperatura no hubo cambio, se mantuvo a 30 °C como lo propuesto por Ureña *et al.* (2007) y la NCh 574, (2006).

En definitiva, se determina que la separación óptima de los tres patrones, es en forma isocrática, con una columna amino NH_2 de 250 x 4,6 mm, una mezcla de solventes ACN/ H_2O desionizada en una proporción de 83/17 v/v, con un flujo de 1,2 ml/min y a una temperatura de 30 °C.

Mediante las condiciones de fase móvil, temperatura del horno columna y el flujo detallado anteriormente; se determina el orden de elusión de los carbohidratos, que corresponde a: fructosa, glucosa y finalmente sacarosa, obteniéndose también los tiempos de retención. Inicialmente los estándares (fructosa, glucosa y sacarosa), se analizaron por separado, se hicieron pruebas con distintas concentraciones de los mismos y una vez establecidos los parámetros para obtener una separación adecuada, para identificar los picos cromatográficos, se preparo una mezcla de patrones a distintas concentraciones, para determinar en una sola inyección los tiempos de cada azúcar. El tiempo de corrida de la muestra corresponde a un periodo de 25 minutos.

En la Figura 4, se puede observar una clara definición y separación de los analitos en estudio (en el cromatograma se designa a cada azúcar con su inicial en mayúscula), Además se presentan los picos con sus tiempos de retención para cada carbohidrato, apareciendo en primer lugar el monosacárido fructosa a los 6,447 min, seguido por glucosa 8,327 min y por último el disacárido sacarosa 15,843 min. Con esta primera aproximación se determinó que este método era adecuado para la separación y cuantificación de los tres carbohidratos analizados.

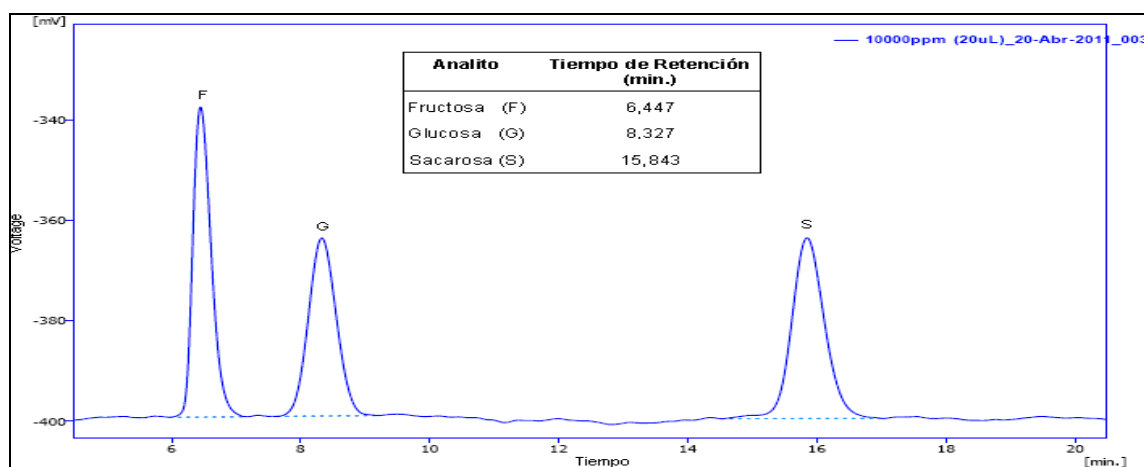


Figura 4. Cromatograma de la mezcla de patrones, que muestra los tiempos de retención de: fructosa, glucosa y sacarosa a una concentración de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cada analito.

3.2 Validación

Según Quattrocchi *et al.* (1997) una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, esta debería validarse para demostrar su idoneidad, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables.

3.2.1 Curva de calibración. Para validar la metodología se realizaron 6 curvas de calibración, pero como se determinaron tres azúcares en forma simultánea se genera una curva de calibración para cada uno de los analitos, obteniendo 18 curvas en total (ANEXO 2), las que mostraron una buena linealidad. Para cada carbohidrato en estudio se obtuvo una curva de calibración promedio (ANEXO 3). Con las curvas de calibración promedio, se obtienen las ecuaciones para el cálculo de la concentración de estos azúcares presentes en las muestras. Los resultados del ensayo se resumen en el ANEXO 7.

3.2.2 Sensibilidad, exactitud y precisión. Estos parámetros fueron determinados separadamente para cada uno de los tres carbohidratos en estudio.

La sensibilidad de un método analítico según Quattrocchi *et al.* (1997) corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los límites de decisión y capacidad de detección definidos por ISO ($C_{c\alpha}$ y $C_{c\beta}$), no presentan una diferencia dramática entre sí.

La precisión esta relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, la exactitud de un método o error sistemático corresponde al valor medio obtenido comparado con el valor verdadero o valor aceptado, estos parámetros se presentan en el Cuadro 2. Todos los valores obtenidos son aceptables para un método validado.

Cuadro 2. Características analíticas de la metodología para la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa.

Parámetros	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
Límite de decisión $C_{c\alpha}$ (ppm)	450,53	366,53	283,78
Capacidad de detección $C_{c\beta}$ (ppm)	475,01	395,56	306,93
Exactitud (%)	102,1	99,0	91,5
Precisión (%)	3,8	7,4	5,7

3.3 Métodos de extracción

En este estudio se desarrollaron dos métodos de extracción, uno para diversas matrices orgánicas que es un procedimiento para la extracción de pequeñas moléculas solubles que se ha usado habitualmente en la determinación de conservantes como ácido sórbico y benzoico por HPLC-UV/Vis en alimentos de origen vegetal, utilizando el reactivo de carrez. El segundo es el método oficial 977.20 propuesto por la AOAC, exclusivo para la extracción de azúcares en miel.

Ambos métodos fueron probados para efectuar la extracción de los carbohidratos presentes en las matrices sin realizar cambios.

Las dos técnicas de extracción fueron probadas, inyectando cada muestra por triplicado en el HPLC-IR, la primera (que utiliza el reactivo de carrez) demostró ser una técnica de extracción muy eficiente, obteniéndose una buena separación y definición de los picos, además al solapar los tres cromatogramas obtenidos se aprecia similitud entre las áreas de las muestras analizadas.

El método oficial de la AOAC 977.20 para extracción de azúcares en miel, manifestó una formación de dos fases, esto produjo una serie de problemas en los cromatogramas mostrando diferencias significativas en las áreas de un misma matriz inyectada tres veces (Figura 5).

Por este motivo se puso a prueba en muestras de miel, el método que utiliza el reactivo de carrez, (ya que demostró ser eficaz en las matrices analizadas anteriormente), lográndose una extracción eficiente, obteniendo una matriz transparente y homogénea. Estas muestras inyectadas por triplicado en el HPLC-IR arrojaron cromatogramas con áreas muy similares (alta precisión). La Figura 6 presenta el cromatograma donde están superpuestas las tres muestras de miel, a las cuales se le aplicó el método mencionado anteriormente.

Con este resultado se decidió utilizar sin excepción el método que emplea el reactivo de carrez. Sin embargo, a esta técnica se le hicieron cambios a nivel de material instrumental, reducción en la cantidad de muestra y de reactivos. Así se logró tener un método que además de eficiente es de bajo costo, siendo beneficioso, ya que todos los solventes grado HPLC son de elevada pureza y alto valor económico.

