



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

TÍTULO:

“Optimización de un método de HPLC con detección mediante Índice de Refracción para la cuantificación de carbohidratos solubles en forrajes”

AUTOR:

Patricia Abásolo Linares

Julio 2014, Oviedo



Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

Universidad de Oviedo

Dra. Dña. Ana Belén Soldado Cabezuelo y Dra. Dña. Adela Martínez Fernández del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).

CERTIFICAN:

Que Doña Patricia Abásolo Linares ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster, al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo.

Oviedo, 25 de Junio de 2014

Fdo.: Ana B. Soldado Cabezuelo

Investigadora del Área de Nutrición,
Pastos y Forrajes

Fdo.: Adela Martínez Fernández

Investigadora del Área de Nutrición,
Pastos y Forrajes

Jose Manuel Costa Fernández
Tutor de la Universidad de Oviedo

Trabajo financiado por el proyecto:
INIA RTA2012-00065-C05-01, cofinanciado con fondos FEDER

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no se habría podido llevar a cabo sin la ayuda y colaboración de mucha gente que me ha apoyado y me ha brindado su conocimiento.

Especialmente a mis directoras de proyecto, la Dra. Ana Soldado por ser tan optimista, ayudarme y apoyarme en cada momento del desarrollo de este trabajo y hacer posible que saliera adelante, y a la Dra. Adela Martínez por sus sugerencias y correcciones que han sido fundamentales en la elaboración del trabajo.

A todos los miembros del departamento de nutrición, pastos y forrajes del SERIDA, gracias por hacerme pasar un tiempo tan agradable. En especial a Mara, “la sufridora de los azúcares”, por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mis padres por su apoyo y por haberme dado de nuevo la oportunidad de realizar este año de estudios en Oviedo.

A mi abuela por su confianza en mí y en mis posibilidades.

A mis amigos de Oviedo, en especial a mis compañeros de piso, y a mis amigas que siguen en la distancia después de seis años, GRACIAS.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS

II. ÍNDICE DE TABLAS

III. ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. FORRAJES.....	1
1.1.1. CARACTERIZACIÓN DE FORRAJES Y ENSILADOS	3
1.1.2. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES	6
1.1.3. MÉTODOLOGÍA CLÁSICA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES	7
1.2. LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA: ASPECTOS GENERALES	10
1.3. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS	11
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. INSTRUMENTACIÓN.....	14
3.2. REACTIVOS	15
3.3. MUESTRAS	17
3.4. PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ESTUDIADA	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	20
4.1.1. EFECTO DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL	25
4.1.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA	27
4.1.3. EFECTO DE LA POLARIDAD DE LA FASE MÓVIL	30
4.2. ADECUACIÓN DE LOS PATRONES A LOS CONTENIDOS EN CARBOHIDRATOS DE MUESTRAS DE FORRAJES	34
4.2.1. DESARROLLO DE UN CALIBRADO DE MEDIDA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES	34
4.2.2. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS	37
4.2.2.1. Alternativa 1 (A1)	37
4.2.2.2. Alternativa 2 (A2)	44
4.2.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE FORRAJES.....	46
5. CONCLUSIONES	50
6. BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO I: CONTINUACIÓN PARA FUTUROS TRABAJOS	55

I. ABREVIATURAS

A1	Alternativa 1
A2	Alternativa 2
ACN	Acetonitrilo
CHS	Carbohidratos solubles
CT	Capacidad tampón
CV	Coefficiente de variación
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía líquida de alta eficacia
IR	Índice de Refracción
k'	Factor de capacidad
MS	Materia seca
N	Nº de platos teóricos (Eficacia)
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PNT	Protocolo Normalizado de Trabajo
Rs	Resolución
T^a	Temperatura
t_m	Tiempo muerto
t_r	Tiempo de retención
w	Anchura de pico cromatográfico

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

- 1.1. Intervalos de los diferentes parámetros que definen la ensilabilidad de un forraje
- 1.2. Calidad de los ensilados en función de los parámetros de fermentación
- 1.3. Intervalos de materia seca, carbohidratos solubles y capacidad tampón de los diferentes forrajes que integran la población
- 3.1. Condiciones cromatográficas a estudiar para la optimización del proceso de separación de carbohidratos
- 4.1. Concentración de los patrones de carbohidratos inyectados inicialmente
- 4.2. Tiempos de retención obtenidos al analizar los carbohidratos en las condiciones cromatográficas recomendadas por el fabricante de la columna
- 4.3. Concentración de los carbohidratos en la mezcla multipatrón inyectada
- 4.4. Parámetros cromatográficos para cada uno de los flujos de fase móvil ensayados
- 4.5. Resolución (Rs) de los carbohidratos de medida a los diferentes flujos de fase móvil ensayados
- 4.6. Parámetros cromatográficos para cada una de las temperaturas de columna ensayadas
- 4.7. Resolución (Rs) de los carbohidratos de medida a las diferentes temperaturas de columna ensayadas
- 4.8. Parámetros cromatográficos para cada una de las composiciones de fase móvil ensayadas
- 4.9. Resolución (Rs) de los carbohidratos de medida a las diferentes composiciones de fase móvil ensayadas
- 4.10. Concentración de los patrones de los diferentes carbohidratos con resolución superior a 1
- 4.11. Estudio comparativo de la exactitud entre las diferentes metodologías ensayadas en una muestra de ray-grass deshidratado
- 4.12. Estudio comparativo de la reproducibilidad entre las diferentes metodologías ensayadas en muestra de ray-grass deshidratado
- 4.13. Estudio comparativo de la reproducibilidad entre las diferentes metodologías ensayadas en muestra de forraje verde prehenificado
- 4.14. Estudio comparativo de la reproducibilidad entre las diferentes metodologías ensayadas en muestra de haba forrajera prehenificada
- A.I. Evaluación de la exactitud y la reproducibilidad en muestras de pienso de lechones