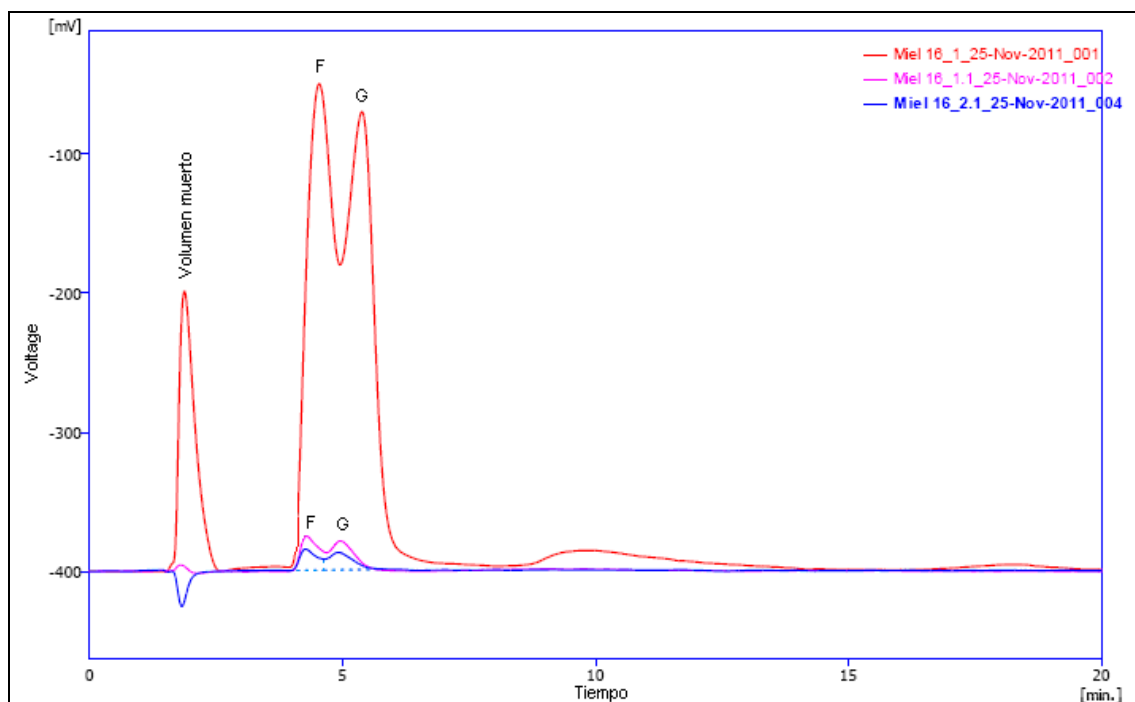


Figura 5. Cromatograma logrado al aplicar el método oficial de la AOAC 977.20 para extracción de azúcares en miel, donde se observa la diferencia entre las áreas de las muestras inyectadas por triplicado.

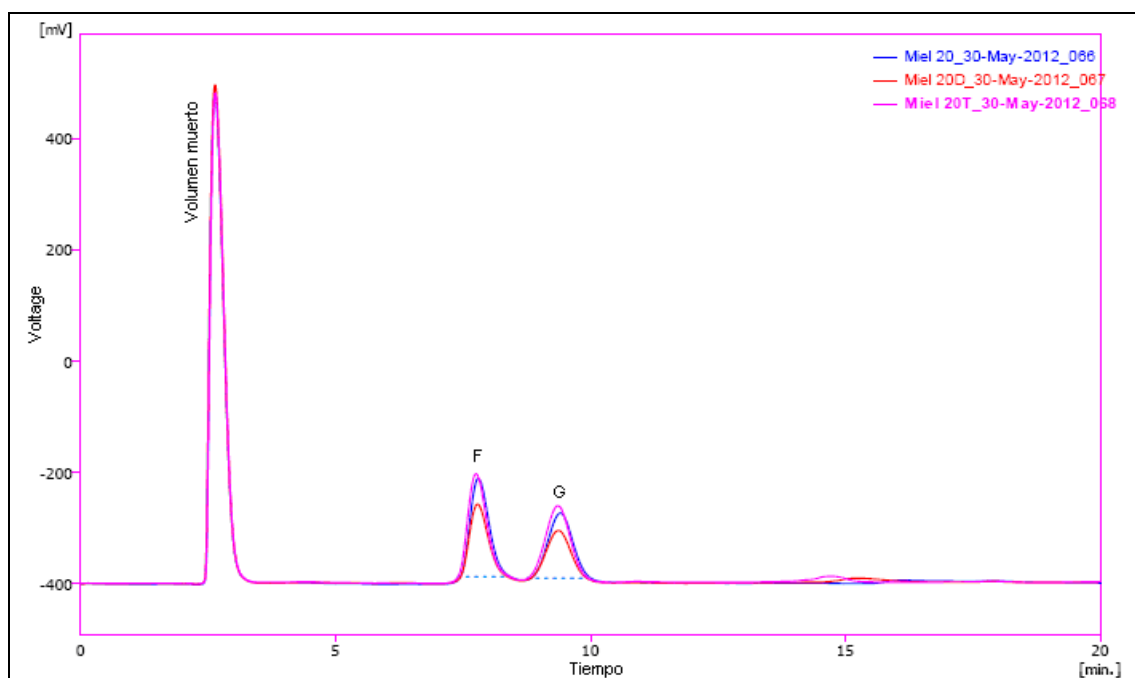


Figura 6. Cromatograma de muestra de miel, obtenido con el método que utiliza el reactivo de carrez para extracción de azúcares, donde se aprecia la baja diferencia entre las áreas de cada muestra inyectada.

3.4 Análisis cromatográficos de las muestras

Una vez validada la metodología, se comenzó a probar la técnica de extracción propuesta anteriormente, en diferentes matrices orgánicas, se realizaron pruebas de determinación de carbohidratos en miel, pan de abeja y complementos alimenticios para abeja, además de las materias primas para elaborar estos.

Se analizaron primero las materias primas utilizadas para elaborar los complementos alimenticios, luego las muestras de miel provenientes de tres regiones de Chile, posteriormente las de pan de abeja y para finalizar con este estudio los prototipos de los complementos alimenticios para abeja: calórico CO y proteico AO, además de la formulación optimizada de cada uno de ellos calórico final CF y proteico final AF.

3.4.1 Materias primas para la elaboración de complementos alimenticios para abeja. Se analizaron muestras correspondiente a las materias primas empleadas para elaborar el complemento para abeja, las cuales son: azúcar (sacarosa, utilizada como patrón), albumina de huevo, harina de lupino, harina de quínoa y levadura de cerveza en polvo, mostrando concentraciones variables de los carbohidratos analizados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de azúcares simples presentes en las materias primas utilizadas para la elaboración de los complementos para abeja.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Albúmina de huevo	0,15	0,70	0,00
Harina de Lupino	0,00	0,00	2,08
Harina de Quínoa	0,14	3,90	0,00
Levadura de Cerveza	0,00	0,00	0,00

3.4.2 Miel. Fueron analizadas veinte muestras de miel. CRANE (1975) afirma que los diferentes tipos de miel suelen tener los mismos azúcares, aunque en cantidades variables. Su porcentaje está relacionado con la flora y en una menor influencia con el clima y origen geográfico. En las muestras de miel analizadas en este estudio, se encontró la presencia de fructosa en un promedio de 47,58 g/100g, para glucosa un promedio de 44,25 g/100g y ausencia total de sacarosa, esto concuerda con los descrito por ALAMANNI (1994) que indica que los dos azúcares cuantitativamente predominantes en la miel son estos monosacáridos, que representan del 85 al 95% del total, estando la fructosa en mayor concentración con un 38% por término medio y la

glucosa con un 31%. Según WHITE (1975) sólo algunas excepciones como la miel de diente de león (*Leontodon autumnalis*, L) y de colza (*Brassica napus*, L) presentan un contenido en glucosa mayor que en fructosa. El valor medio de la relación Fructosa/Glucosa encontrado por WHITE (1978) fue de 1,2:1.

UREÑA *et al.* (2007), indican que el disacárido sacarosa puede encontrarse en alguna proporción debido a la incapacidad de las abejas de convertirla completamente. Sin embargo, este valor es bajo, con un contenido medio de 2,3%.

3.4.3 Pan de Abeja. CALZADA (2008), indica que el contenido total de azúcares y sustancias sacaríferas en pan de abeja se encuentra en el rango de 43-70% y para el ácido láctico 0,7-1,1%. Un contenido más alto de disacáridos en algunas muestras se caracteriza por la baja presencia de ácido láctico. De los azúcares la mayor parte son monosacáridos. En el pan de abejas hay 12,5-20,0% de fructosa, 18,5-29,0% de glucosa. Se detectan trazas de sacarosa. A su vez, en el pan de abejas la correlación de la fructosa/glucosa es de 0,63-0,72, es decir, predomina la glucosa.

No obstante los resultado obtenidos en esta memoria revelan que, en las 10 muestras de pan de abeja analizadas predomina la fructosa con un contenido promedio de 25,07 g/100g por sobre la glucosa la cual presenta una media de 18,32 g/100g y 0,71 g/100g de sacarosa. Esto es debido a que en el pan de abeja se registran diferencias en el contenido de carbohidratos, según el origen botánico y la temporada.