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

- 1.1. Esquema del procedimiento de análisis espectrofotométrico de carbohidratos según Hoffman (1937)
- 3.1. Cromatógrafo HPLC modelo Waters-2690 acoplado a un detector de Índice de Refracción modelo Waters-2414
- 3.2. Estructura química de los carbohidratos patrón: (a) Fructosa, (b) Glucosa, (c) Galactosa, (d) Maltosa, (e) Lactosa, (f) Rafinosa, (g) Inulina
- 4.1. Cromatogramas individuales de los patrones de carbohidratos. (a) Fructosa, (b) Glucosa, (c) Galactosa, (d) Maltosa, (e) Lactosa, (f) Rafinosa, (g) Inulina. T^a columna 35°C, Fase Móvil ACN:H₂O 75:25, Flujo 0,8mL/min con detector de Índice de Refracción.
- 4.2. Cromatograma de mezcla de carbohidratos (mono y disacáridos) con detección mediante Índice de Refracción
- 4.3. Cromatograma ampliado de mezcla de carbohidratos (mono y disacáridos) con detección mediante Índice de Refracción
- 4.4. Efecto del flujo de la fase móvil en la resolución de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa
- 4.5. Cromatograma de elución de carbohidratos a un flujo de 1 mL/min con fase móvil ACN:H₂O 75:25 y a una T^a de columna de 35°C
- 4.6. Efecto de la temperatura en la resolución de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa
- 4.7. Cromatograma de elución de carbohidratos a un flujo de 1mL/min, una T^a de columna de 30°C y una fase móvil de composición ACN:H₂O 75:25
- 4.8. Efecto sobre la línea de base del cromatograma de la mezcla de los dos disolventes (Acetonitrilo y Agua)
- 4.9. Efecto del % de disolvente orgánico en la resolución de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa
- 4.10. Cromatograma de elución de carbohidratos con los tres parámetros estudiados optimizados (Flujo = 1 mL/min, T^a columna = 30°C, %ACN en fase móvil = 75%)
- 4.11. Cromatogramas obtenidos con los patrones de calibración de los carbohidratos.
- 4.12. Rectas de calibrado para los patrones glucosa (a), fructosa (b), maltosa (c) y lactosa (d)
- 4.13. Esquema de las etapas de preparación de la muestra para la alternativa 1

- 4.14.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 60°C durante 30 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.15.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra tras la etapa 2: precipitación y filtración, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.16.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra tras la etapa 3: hidrólisis con HCL en ebullición, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.17.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,5 gramos tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 60°C durante 30 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.18.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,5 gramos tras la etapa 2: precipitación y filtración, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.19.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,75 gramos tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 60°C durante 30 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.20.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,75 gramos tras la etapa 2: precipitación y filtración, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.21.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,75 gramos tras la etapa 3: hidrólisis con HCL en ebullición, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.22.** Esquema de las etapas de preparación de la muestra para la alternativa 2
- 4.23.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,20 gramos tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 90°C durante 60 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde
- 4.24.** Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,20 gramos tras la etapa 2: hidrólisis con ácido clorhídrico durante 90 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FORRAJES

Todo producto de origen vegetal o animal puede ser considerado como un alimento cuyos componentes orgánicos e inorgánicos son utilizables por el animal sin riesgo para su salud. Entre los alimentos destinados a la alimentación animal podemos distinguir dos grandes grupos, forrajes y concentrados. Cabe destacar que los forrajes constituyen una parte importante de la alimentación del ganado y pueden incluso integrar la totalidad de la dieta de los animales cuyo estado fisiológico no rebase un límite de necesidades nutricionales.

El término forraje no presenta una definición ampliamente aceptada sino que engloba una gran variabilidad conceptual según quien lo utilice. Una definición generalmente aceptada es la del *Forage and Grazing Terminology Committee* (1991) según la cual, **un forraje** es toda parte comestible de una planta, distinta al grano esperado, que puede proveer alimento a los animales en pastoreo o que puede ser cosechada para su alimentación. Siguiendo la clasificación de Barnes y Baylor (1995), el forraje incluye las siguiente clases: hierba, heno, ensilaje, las fracciones comestibles de las especies arbustivas y arbóreas, así como la paja.

No obstante a pesar de los diversos intentos de clasificación, hay aún demasiada ambigüedad en los conceptos. San Miguel (2001), en el capítulo I de su libro "Pastos naturales españoles", que dedica a conceptos básicos, dice que todos los colectivos científicos tienen la necesidad de utilizar una terminología que les permita comunicarse con la mayor precisión posible.

Por este motivo y con el propósito de normalizar la terminología existente en materia de pastos y forrajes y establecer una relación biunívoca entre términos y conceptos la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (S.E.E.P) publicó un **Nomenclator básico de pastos**, (Ferrer *et al.*, 2001). Tras su publicación se acordó en diversos foros su adopción en todas las publicaciones españolas sobre pastos y forrajes. Según este Nomenclator, se entiende como **pasto**, cualquier recurso vegetal susceptible de ser aprovechado por el ganado, bien en pastoreo o bien como forraje, de manera que los animales pueden aprovechar directamente las plantas sobre el terreno (pastoreo) o después de haber sido cortadas por una máquina (siega).

La producción de recursos forrajeros depende de ciclos biológicos estacionales que incluyen periodos con excedentes y periodos deficitarios tanto en lo referente a su calidad como a su disponibilidad. Para contrarrestar esta falta de regularidad en la producción de forrajes, resulta imprescindible utilizar métodos de conservación adecuados. Se trata de que, a partir de forraje cosechado en el momento óptimo de producción y calidad, puedan subsanarse las carencias debidas a la sequía estival y la parada de la producción del invierno. Para ello, es necesaria la búsqueda de estrategias para la conservación de los forrajes (Roza *et al.*, 2003).

En este sentido, el **ensilado** es un proceso de conservación del forraje fresco basado en una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias epifíticas presentes en el forraje fermentan los **carbohidratos solubles** del forraje produciendo ácido láctico, y en menor cantidad ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos indeseables y se hace viable la preservación del forraje. Los beneficios visibles ligados a este modo de conservación de forrajes son la maximización de la producción y de la calidad por unidad de superficie, la reducción de pérdidas (por lluvia, caída de hojas, respiración..), la posibilidad de disponer del terreno rápidamente para otra producción, y asegurar la disponibilidad de alimentos para el ganado durante una larga temporada.

Las buenas prácticas para llenar el silo permiten minimizar la cantidad de oxígeno presente en la masa ensilada y las buenas técnicas de cosecha permiten reducir las pérdidas de nutrientes. Ahora bien aunque se hayan realizado buenas prácticas tanto en lo referente al cosechado como al llenado del silo, existen forrajes que no poseen características adecuadas para ser ensilados (Martínez-Fernández, 2013). Las condiciones básicas para obtener un buen ensilado son las siguientes:

- Ausencia de aire en el interior de la masa vegetal acondicionada en el silo
- Suficiente contenido en carbohidratos en el forraje de partida
- Bajada rápida del pH inicial del mismo

1.1.1. CARACTERIZACIÓN DE FORRAJES Y ENSILADOS

Las cualidades de los forrajes para ser conservados como ensilados se van a poner de manifiesto en función de los parámetros fermentativos de caracterización del proceso de ensilado.

Por su parte la aptitud de un determinado forraje durante el proceso de ensilado (ensilabilidad) depende fundamentalmente del contenido en materia seca, carbohidratos solubles, poder amortiguador o capacidad tampón, y contenido en nitratos en el momento del corte (Martínez-Fernández *et al.*, 2011, 2013). Está establecido que el comportamiento de un cultivo que va a ser ensilado o su ensilabilidad, depende de la disponibilidad del sustrato para la fermentación láctica. En este sentido, la cantidad necesaria de carbohidratos solubles está relacionada con el potencial para resistirse a cambios en el pH llamado capacidad tampón (CT) del forraje y que es un indicador de la cantidad de carbohidratos que deben fermentar para que tenga lugar la síntesis de ácido láctico necesaria.

Tal y como se muestra en la tabla 1.1 los contenidos en materia seca, carbohidratos y la capacidad tampón del forraje definen su ensilabilidad.

Tabla 1.1. Intervalos de los diferentes parámetros que definen la ensilabilidad de un forraje.

Ensilabilidad	Materia seca (%)	Carbohidratos solubles (%MS)	Capacidad tampón (meq NaOH / 100g MS)
Alta	> 25	>15	< 25
Media	20-25	8-15	25-35
Baja	<20	<8	>35

Fuente: Martínez-Fernández *et al.*, 2013

Estos parámetros se encuentran directamente relacionados con los parámetros que posteriormente definirán la calidad fermentativa de los forrajes y que se resumen a continuación:

- **pH**: da una visión general de la calidad fermentativa y de la estabilidad del ensilado. Un ensilado bien conservado, es aquel en el que los gérmenes butíricos no han podido desarrollarse ya que en forrajes con menor nivel acuoso la actividad de las bacterias está limitada debido a la carencia del agua disponible para sus funciones vitales. El pH de estabilidad aumenta al disminuir el contenido en humedad del forraje. (Haigh, 1987).

- **N soluble y N amoniacal**: estos parámetros proporcionan una medida de la degradación de proteínas que tienen lugar en el proceso de ensilado.

- **Carbohidratos solubles residuales**: la relación de carbohidratos solubles del ensilado respecto a los del forraje de partida es un indicador de si hubo suficiente sustrato para la fermentación láctica.

- **Ácido láctico**: medida de la transformación de los carbohidratos en este ácido. Contribuye de manera fundamental a la reducción del pH y a la estabilidad del ensilado. Su nivel de concentración en el ensilado indica la intensidad de la fermentación y la riqueza del forraje en carbohidratos solubles de reserva.

- **Ácidos acético, propiónico y butírico**: son productos resultado de otras fermentaciones diferentes a la láctica (fermentaciones secundarias) y que contribuyen al deterioro o inestabilidad del ensilado. El ácido acético y el propiónico deben aparecer en poca cantidad y el butírico debe ser nulo o despreciable.

- **Alcoholes**: no deseables, son indicadores de fermentaciones alcohólicas producidas por hongos y levaduras. Tampoco son deseables en el ensilado.

En la tabla 1.2 se muestra la clasificación de los ensilados en cuanto a su calidad fermentativa atendiendo a los distintos valores de los parámetros citados.

Tabla 1.2. Calidad de los ensilados en función de los parámetros de fermentación.

Calidad	N soluble (%N total)	N amoniacal (%N total)	Ácidos grasos volátiles (%MS)	Ácido acético (%MS)	Ácido Láctico (%MS)	Ácido Butírico (%MS)
Excelente	<50	<7	<4	<2	>3	Ausencia
Buena	50-60	7-10	4-7	2-4	1,5-3	Trazas
Mediocre	60-65	10-15	7-10	4-5,5	1,5-0,5	<0,5
Mala	>65	15-20	10-13	5,5-7,5	<0,5	>0,5
Muy mala	>75	>20	>13	>7,5	Ausencia	>0,5

Fuente: Martínez-Fernández *et al.*, 1998

Además en la tabla 1.3 se lleva a cabo una clasificación de los valores que toman algunos de estos parámetros en función del tipo de forraje ensilado.

Tabla 1.3. Intervalos de materia seca, carbohidratos solubles y capacidad tampón de los diferentes forrajes que integran la población.

Especie o asociación	Materia seca (%)		Carbohidratos solubles (%MS)		Capacidad tampón (meq NaOH/100g MS)	
	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx
Soja	17,73	27,41	3,86	10,9	41,13	56,5
Raigrás italiano Westerwold	11,47	23,19	6,4	33,96	28,51	56,2
Raigrás italiano-Trébol violeta	11,12	26,91	3,36	22,31	20,13	59,93
Raigrás inglés-Trébol blanco	10,22	42,94	3,11	17,54	12,8	65,96
Triticale + haboncillos	15,12	33,97	2,96	25,13	12,74	43,33
Haboncillos	14,18	25,11	9,37	23,4	15,36	45
Raigrás italiano	13,54	17,07	9,24	31,01	18,37	45,77
Maíz	20,67	35,15	11,83	25,3	11,65	19,4
Triticale	20,64	38,33	14,63	31,34	7,44	25,61

Fuente: Martínez-Fernández *et al.*, 2011

1.1.2. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES

Los carbohidratos constituyen una clase de compuestos muy importantes por su elevada presencia en la naturaleza. Se encuentran tanto en los alimentos como en los microorganismos y están involucrados en un gran número de interacciones bioquímicas.

Los carbohidratos de los forrajes tienen una doble función de “estructura” y de “reserva”. Los carbohidratos estructurales, es decir la fracción fibrosa (celulosa y hemicelulosa), se encuentra en la pared celular, mientras que los carbohidratos no fibrosos (de reserva) se acumulan en las semillas y en pequeñas cantidades en el tallo y las hojas y son las pectinas, los almidones y los **carbohidratos solubles**. La fracción fibrosa se caracteriza por ser de lenta degradación mientras que la fracción no fibrosa es de rápida degradación y constituye una fuente de energía fácilmente disponible para los procesos de fermentación. Las dietas del ganado deben tener unos valores máximos y mínimos controlados en estos componentes para evitar una acidosis en el animal.

La relación entre carbohidratos solubles y la capacidad tampón de la especie a ensilar así como el tipo de bacterias que dominan el proceso de fermentación son los parámetros clave a tener en cuenta en la fase fermentativa del ensilado (desde el sellado a la fermentación). Las características que definen la buena aptitud de un forraje para ser ensilado son como ya se mencionó en el apartado 1.1, el nivel de carbohidratos solubles (CHS), la capacidad tampón (CT), y el contenido de materia seca (McDonald *et al.*, 1991, Martínez-Fernández, 2003).

Dada su importancia en el proceso fermentativo, la cuantificación de carbohidratos solubles de reserva es un gran reto para las técnicas de separación debido a que los diferentes componentes (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos) presentan muy pocas diferencias en sus propiedades físicas y químicas. Con el objetivo de aprovechar esas pequeñas diferencias y efectuar una buena separación, diferentes metodologías han sido puestas en marcha a lo largo del tiempo.