3.4.4 Complementos alimenticios para abeja. Se analizaron los dos prototipos de complementos alimenticios para abeja AO (10 muestras) y CO (17 muestras) que fueron elaborados en el laboratorio de análisis instrumental en el marco del proyecto CAPI_ID0904, con el fin de determinar si su contenido en azúcares era similar al de pan de abeja original que usan las abejas para su alimentación. En el Cuadro 4 se observan ambos alimentos los cuales presentan fructosa y glucosa, diferenciándose en su contenido. Siendo el alimento calórico el único que presenta el disacárido sacarosa.

Cuadro 4. Contenido de carbohidratos en prototipos de alimentos para abeja.

Prototipo	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Calórico CO	34,01	37,13	0,57
Proteico AO	21,41	24,60	0,00

Finalmente se creo una formulación optimizada para cada complemento alimenticio (CF y AF) estas fueron analizadas, presentando ambos prototipos fructosa y glucosa, sin embargo difieren en su contenido, puesto que el alimento calórico CF como es de esperar presenta valores más elevados y presencia de sacarosa, a diferencia del complemento proteico AF en el cual este disacárido esta ausente. En la Figura 7 se observa la clara diferencia entre las áreas de las muestras analizadas.

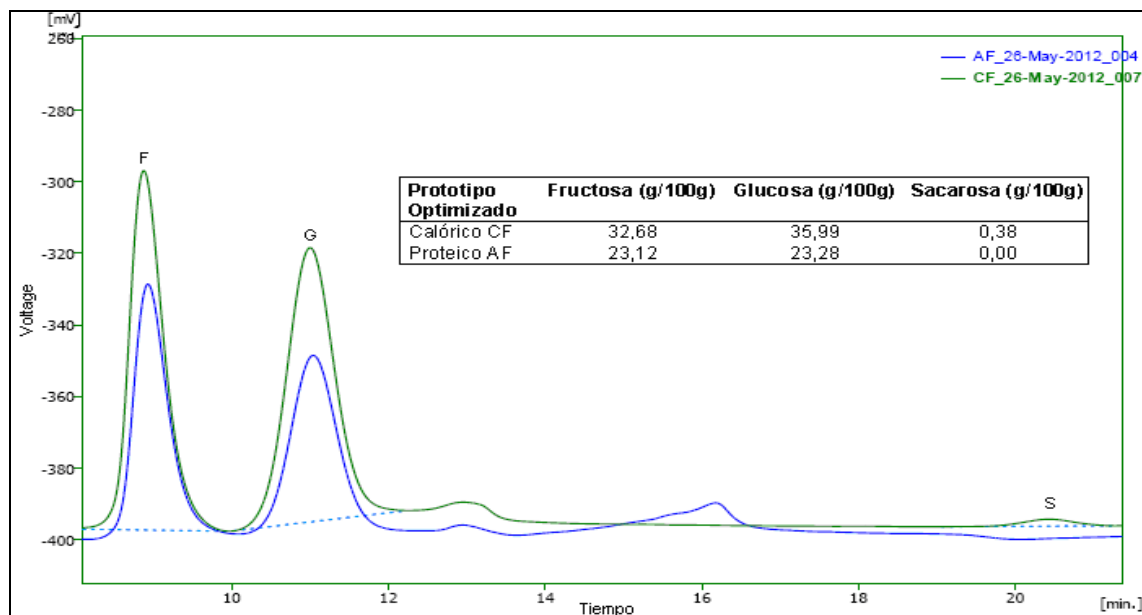


Figura 7. Comparación entre los cromatogramas de los prototipos de complemento alimenticio optimizados calórico CF y proteico AF, donde se aprecian la diferencia entre las áreas de los carbohidratos en estudio.

En definitiva la determinación y cuantificación de estos tres carbohidratos, permite hacer comparaciones entre los promedios obtenidos en las muestras analizadas.

Al observar el Cuadro 5 que compara los promedios de las muestras de miel y pan de abeja se aprecia una clara diferencia en el contenido de cada azúcar siendo siempre mayor en las muestras de miel. Sin embargo, es el pan de abeja quien muestra los tres analitos estudiados presentando una baja concentración de sacarosa.

Cuadro 5. Comparación en cuanto al contenido de carbohidratos de muestras de miel y pan de abeja.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Miel	47,58	44,25	0,00
Pan de Abeja	25,07	18,32	0,71

El Cuadro 6 muestra que los contenidos de fructosa y glucosas presentes en las muestras de miel son muy cercanos a los encontrados en la formulación optimizada del complemento alimenticio para abejas denominado calórico (CF). La diferencia entre ambas muestras, es que en miel hay ausencia de sacarosa.

Cuadro 6. Comparación en cuanto al contenido de azúcares simples en muestras de miel y complemento alimenticio para abeja calórico CF.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Miel	47,58	44,25	0,00
Calórico CF	32,68	35,99	0,38

Las muestras del complemento alimenticio proteico contiene fructosa y glucosa presentando similitudes con respecto a las de pan de abeja en cuanto a los niveles de estos monosacáridos esto se observa en el Cuadro 7, mostrándose ausencia de sacarosa en AF (complemento proteico optimizado) y trazas de esta azúcar en el pan de abeja con un promedio de 0,71 g/100g.

Cuadro 7. Comparación en cuanto al contenido de hidratos de carbono en muestras de complemento alimenticio proteico AF y pan de abeja.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Proteico AF	23,12	23,38	0,00
Pan de Abeja	25,07	18,32	0,71

3.5 Análisis Estadístico

Para llevar a cabo este análisis estadístico se compara cada variable dependiente: fructosa, glucosa y sacarosa con los 4 niveles diferentes de muestras: miel, pan de abeja, CO y AO.

Puesto que el análisis de varianza (ANOVA), no es aplicable debido a la no normalidad en los datos, lo cual viola el supuesto de que estos provienen de distribuciones normales (ANEXO 8). Por consiguiente es necesario aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3.5.1 Comparación de las muestras analizadas con respecto al monosacárido Fructosa. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para Fructosa, con el fin de determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras. La Figura 8, presenta a la variable dependiente fructosa versus el factor muestra expresado en un gráfico de caja y bigotes.

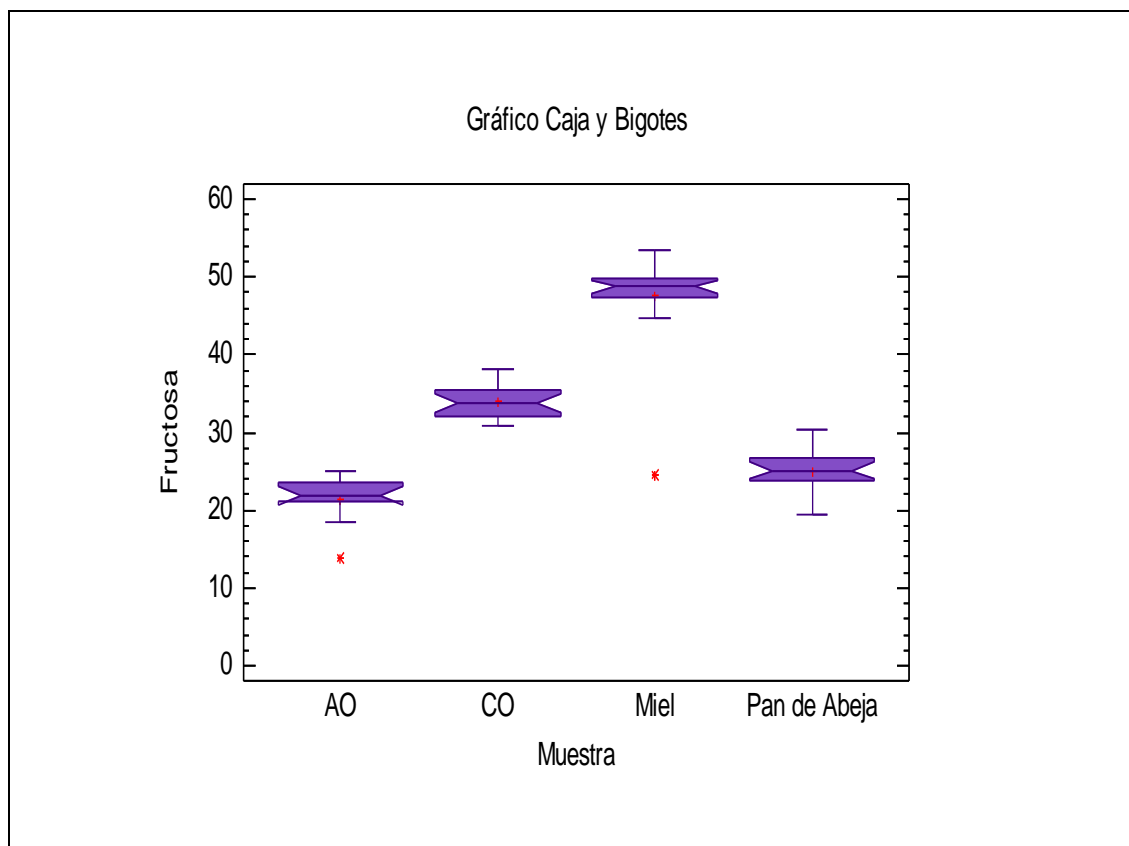


Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes que ilustra la comparación de concertación del carbohidrato Fructosa entre las distintas muestras (n=4).

Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis que indica, que las medianas de Fructosa dentro de cada uno de los 4 niveles de muestra son iguales. Se obtuvo un P-valor $< 0,05$, que indica una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de este analito con un nivel de confianza del 95,0%.

Al observar la gráfica, y ver que las cuatro cajas de cuartiles son pequeñas demuestra que hay una baja dispersión de los datos de concentración de éste monosacárido entre las mismas muestras. En la miel y complemento proteico AO se observan valores atípicos que son puntos por debajo del valor mínimo, estas son muestras que se escapan de rango (ANEXO 7).

3.5.2 Comparación de las muestras analizadas con respecto al monosacárido Glucosa. Al igual que en el análisis de fructosa se aplica la prueba de Kruskal-Wallis la cual evalúa la hipótesis de que las medianas de Glucosa dentro de cada uno de los 4 niveles de muestra son iguales.

Esta prueba arroja un P-valor $< 0,05$ lo que señala una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de este azúcar, debido a que no hay solapamiento entre muestras, con un nivel de confianza del 95,0%.

En la Figura 9 se muestran los resultados mediante una gráfica de cajas y bigotes.

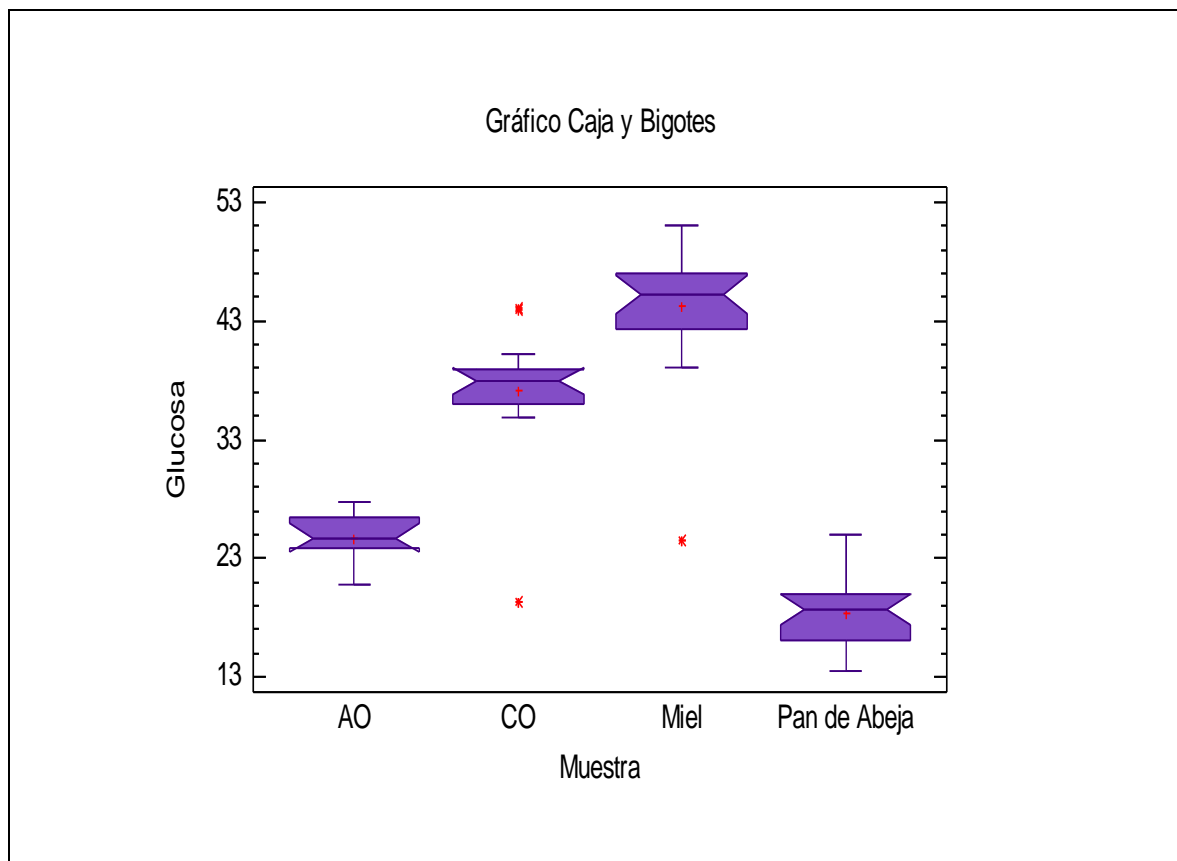


Figura 9. Gráfico de cajas y bigotes que expresa la comparación de concentración del carbohidrato Glucosa entre las distintas muestras (n=4).

Al observar las cajas de cuartiles de pan de abeja, complemento AO y CO con respecto a la muestra de miel, nos podemos dar cuenta que, esta última es la que presenta una caja más ancha lo que indica una mayor dispersión de los datos para el analito Glucosa.

3.5.3 Comparación de las muestras analizadas con respecto al disacárido Sacarosa. Se ejecuta la prueba Kruskal-Wallis, para expresar cuales medianas de Sacarosa son significativamente diferentes de otras. El programa presenta mediante un gráfico de caja y bigotes (Figura 10) a este analito contra el factor muestra.

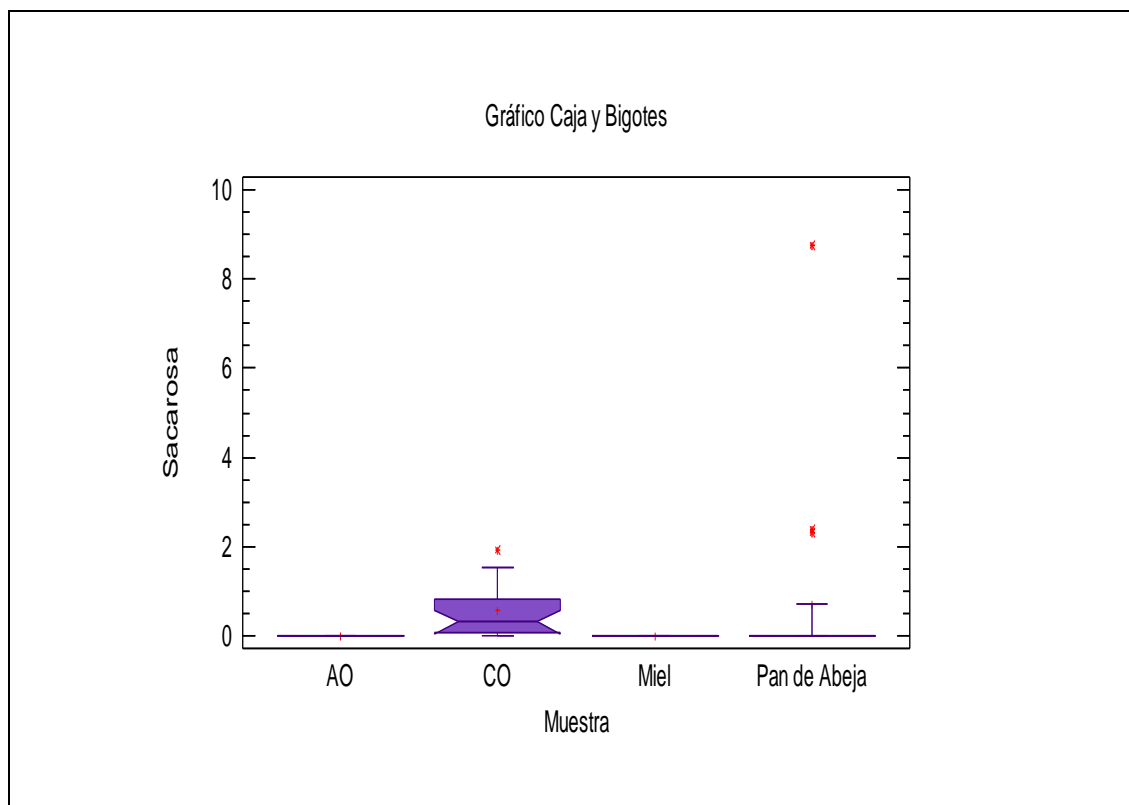


Figura 10. Gráfico de cajas y bigotes que ilustra la comparación de concertación del carbohidrato Sacarosa entre las distintas muestras (n=4).