1.1.3. METODOLOGÍA CLÁSICA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES

En la actualidad la técnica utilizada para la determinación de carbohidratos solubles en forrajes es la espectrofotometría visible. Se trata de la determinación de carbohidratos reductores y carbohidratos solubles totales por reducción con ferrocianuro (Hoffman, 1937). Los carbohidratos solubles se extraen en agua a 60°C mediante agitación. Los reductores pueden ser determinados colorimétricamente por reducción del ferrocianuro. Los no reductores, después de inversión con ácido clorhídrico en ebullición también reducen el ferrocianuro, de esta manera, puede determinarse el total de carbohidratos solubles. Al igual que todas las técnicas espectrofotométricas se precisa de una curva patrón elaborada con patrones de concentración conocida de la solución problema, en este caso la glucosa.

Actualmente, el laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA cuantifica los carbohidratos solubles mediante esta metodología (Hoffman, 1937), para lo cual utiliza un procedimiento normalizado de trabajo constituido por las siguientes etapas:

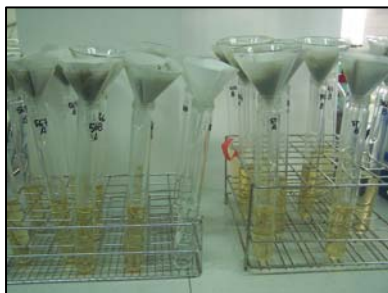
- Extracción de los carbohidratos solubles con agua a 60°C (30 minutos en agitación).
- Adición de agentes precipitantes como son el oxalato potásico, el acetato de cinc y el ferrocianuro potásico para arrastrar todo componente que pueda interferir en la medida.
- Inversión de los carbohidratos no reductores llevando a ebullición con ácido clorhídrico.
- Ajuste de pH.
- Formación de un producto coloreado listo para la medida mediante la adición del reactivo de Nelson y arsenomolibdato amónico.
- Lectura de la absorbancia a 540nm.

Las diferentes etapas de este procedimiento se ven reflejadas en el esquema de la figura 1.1.

**DETERMINACIÓN
ESPECTROFOTOMÉTRICA
DE AZÚCARES**



1. Extracción



2. Precipitación



3. Inversión



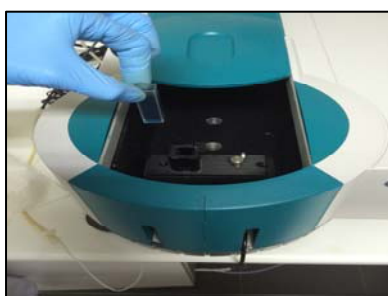
4. Ajuste de pH



5. Adición Reactivo de Nelson



**6. Producto
coloreado**



6. Medida de absorbancia

Figura 1.1. Esquema del procedimiento de análisis espectrofotométrico de carbohidratos según Hoffman (1937).

Tal y como se pone de manifiesto en la secuencia detallada de las etapas necesarias para el análisis de carbohidratos totales, esta metodología presenta grandes desventajas: es tediosa y exige un largo pretratamiento de la muestra con un gran número de etapas que incluyen calentamiento, filtración, adición de reactivos y agitación. Las diferentes etapas inducen una acumulación de errores de medida inherentes al proceso, que determinan que el error de laboratorio en las medidas primarias sea mayor que el deseado para obtener una buena exactitud y precisión del método.

Por ello ha surgido la necesidad de poner a punto una nueva metodología basada en HPLC que permita minimizar las etapas de pretratamiento de la muestra y mejore las características de repetibilidad y reproducibilidad del método convencional.

1.2. LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA: ASPECTOS GENERALES

La cromatografía líquida de alta eficacia o *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en los campos de la bioquímica y la química analítica. También se denomina en ocasiones Cromatografía líquida de alta presión o Cromatografía líquida de alta resolución. Es una técnica analítica instrumental utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre los analitos y la fase móvil en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria).

Dentro de la cromatografía líquida es posible establecer la siguiente clasificación, en base a la naturaleza de la fase estacionaria:

1. **De adsorción** (líquido-sólido). La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción de los analitos.
2. **De reparto**. La separación se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.
3. **De intercambio iónico**. La fase estacionaria posee grupos ionizados capaces de retener iones de signo contrario.
4. **De exclusión molecular**. La fase estacionaria es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada y separación de las moléculas en función de su tamaño.

El mecanismo de interacción en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el tipo de interacción, por ello se realiza otra división de los mismos atendiendo a la polaridad de la fase estacionaria.

- **Fase Normal:** la fase estacionaria presenta elevada polaridad (grupos ciano, amino, etc).
- **Fase Reversa:** la fase estacionaria es de carácter apolar (cadenas hidrocarbonadas).

1.3. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

Actualmente el análisis de carbohidratos está muy presente en un gran número de aplicaciones. Especialmente son bien conocidos los protocolos de determinación de carbohidratos en muestras de alimentos y bebidas. Las técnicas analíticas más utilizadas inicialmente en el análisis de carbohidratos fueron las espectrofotométricas (Hoffman, 1937) y las volumétricas (Wilson *et al.*, 1971).

En lo referente a la cuantificación espectrofotométrica, en la bibliografía se describen un gran número de ensayos analíticos para la determinación de carbohidratos (Hoffman, 1937), siendo los ensayos más actuales y evolucionados aquellos relacionados con la reducción de carbohidratos y posterior detección de un compuesto coloreado. Otras determinaciones de azúcares se realizan en base a la cuantificación de carbono total mediante espectrofotometría con detección ultravioleta (UV) (Albalasmeh *et al.*, 2013).

En el Reglamento CE-2009, cuyo ámbito de aplicación es la alimentación animal, la cuantificación de carbohidratos reductores y totales se realiza previa extracción con etanol diluido, y clarificación con las soluciones Carrez I y II. Tras eliminar el etanol se determinan las cantidades antes y después de la inversión siguiendo el método de Luff-Schoorl, basado en una volumetría con tiosulfato sódico.

Con el avance de las técnicas analíticas, la cromatografía ha ido ganando terreno en el campo del análisis de carbohidratos, especialmente la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las primeras publicaciones datan de la década de los 90, estos ensayos consisten en la determinación de carbohidratos de bajo peso molecular mediante HPLC previa separación de los analitos en sus diferentes formas estructurales como son monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, etc. (Harrison, 1997). Los avances en este grupo de ensayos consistieron en desarrollar la capacidad de analizar los carbohidratos sin una previa separación en sus diferentes formas estructurales mediante el desarrollo de nuevas columnas cromatográficas que permitieran una mejor interacción de los analitos y por lo tanto un incremento en la eficacia de la separación de los mismos (Glyad, 2002).

En su gran mayoría la metodología cromatográfica a seguir en el caso de la separación de carbohidratos de bajo peso molecular es la cromatografía de líquidos de alta resolución en modo normal, sin embargo recientes estudios en la determinación de carbohidratos de alto peso molecular (oligosacáridos y polisacáridos) han demostrado que el uso de la cromatografía iónica, especialmente de intercambio aniónico, con detección amperométrica de pulso, ofrece unos mejores resultados de resolución y eficacia en cuanto a este tipo de analitos se refiere (Raessler, 2008).

Otra alternativa a las separaciones cromatográficas es la determinación de carbohidratos mediante electroforesis capilar con detección ultravioleta y derivatización pre-columna con ácido p-aminobenzoico (PABA). La reacción de derivatización tiene lugar durante una hora a 40°C en presencia de una disolución 250mM de PABA y un 20% de ácido acético (Cortacero-Ramirez *et al.*, 2004).

2. OBJETIVO

La reducida base territorial disponible en las explotaciones de la Cornisa Cantábrica junto con la marcada estacionalidad de la producción forrajera son dos de los factores estructurales limitantes de la rentabilidad del sector agroganadero. Por ello, se emplea el ensilado como método de conservación para preservar los excedentes forrajeros, de la primavera y el otoño, para su posterior utilización como alimento en las épocas de parada vegetativa (sequía estival e invierno).

Está establecido que el comportamiento de un cultivo que va a ser ensilado, depende de la disponibilidad del sustrato para la fermentación láctica. Esta fermentación es llevada a cabo por bacterias lácticas que degradan los carbohidratos solubles hasta ácido láctico. De ahí la importancia de cuantificar el contenido en carbohidratos de los forrajes, con el fin de establecer las medidas previas al ensilado y minimizar el deterioro de los mismos.

Por todo ello el presente trabajo fin de Máster, que se enmarca dentro del proyecto INIA RTA 2012-00065-C05-01 tiene como objetivo la puesta a punto de una metodología rápida y robusta para el análisis de carbohidratos solubles basada en el empleo de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Índice de Refracción como alternativa al método colorimétrico de reducción con ferrocianuro.

Además del objetivo científico expuesto, otro objetivo del este Proyecto Fin de Máster consiste en desarrollar competencias de aprendizaje, tanto generales como específicas, que sean de utilidad a la hora de enfrentarse a la implantación de una determinada metodología analítica para la resolución de un problema concreto surgido en el ámbito laboral.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTACIÓN

Sistema Cromatógrafico

Se ha empleado un equipo HPLC modelo Waters-2690 acoplado a un detector de índice de refracción modelo Waters-2414.

El cromatógrafo está dotado de un módulo automático de inyección con volumen variable que va desde 5 a 20 μL y muestreador automático con capacidad para 120 muestras. Dispone de cuatro canales para las correspondientes fases móviles, cámara atemperada para la columna y reservorio de muestras y sistema integrado de desgasificación continua de las fases móviles (Figura 3.1).

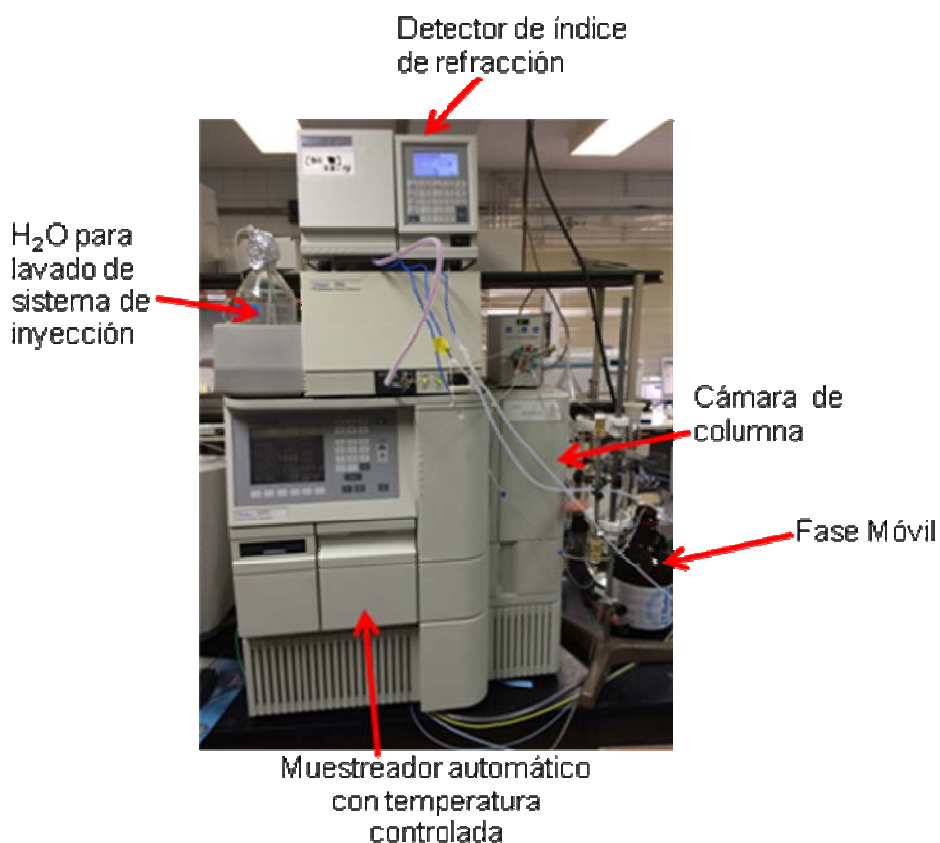


Figura 3.1. Cromatógrafo HPLC modelo Waters-2690 acoplado a un detector de Índice de Refracción modelo Waters-2414.

La columna cromatográfica empleada es la *Waters High Performance Carbohydrate Column* (P/N WAT044355) de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno. Se trata de una columna de aplicación específica para la separación de monosacáridos y disacáridos en tiempos cortos de análisis. Posee como fase estacionaria polar un grupo amino propil silano trifuncional y como fase móvil utiliza mezclas en distintas proporciones de Acetonitrilo/ H₂O.