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis que evalúa la hipótesis de que las medianas de Sacarosa dentro de cada uno de los 4 niveles de muestra son iguales, se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de este disacárido (P -valor $< 0,05$), con un nivel del 95,0% de confianza.

La Figura 10, muestra claramente que las muestras de miel y AO no contienen el carbohidrato sacarosa.

Con respecto al prototipo calórico CO, éste presenta contenidos del disacárido en estudio. Siendo su caja de cuartiles muy compacta mostrando una baja dispersión en los datos de concentración de este azúcar en las muestras analizadas.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó y cuantificó de forma simultánea tres azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa presentes en matrices orgánicas mediante HPLC acoplada a un detector de índice de refracción IR.
- Se logró desarrollar y validar un método de extracción, separación y cuantificación para los tres analitos en estudio. Los parámetros analíticos C_{α} , C_{β} , precisión y exactitud fueron adecuados, para los fines requeridos.
- Se encontró fructosa y glucosa en todas las muestras analizadas (miel, pan de abeja y en las dos formulaciones optimizadas de complemento alimenticio para abejas AF y CF) estos contenidos oscilan dentro de un rango de 23,1 - 47,5 g/100g para fructosa y 18,3 - 44,3 g/100g para glucosa.
- En cuanto al disacárido sacarosa este se encontraba completamente ausente en las muestras de miel y en el complemento alimenticio para abejas denominado proteico AF, sin embargo, en el pan de abeja se encontró un contenido de 0,71g/100g y en el complemento alimenticio calórico CF contenidos de 0,38 g/100g.
- Finalmente, la metodología implementada y validada en este estudio demostró ser una técnica rápida y eficiente en la determinación de Fructosa, Glucosa y Sacarosa, además de tener un bajo costo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMANNI, M.C.1994. Determinazione enzimatica di glucosio, fruttosio e saccarosio e ricerca di polisaccaridi del mais in campioni di miele. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 23 (1): 81-86.
- AOAC. 1990. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th edition. Washington, DC. Methods: Official method: 977.20.
- BIANCHI, E.1990. Control de calidad de la miel y cera. Centro de Investigaciones Apícolas. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina. 69 p.
- BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie* 1. 59.
- CALZADA, C. 2008. Todo sobre la miel. El pan de abeja. (On line). <<http://www.todomiel.net/pdf/archivos/El-pan-de-abeja>> (10 dic. 2011).
- CORNEJO, L.1993. *Apicultura práctica en América Latina*. Roma. 167 p. (Boletín de servicios agrícolas de la FAO).
- CRANE, E.1990. *Bees and Beekeeping: Practice and world resources*. New York, Cornell University Press. 614 p.
- CRANE, E.1975. *Honey: A comprehensive survey*. International Bee Research Association (IBRA). Londres, Heinemann. 38 p.
- CHENG, C.; TSAI, K.; CHANG, J. 2006. On-line cut-off technique and organic modifier addition aided signal enhancement for trace analysis of carbohydrates in and the honey bee. *Hamilton, Illions*. 125-156 p.
- Chile, Instituto Nacional de Normalización (INN). (2007). Norma chilena. Miel de abejas- Determinación del contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa- Método HPLC con detector IR. NCh574.cR2006. Santiago, Chile.
- DIETZ. A. 1975. Nutrition of the adult honey bee. The hive cellulase hydrolysate by ion exclusion chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Chromatographic* 1119: 188 – 196.
- GIL, A. 2010. *Tratado de Nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Tomo II.2ª Edición. Madrid, Medica Panamericana. 232-234p
- GOMEZ, J.; GARCIA, R.; ELVIRA, S.; GONZALVEZ, A.1999. Optimization of the capillary gas chromatography analysis of mono – and oligosaccharides in honeys. *Chromatographia*. 50: 461 – 469.
- HERBERT, E.; SHIMANUKI, H.; CARON, D. 1977. Optimum proteins levels required by honey bees (Hymenoptera, Apida) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie* 8 (2):141-146.
- HUIDOBRO, J.F.; SIMAL, J. 1984. Determinación del color y la turbidez en las mieles. *Anal Bromatol* 36 (2):225-245.
- JEAN – PROST, P. 1995. *Apicultura*. Madrid, Mundi – Prensa. 741 p.
- LEHNINGER, A. L. 1995. *Principios de Bioquímica*. 2ª Ed. Barcelona, Omega. 1013 p.

- MEDEIROS, P.; SIMONEIT, B. 2007. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1141: 271 – 278.
- PERSANO, L.; GIOJA, M.; PULCINI, P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie* 30 (1):57 – 65.
- QUATTROCCHI, O.; ADELAIIRA de ANDRIZZI, S.; LABA, R.1992. Introducción a la HPLC; aplicación y práctica. Argentina, Graficas Faro. 407p.
- STANDIFER, L. N.; MOELLER, F. E.; KAUFFELD, N. M.; HERBERT Jr., E. W ; SHIMANUKI, H. 1977. Supplemental feeding of honey bee colonies. United States Department of Agriculture. *Agriculture Information Bulletin* 413: 8.
- SIMONEIT, B.; ELIAS, V.; KOBAYASHI M.; KAWAMURA, K.; RUSHDI, A.; MEDEIROS, P.; ROGGE, W.; DIDYK, B. 2004. Sugars – dominant water – soluble organic compounds in soils and characterization as traces in atmospheric particulate matter. *Environ Science Technology* 38(22): 5939 – 5949.
- SHIMANUKI, H. 1977. Supplemental feeding of honey bee colonies. United States Department of Agriculture. *Agriculture Information Bulletin* 413: 8.
- SKOOG, D. 2001. Principios de análisis instrumental. 5ª. Ed. Madrid, McGraw-Hill. 1028 p.
- TEIJON, M.2001. Bioquímica estructural. España, Tébar.340 p.
- UREÑA, M.; VARELA, E.; ARRIETA D.; UMAÑA, E.; ZAMORA, L.; ARIAS, M. 2007. Evaluación de las posibles adulteraciones en miel de abeja comerciales de origen costarricense al compararlas con mieles artesanales provenientes de apiarios específicos. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 57(12007). 68.
- WHITE, J. 1975. Honey. A Comprehensive survey. London, Heinemann. 157 – 206 p.
- WHITE, J. 1975. The hive and the honey bee. Hamilton, Dadant & Sons. 491 – 530 p.
- WHITE, J. 1978. Honey. *Advances in food research* 24: 287-374.