3.2. REACTIVOS

Para la puesta a punto de la metodología basada en HPLC se han utilizado patrones de los siguientes carbohidratos, todos ellos pertenecientes a la casa comercial *Sigma-Aldrich* y de pureza entre el 98-99 % (Ver figura 3.2):

- Monosacáridos: Fructosa, Glucosa, Galactosa
- Disacáridos: Maltosa, Lactosa
- Oligosacáridos: Rafinosa
- Polisacáridos: Inulina
- Cartuchos Sep-pac C18 para la preparación de las muestras previa al análisis

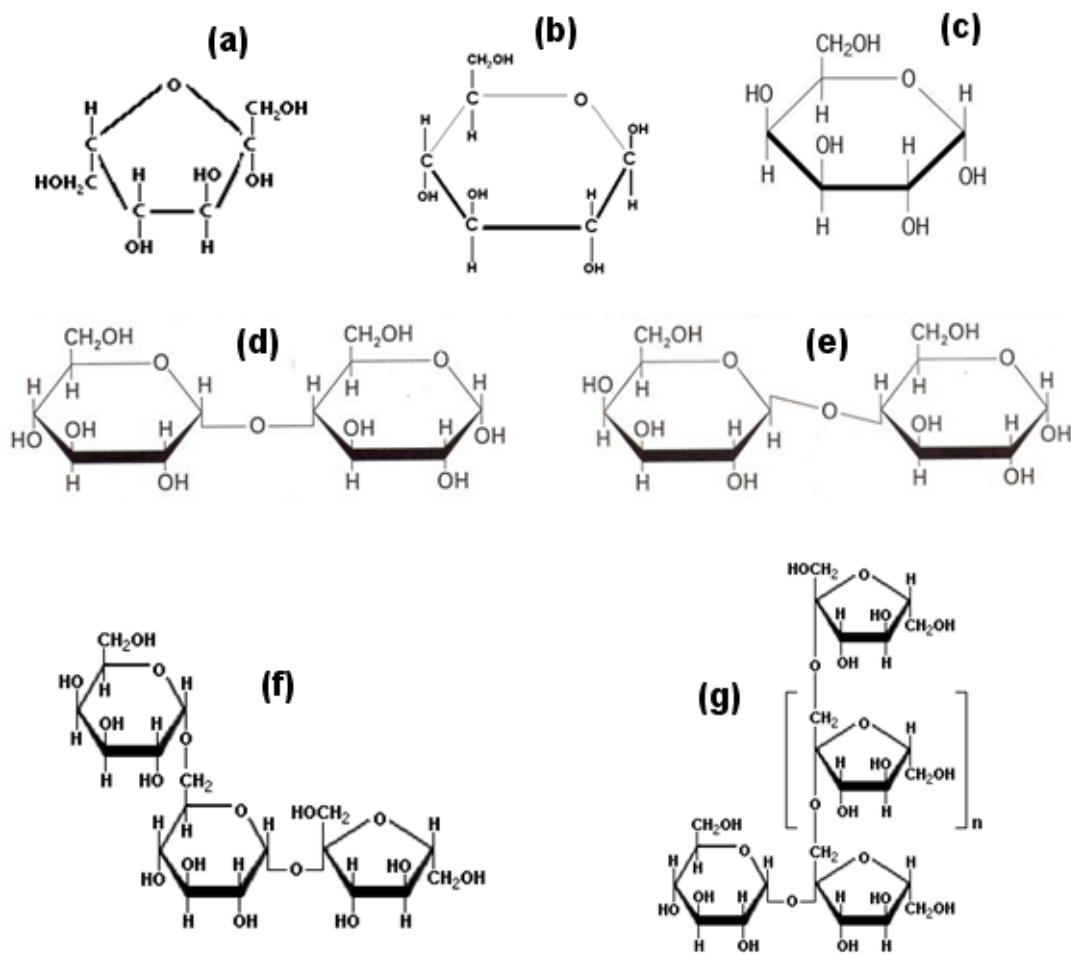


Figura 3.2. Estructura química de los carbohidratos patrón: (a) Fructosa, (b) Glucosa, (c) Galactosa, (d) Maltosa, (e) Lactosa, (f) Rafinosa, (g) Inulina.

En todas las etapas, tanto de preparación de patrones, reactivos o pretratamiento de las muestras se han utilizado reactivos de calidad para HPLC y agua Milli-Q.

Como fase móvil en la metodología a desarrollar (cromatografía en fase normal con fase estacionaria polar) se utilizó la mezcla del disolvente orgánico acetonitrilo (ACN) y agua Milli-Q en proporciones variables.

Para la cuantificación de los carbohidratos siguiendo la metodología clásica (Hoffman, 1937) empleada en el laboratorio de Nutrición animal del SERIDA se han utilizado los siguientes reactivos:

- Acetato de Zinc 2-hidrato
- Ferrocianuro potásico
- Oxalato potásico
- Hidróxido sódico
- Ácido clorhídrico
- Rojo de metilo
- Reactivo de Nelson: para prepararlo es necesario mezclar el reactivo de Nelson A con el Nelson B en proporción 25:1. El reactivo de Nelson A está formado por carbonato sódico, tartrato sódico potásico, bicarbonato sódico y sulfato sódico anhidro, mientras que el reactivo de Nelson B está formado por sulfato de cobre II, ácido sulfúrico y agua Milli-Q.
- Solución de arsenomolibdato amónico
- Solución matriz de glucosa (1mg/mL)
- Tolueno
- Agua Milli-Q

3.3. MUESTRAS

La selección de las muestras llevó a cabo con el propósito de buscar la mayor variabilidad en el contenido de carbohidratos para poder desarrollar un estudio del contenido de éstos a diferentes niveles de concentración, abarcando así un intervalo amplio y útil para la implantación en rutina de la metodología desarrollada.

Para llevar a cabo la optimización de la metodología propuesta, se han utilizado los siguientes forrajes:

- Ray-grass deshidratado, entendiéndose como ray-grass al nombre genérico que se le da a un grupo de plantas perteneciente a la familia de las “gramíneas” y al género *Lolium* sp.
- Haba forrajera pre-henificada (familia “leguminosas” género *vicia faba*).

- Forraje verde pre-henificado, se trata de muestras procedentes de praderas multiespecie con predominio de gramíneas y leguminosas en proporción variable.

La muestra de Ray-grass deshidratado procede de un excedente de intercomparativo, con valor de referencia asignado, y será utilizado para evaluar la exactitud de la metodología propuesta. En lo referente al haba forrajera y al forraje verde prehenificados, son muestras previamente analizadas en el laboratorio, y que se han incluido con el fin de evaluar la precisión de la metodología propuesta.

3.4. PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ESTUDIADA

Para la determinación de los carbohidratos en forrajes, en una primera etapa, se llevó a cabo un estudio de la capacidad de separación de la columna incluyendo todos los patrones de los carbohidratos disponibles con el objeto de optimizar los parámetros críticos de la separación cromatográfica en HPLC.

Para llevar a cabo la optimización de la metodología HPLC-IR, ha sido necesario evaluar el efecto que se produce al variar los siguientes parámetros:

- Temperatura de la columna
- Flujo de la fase móvil
- Composición de la fase móvil

En la Tabla 3.1 se detallan las diferentes alternativas ensayadas.

Tabla 3.1. Condiciones cromatográficas a estudiar para la optimización del proceso de separación de carbohidratos.