6. ANEXOS

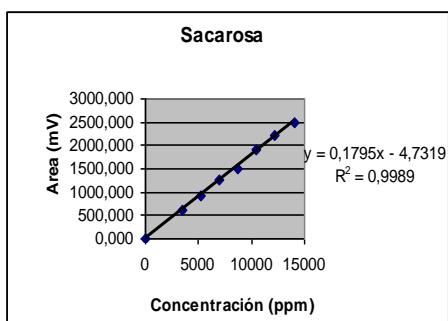
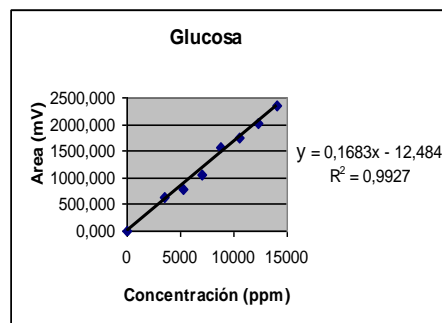
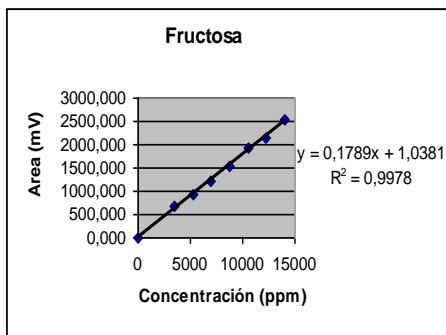
ANEXO 1. Fotografías del equipo utilizado en la determinación de carbohidratos.



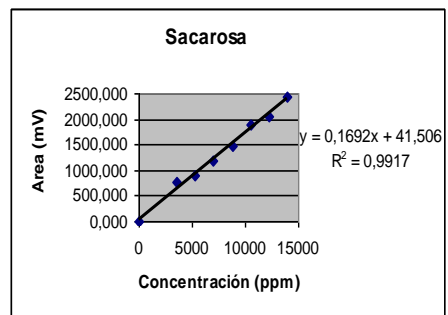
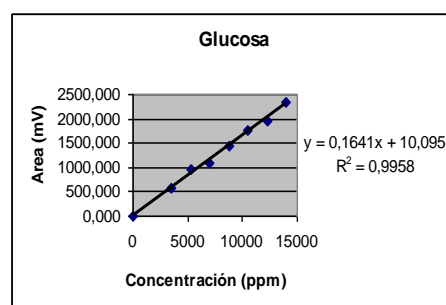
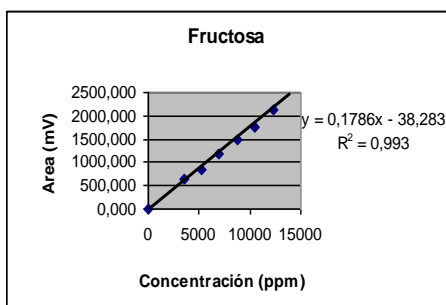
Determinación de azúcares simples: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de índice de refracción HPLC-IR.

Anexo 2. Curvas de Calibración de azúcares simples: Fructosa, Glucosa y Sacarosa.

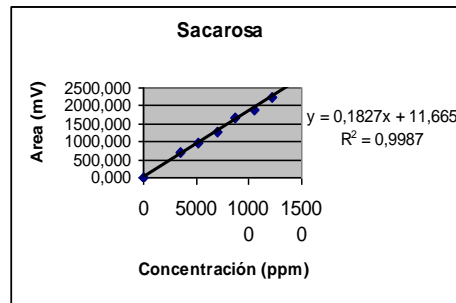
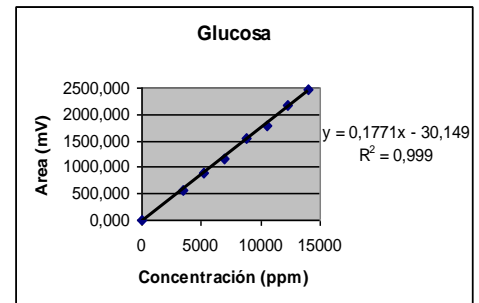
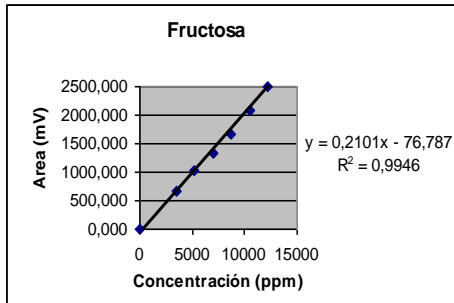
Curva 1.



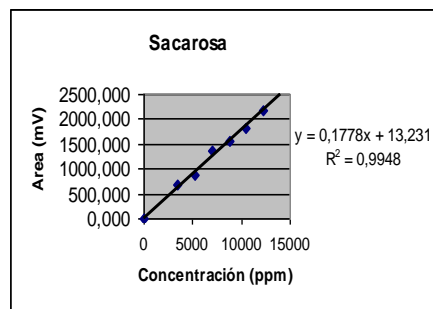
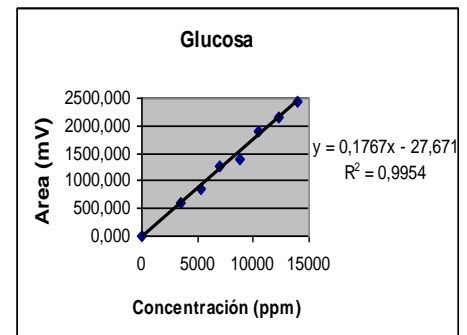
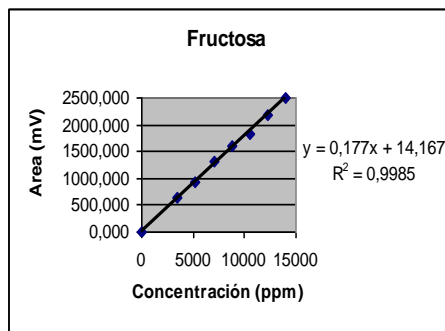
Curva 2.



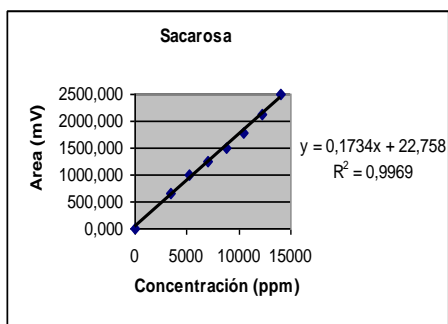
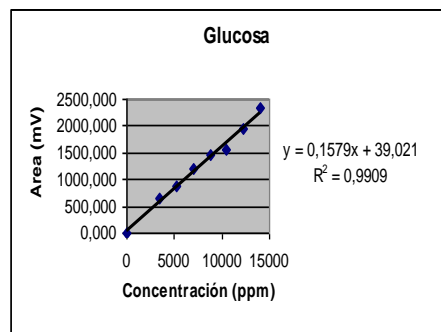
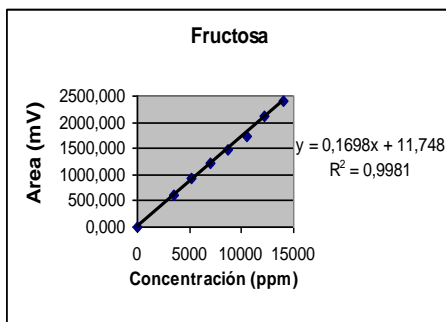
Curva 3.



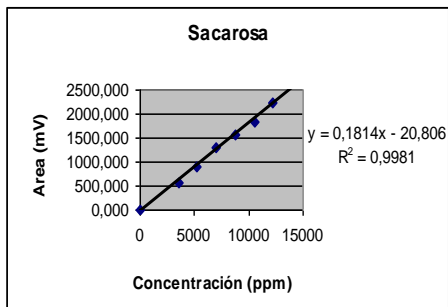
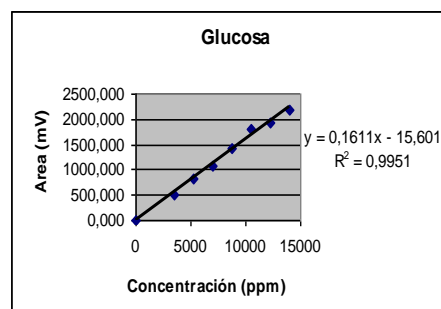
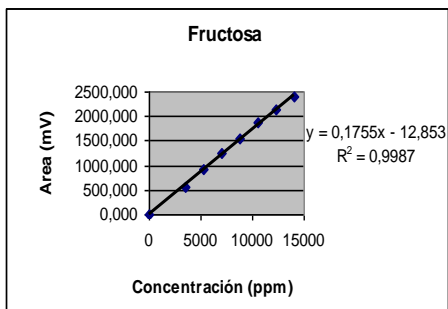
Curva 4.



Curva 5.



Curva 6.



Anexo 3. Curvas Promedio.

Curva promedio para Fructosa.

Concentración (ppm)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3500	670,866	648,780	661,355	632,993	622,667	550,929
5250	926,335	840,065	1025,371	913,667	914,846	908,806
7000	1221,778	1184,102	1331,810	1306,700	1227,897	1234,331
8750	1538,951	1500,613	1664,039	1605,701	1486,625	1538,224
10500	1918,766	1753,230	2085,059	1840,269	1718,983	1861,755
12250	2137,102	2115,783	2495,061	2166,557	2107,885	2150,120
14000	2551,491	2589,210	2989,531	2486,741	2418,195	2402,089
Pendiente	0,179	0,179	0,210	0,177	0,170	0,175
Intercepto	1,038	-38,283	-76,787	14,167	11,748	-12,853
R	0,999	0,996	0,997	0,999	0,999	0,999

Pendiente	0,182
Intercepto	-16,828
R	0,998

Curva promedio para Glucosa.

Concentración (ppm)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3500	635,347	570,135	573,770	586,098	634,973	505,153
5250	795,414	947,908	896,756	860,261	879,894	822,409
7000	1068,979	1090,579	1174,445	1260,085	1189,727	1090,199
8750	1570,09	1457,620	1535,612	1405,000	1466,883	1412,141
10500	1761,905	1774,415	1794,244	1887,324	1555,164	1791,415
12250	2020,025	1955,176	2165,111	2159,402	1935,237	1934,503
14000	2358,006	2333,462	2463,843	2443,072	2324,302	2187,526
Pendiente	0,168	0,164	0,177	0,177	0,158	0,161
Intercepto	-12,484	10,095	-30,149	-27,671	39,021	-15,601
R	0,996	0,998	1,000	0,998	0,995	0,998

Pendiente	0,168
Intercepto	-6,131
R	0,997

Curva promedio para Sacarosa.

Concentración (ppm)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3500	624,824	760,359	693,228	674,463	657,597	580,182
5250	927,145	888,270	964,026	861,573	987,337	911,697
7000	1278,268	1191,362	1250,875	1372,181	1245,758	1314,353
8750	1511,147	1458,603	1645,848	1548,929	1487,633	1551,405
10500	1899,738	1902,663	1896,379	1831,982	1788,037	1832,683
12250	2223,957	2051,423	2243,208	2186,811	2126,832	2219,488
14000	2493,357	2442,021	2589,859	2519,558	2512,108	2532,577
Pendiente	0,180	0,169	0,183	0,178	0,173	0,181
Intercepto	-4,732	41,506	11,665	13,231	22,758	-20,806
R	0,999	0,996	0,999	0,997	0,998	0,999

Pendiente	0,177
Intercepto	10,604
R	0,998

Anexo 4. Límite de decisión Cca para Fructosa, Glucosa y Sacarosa.

Formulas para calcular el límite de decisión Cca

$$\text{Cca (área)} = \text{Promedio de los interceptos en área} + (2,33 * \text{D. Estándar de los interceptos})$$

$$\text{Cca (concentración)} = (\text{Cca área} - \text{Promedio intercepto}) / \text{Promedio pendiente}$$

Límite de decisión Cca para Fructosa.

Compuesto	R ² (%)	Error estándar	Intercepto	Pendiente
Fructosa1	99,7841	41,9804	1,03809	0,17889
Fructosa2	99,2972	75,805	-38,2831	0,17858
Fructosa3	99,4564	78,3567	-76,7874	0,210066
Fructosa4	99,8515	34,4298	14,1675	0,176968
Fructosa5	99,8128	37,1148	11,7483	0,169847
Fructosa6	99,8672	32,2891	-12,8534	0,175495
Promedio	99,6782	49,99596667	-16,828335	0,181641
Des. Estándar	0,24060012	21,24358648	35,1219918	0,01430823

Cca	65,006
Concentración (ppm)	450,527

Límite de decisión Cca para Glucosa.

Compuesto	R ² (%)	Error estándar	Intercepto	Pendiente
Glucosa1	99,2689	72,8841	-12,4835	0,168321
Glucosa2	99,5753	54,0614	10,095	0,164058
Glucosa3	99,9003	28,2154	-30,1494	0,177061
Glucosa4	99,5429	60,4128	-27,671	0,176696
Glucosa5	99,0931	76,2372	39,0205	0,157943
Glucosa6	99,5086	57,1252	-15,6005	0,161113
Promedio	99,4815167	58,15601667	-6,1314833	0,167532
Des. Estándar	0,27739847	17,10676881	26,3545892	0,0080078

Cca	55,275
Concentración (ppm)	366,534

Límite de decisión C_{ca} para Sacarosa.

Compuesto	R² (%)	Error estándar	Intercepto	Pendiente
Sacarosa1	99,8918	29,8138	-4,73195	0,179531
Sacarosa2	99,1653	78,3151	41,5059	0,169186
Sacarosa3	99,8749	32,6232	11,6647	0,182696
Sacarosa4	99,484	64,6061	13,2312	0,17779
Sacarosa5	99,6886	48,9109	22,7579	0,173441
Sacarosa6	99,809	40,0332	-20,8061	0,181369
Promedio	99,6522667	49,05038333	10,6036083	0,1773355
Des. Estándar	0,28223305	19,07685249	21,5984153	0,00513054

C_{ca}	60,928
Concentración (ppm)	283,780

Anexo 5. Capacidad de detección Cc β para Fructosa, Glucosa y Sacarosa.

Fructosa	Área	Glucosa	Área	Sacarosa	Área
1	44,78	1	98,20	1	33,45
2	42,47	2	94,53	2	39,57
3	42,22	3	95,63	3	33,21
4	46,80	4	99,86	4	34,78
5	49,20	5	96,02	5	30,96
6	47,55	6	91,44	6	31,08
7	43,03	7	90,12	7	35,72
8	48,55	8	97,72	8	32,30
9	49,97	9	92,25	9	32,20
10	41,23	10	92,81	10	33,38
11	44,90	11	97,10	11	36,96
12	46,58	12	93,32	12	37,72
13	46,21	13	96,22	13	31,76
14	45,67	14	90,54	14	31,00
15	40,46	15	92,14	15	36,03
16	44,93	16	90,67	16	32,89
17	43,66	17	94,53	17	34,06
18	45,79	18	92,63	18	37,21
19	42,16	19	98,38	19	33,11
20	48,05	20	97,36	20	35,12
Promedio	45,06	Promedio	94,43	Promedio	34,07
Desv. Estándar	2,71	Desv. Estándar	2,97	Desv. Estándar	2,50
Cv	0,06	Cv	0,03	Cv	0,07
Pendiente	0,25	Pendiente	0,23	Pendiente	0,25
Intercepto	-16,83	Intercepto	-6,13	Intercepto	10,60

Ccα (mV)	65,006	Ccα (mV)	55,27	Ccα (mV)	60,93
Ccα (ppm)	450,527	Ccα (ppm)	366,53	Ccα (ppm)	283,78

Ccβ (mV)	69,455	Ccβ (mV)	60,14	Ccβ (mV)	65,03
Ccβ (ppm)	475,019	Ccβ (ppm)	395,56	Ccβ (ppm)	306,93

Anexo 6. Exactitud y precisión.

Muestra fortificada con los analitos: Fructosa, Glucosa y Sacarosa.

Muestras	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
M1 Enriquecida	266,19	389,246	695,337
M2 Enriquecida	282,859	399,902	653,964
M3 Enriquecida	264,303	346,909	620,083
Promedio	271,117	378,6857	656,461
Des. Estándar	10,212	28,030	37,689
CV	0,038	0,074	0,057

Muestra de referencia.

Muestras	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
M1 Referencia	11,27	128,166	481,769
M2 Referencia	8,721	116,356	395,008
M3 Referencia	9,498	163,782	330,875
Promedio	9,830	136,101	402,551

Promedio (Área)	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
Promedio M Enriquecida	271,1	378,7	656,5
Promedio M Referencia	9,8	136,1	402,6
Diferencia	261,3	242,6	253,9

Promedio (Concentración ppm)	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
M Enriquecida (µg/ml)	1585,2	2297,0	3642,0
M Referencia (µg/ml)	146,8	849,0	2210,2
Diferencia	1531,1	1484,6	1372,0

µg/g	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
M Enriquecida	31704,9	45939,6	72840,2
M Referencia	2935,2	16979,8	44204,0
Diferencia	30622,616	29691,7821	27440,3206

Porcentaje de Recuperación o Exactitud.