Temperatura (°C)	25	30	35	40	-
Flujo (mL/min)	0,6	0,8	1	1,2	-
% ACN:H₂O	65:35	70:30	75:25	80:20	90:10

Para la selección de las mejores condiciones en el proceso de separación, es necesario calcular los parámetros cromatográficos más relevantes (Skoog *et al.*, 2001):

- **t_m** (tiempo muerto): tiempo que tarda en salir de la columna una sustancia que no interacciona con la fase estacionaria.
- **w** : anchura de pico.
- **t_r** (tiempo de retención): tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del analito en el detector a la salida de la columna.
- **k'** (factor de retención o de capacidad): indica la interacción del analito con la fase estacionaria. Se calcula: $k' = (t_r - t_m) / t_m$, e idealmente debe estar entre 2 y 10.
- **Eficacia, N** : ($N = n^\circ$ de platos teóricos): se define en base a dos términos como son el número de platos teóricos (N) y la altura de plato teórico (H), relacionados por la ecuación $N = L/H$, donde L es la longitud de la columna cromatográfica.

La eficacia de la columna aumenta cuanto mayor sea el número de platos y menor sea la altura de plato teórico.

Para calcular el número de platos teóricos también se utiliza la fórmula

$$N = 16 \cdot (t_r/w)^2.$$

- **Resolución (R_s)**: es la capacidad que tiene una columna cromatográfica de separar dos picos que eluyen a tiempos muy próximos. Se calcula: $R = (t_{r,a} - t_{r,b}) / ((w_a + w_b) / 2)$.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de separación, se procedió a desarrollar un calibrado para relacionar el área de pico obtenido en el cromatograma con la concentración del carbohidrato en estudio con el fin de determinar la concentración de los carbohidratos en muestras de forrajes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Tomando como punto de partida las recomendaciones del fabricante de la columna cromatográfica se seleccionaron como parámetros de trabajo iniciales los siguientes: 35 °C de temperatura de la columna y una fase móvil de ACN:H₂O (75:25) a un flujo de 0,8 mL/min y en modo isocrático. Además de estos parámetros se fijó un volumen de inyección de 20 µL que es el máximo volumen que es posible inyectar con el sistema cromatográfico disponible en el Laboratorio de Nutrición del SERIDA.

Se prepararon patrones individuales de los carbohidratos en las concentraciones que se recogen en la Tabla 4.1. Estas concentraciones están basadas en las descritas en la bibliografía para carbohidratos solubles y las recomendadas por el fabricante de la columna para verificar el correcto funcionamiento de la misma.

Tabla 4.1. Concentración de los patrones de carbohidratos inyectados inicialmente.

Carbohidrato	Concentración (g/L)
Monosacárido - Fructosa	6
Monosacárido - Glucosa	6
Monosacárido - Galactosa	6
Disacárido - Lactosa	10
Disacárido - Maltosa	10
Oligosacárido - Rafinosa	15
Polisacárido - Inulina	10

Se inyectaron por separado en el HPLC en las condiciones cromatográficas descritas anteriormente (Temperatura de la columna de 35°C, Flujo de fase móvil de 0,8 mL/min y proporciones de ACN:H₂O en fase móvil de 75:25) con el fin de determinar el orden de elución de los distintos carbohidratos patrón en base a sus tiempos de retención para así poder identificarlos posteriormente en una mezcla compleja de patrones y por supuesto en las muestras de forrajes.

En un primer ensayo se inyectaron individualmente todos los patrones de carbohidratos en las concentraciones indicadas en la tabla 4.1. En la figura 4.1 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada uno de los carbohidratos en estudio. Se puede observar que los oligosacáridos (f) y los polisacáridos (g) poseen tiempos de retención muy elevados y no eluyen en las condiciones cromatográficas ensayadas (Ver tabla 4.2).

Tomando en consideración que la fase estacionaria de la columna es polar (formada por grupos amino) el orden de elución de los analitos va desde los analitos menos polares hasta los más polares, y teniendo en cuenta que la polaridad de los hidratos de carbono reside en los grupos funcionales hidroxilo (OH), parece claro que los oligosacáridos y polisacáridos son más polares que los mono- y di- sacáridos y por ello presentan tiempos de retención más elevados, haciendo imposible su elución en un tiempo inferior a 40 minutos en las condiciones ensayadas.

Teniendo en cuenta que al incrementarse el tiempo de retención se produce un ensanchamiento del pico con la consecuente pérdida de sensibilidad, se trabajó en la optimización de la separación de los mono y disacáridos detallados en la sección de material y métodos (Apartado 3.2).