%R (30000)	102,1	99,0	91,5
-------------------	--------------	-------------	-------------

Porcentaje de coeficiente de variación o Precisión.

% CV	3,8	7,4	5,7
-------------	------------	------------	------------

Anexo 7. Resumen y presentación de la cuantificación de las muestras expresadas en g/100g.

Cuantificación de materias primas para la elaboración de sucedáneo de pan de abeja.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Albumina	0,15	0,70	0,00
Harina de Lupino	0,00	0,00	2,08
Harina de Quínoa	0,14	3,90	0,00
Levadura de Cerveza	0,00	0,00	0,00

Cuantificación muestras de Miel.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Miel 1	49,89	46,50	0,00
Miel 2	49,42	48,86	0,00
Miel 3	50,93	39,07	0,00
Miel 4	49,18	42,08	0,00
Miel 5	50,04	41,50	0,00
Miel 6	49,89	47,22	0,00
Miel 7	48,02	50,39	0,00
Miel 8	49,26	45,36	0,00
Miel 9	48,24	44,71	0,00
Miel 10	53,33	42,51	0,00
Miel 11	46,84	44,97	0,00
Miel 12	44,78	45,61	0,00
Miel 13	48,07	46,84	0,00
Miel 14	24,61	24,46	0,00
Miel 15	49,37	40,82	0,00
Miel 16	46,04	48,36	0,00
Miel 17	51,62	46,59	0,00
Miel 18	47,42	43,88	0,00
Miel 19	47,25	51,00	0,00
Miel 20	47,50	44,24	0,00
Promedio	47,58	44,25	0,00

Cuantificación muestras de Pan de Abeja.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
Pan de Abeja 1	19,52	16,12	0,00
Pan de Abeja 2	28,02	20,86	0,00
Pan de Abeja 3	25,32	18,04	0,00
Pan de Abeja 4	24,91	19,32	0,00
Pan de Abeja 5	26,28	18,57	2,37
Pan de Abeja 6	22,53	15,01	2,32
Pan de Abeja 7	21,21	19,92	8,77
Pan de Abeja 8	25,62	13,44	0,00
Pan de Abeja 9	20,79	13,62	0,00
Pan de Abeja 10	23,71	15,79	0,00
Pan de Abeja 11	24,30	18,67	0,00
Pan de Abeja 12	25,06	17,20	0,00
Pan de Abeja 13	29,75	24,98	0,00
Pan de Abeja 14	24,98	19,39	0,00
Pan de Abeja 15	27,32	21,27	0,00
Pan de Abeja 16	25,26	19,94	0,00
Pan de Abeja 17	26,81	17,68	0,00
Pan de Abeja 18	24,64	19,09	0,00
Pan de Abeja 19	30,28	19,12	0,00
Promedio	25,07	18,32	0,71

Cuantificación de Sucedáneo Proteico AO.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
AO 1	23,57	26,47	0,00
AO 2	24,93	27,40	0,00
AO 3	21,75	23,93	0,00
AO 4	22,78	25,14	0,00
AO 5	21,72	24,30	0,00
AO 6	22,03	25,10	0,00
AO 7	21,12	24,06	0,00
AO 8	13,93	21,03	0,00
AO 9	18,45	20,85	0,00
AO 10	23,82	27,69	0,00
Promedio	21,41	24,60	0,00

Cuantificación de Sucedáneo Calórico CO.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
CO 1	34,17	38,57	1,53
CO 2	37,31	39,99	0,18
CO 3	33,75	35,36	0,80
CO 4	32,01	36,40	1,28
CO 5	37,48	44,05	1,21
CO 6	32,01	37,93	0,57
CO 7	30,78	34,88	0,80
CO 8	32,14	35,20	0,76
CO 9	35,37	40,16	0,07
CO 10	33,55	38,87	0,14
CO 11	38,23	43,87	0,00
CO 12	33,77	19,38	0,04
CO 13	31,18	36,00	1,93
CO 14	32,20	36,75	0,30
CO 15	35,34	38,26	0,08
CO 16	34,69	38,49	0,00
CO 17	34,11	37,09	0,08
Promedio	34,01	37,13	0,57

Cuantificación del Prototipo optimizado de Sucedáneo Proteico final AF.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
A F	23,12	23,38	0,00

Cuantificación del Prototipo optimizado de Sucedáneo Calórico final CF.

Muestra	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)
C F	32,68	35,99	0,38

ANEXO 8. Análisis estadístico.

ANOVA Simple – Fructosa por Muestras.

Resumen Estadístico para Fructosa

Muestra	Recuento	Promedio	Des. Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
AO	10	21,41	3,16462	14,781%	13,93	24,93	11,0
CO	17	34,0053	2,21369	6,50985%	30,78	38,23	7,45
Miel	20	47,585	5,75231	12,0885%	24,61	53,33	28,72
Pan de Abeja	19	25,0689	2,7972	11,158%	19,52	30,28	10,76
Total	66	33,6394	10,8989	32,3993%	13,93	53,33	39,4

Muestra	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
AO	-2,11536	2,00286
CO	0,815568	-0,470696
Miel	-6,61935	13,6519
Pan de Abeja	-0,190088	0,0701903
Total	1,27279	-2,02424

Cuadro ANOVA para Fructosa por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6783,05	3	2261,02	149,44	0,0000
Intra grupos	938,07	62	15,1302		
Total (Corr.)	7721,12	65			

Prueba de Kruskal-Wallis para Fructosa por Muestra

Muestra	Tamaño Muestra	Rango Promedio
AO	10	8,8
CO	17	39,0
Miel	20	54,95
Pan de Abeja	19	19,0

Estadístico = 53,766 Valor-P = 1,25868E-11

ANOVA Simple - Glucosa por Muestras

Resumen Estadístico para Glucosa

Muestra	Recuento	Promedio	Des. Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
AO	10	24,597	2,33487	9,49248%	20,85	27,69	6,84
CO	17	37,1324	5,29434	14,258%	19,38	44,05	24,67
Miel	20	44,2485	5,60527	12,6677%	24,46	51,0	26,54
Pan de Abeja	19	18,3174	2,76988	15,1216%	13,44	24,98	11,54
Total	66	31,973	11,6262	36,3626%	13,44	51,0	37,56

Muestra	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
AO	-0,563464	-0,312296
CO	-3,95294	7,05702
Miel	-4,35597	7,37126
Pan de Abeja	0,339644	0,742705
Total	-0,099232	-2,53598

Cuadro ANOVA para Glucosa por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7553,38	3	2517,79	126,64	0,0000
Intra grupos	1232,61	62	19,8808		
Total (Corr.)	8785,99	65			

Prueba de Kruskal-Wallis para Glucosa por Muestra

Muestra	Tamaño Muestra	Rango Promedio
AO	10	25,2
CO	17	38,7647
Miel	20	54,75
Pan de Abeja	19	10,7895

Estadístico = 54,2495 Valor-P = 9,92673E-12

ANOVA Simple - Sacarosa por Muestra

Resumen Estadístico para Sacarosa

Muestra	Recuento	Promedio	Des. Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
AO	10	0,0	0,0	%	0,0	0,0	0,0
CO	17	0,574706	0,607105	105,638%	0,0	1,93	1,93
Miel	20	0,0	0,0	%	0,0	0,0	0,0
Pan de Abeja	19	0,708421	2,08669	294,555%	0,0	8,77	8,77
Total	66	0,35197	1,18483	336,628%	0,0	8,77	8,77

Muestra	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
AO		
CO	1,56128	-0,158872
Miel		
Pan de Abeja	6,4087	12,2712
Total	19,5328	66,6787

Cuadro ANOVA para Sacarosa por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,97397	3	2,32466	1,71	0,1741
Intra grupos	84,2741	62	1,35926		
Total (Corr.)	91,248	65			

Prueba de Kruskal-Wallis para Sacarosa por Muestra

Muestra	Tamaño Muestra	Rango Promedio
AO	10	24,5
CO	17	52,2941
Miel	20	24,5
Pan de Abeja	19	30,8947

Estadístico = 37,7651 Valor-P = 3,16931E-8