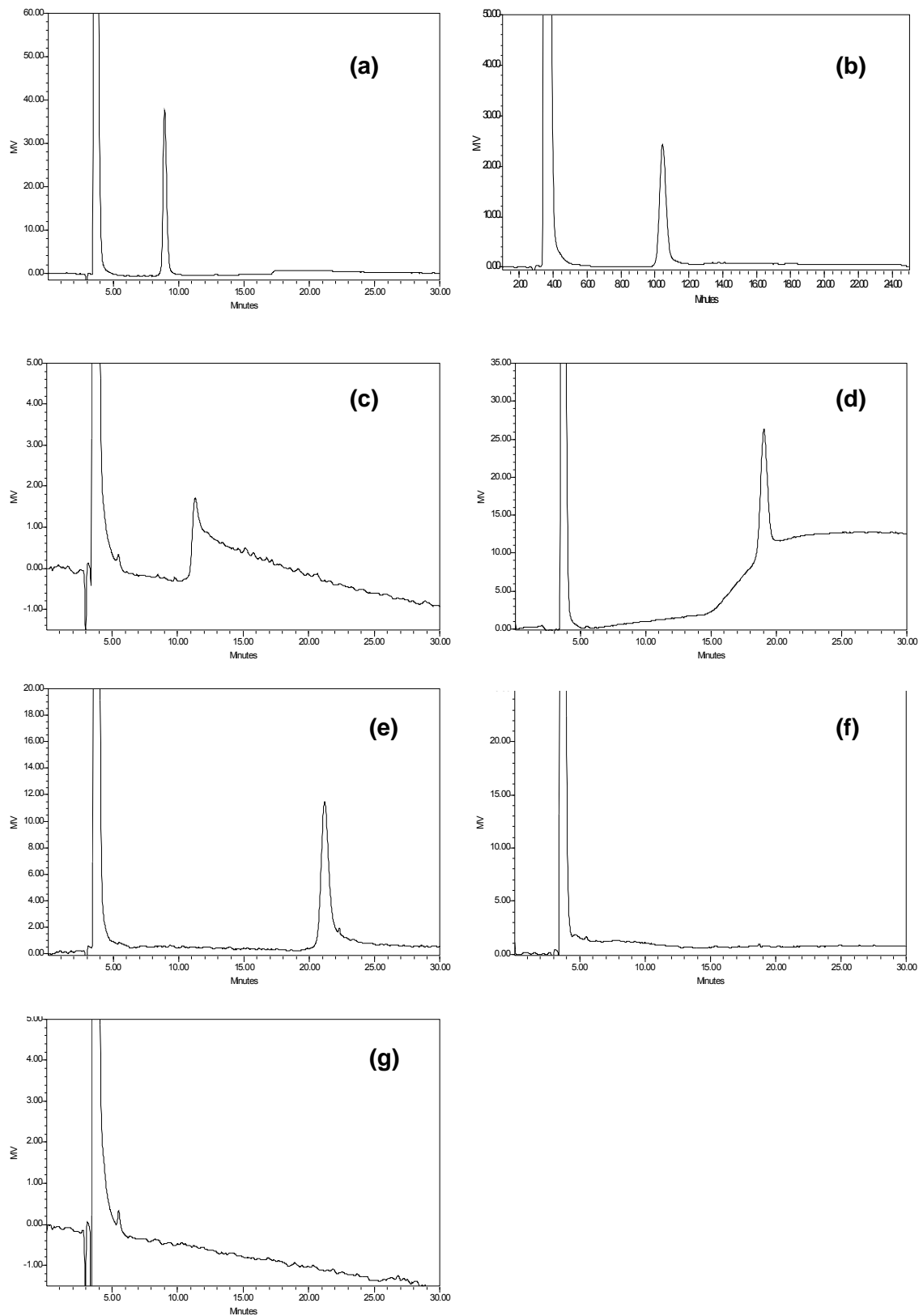


Figura 4.1. Cromatogramas individuales de los patrones de carbohidratos. (a) Fructosa, (b) Glucosa, (c) Galactosa, (d) Maltosa, (e) Lactosa, (f) Rafinosa, (g) Inulina. Tª columna 35°C, Fase Móvil ACN:H₂O 75:25, Flujo 0,8mL/min con detector de Índice de Refracción.

Tabla 4.2. Tiempos de retención obtenidos al analizar los carbohidratos en las condiciones cromatográficas recomendadas por el fabricante de la columna.

CARBOHIDRATOS	Tiempo de retención (min)
Monosacárido - Fructosa	9
Monosacárido - Glucosa	10,5
Monosacárido - Galactosa	11,2
Disacárido - Maltosa	19
Disacárido - Lactosa	21,1
Oligosacárido - Rafinosa	No se observa
Polisacárido - Inulina	No se observa

Tras la asignación de los tiempos de retención individuales para cada carbohidrato (tabla 4.2), se preparó una mezcla multipatrón conteniendo los carbohidratos en estudio: fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa y se inyectó de nuevo bajo las condiciones iniciales (T^a columna de 35°C, Fase Móvil ACN:H₂O 75:25 y flujo de fase móvil de 0,8mL/min) para evaluar las posibilidades de separación de los mismos. La concentración de cada uno de los carbohidratos se recoge en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Concentración de los carbohidratos en la mezcla multipatrón inyectada.

Carbohidrato	Concentración (mg/mL)
Fructosa	3
Glucosa	2,4
Galactosa	4,2
Lactosa	4
Maltosa	4

En las figuras 4.2 y 4.3 se muestran los resultados obtenidos en las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas.

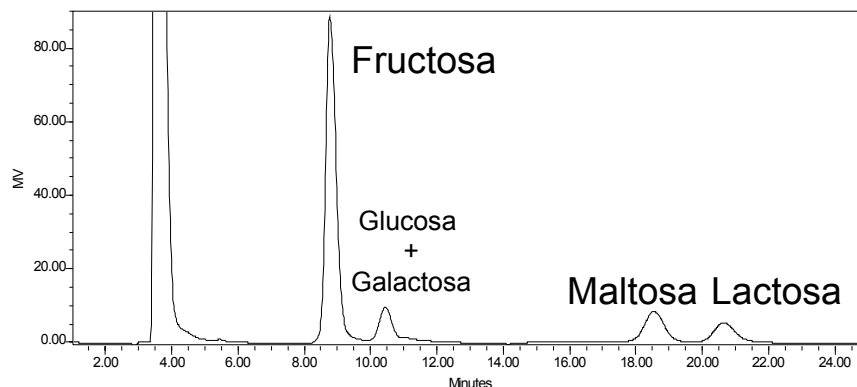


Figura 4.2 Cromatograma de mezcla de carbohidratos (mono y disacáridos) con detección mediante Índice de Refracción.

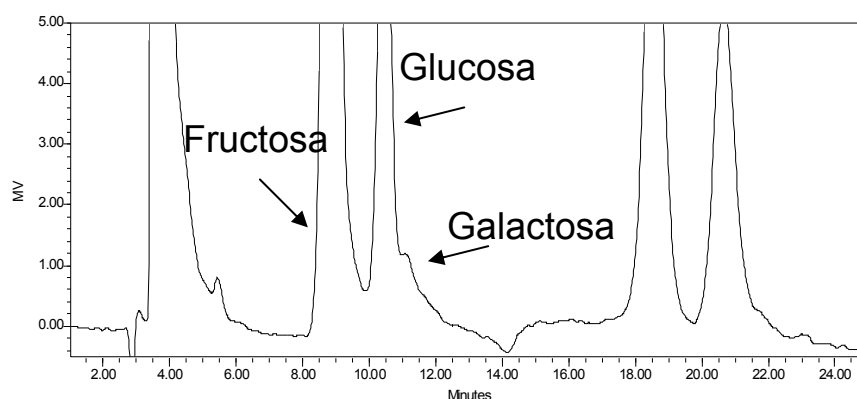


Figura 4.3. Cromatograma ampliado de mezcla de carbohidratos (mono y disacáridos) con detección mediante Índice de Refracción.

En la Figura 4.2 la galactosa coeluye con la glucosa, la ampliación del cromatograma (Ver Figura 4.3) nos permite observar el solapamiento entre ambos carbohidratos. Este solapamiento está relacionado con el hecho de que ambos monosacáridos son hexosas con el mismo número de grupos hidroxilo y por tanto con polaridades muy similares (Ver figura 3.2).

A la vista de los resultados y en las condiciones ensayadas podemos decir que tanto la resolución como los tiempos de análisis son satisfactorios para todos los mono y disacáridos con excepción de la galactosa.

Con el fin de mejorar la separación e incrementar la resolución en el menor tiempo de separación posible, se repitió el mismo proceso realizando las correspondientes modificaciones de los parámetros operacionales cruciales en una separación cromatográfica en HPLC (Ver apartado 3.4, tabla 3.1).

Llevando a cabo los cálculos de los parámetros cromatográficos más relevantes se seleccionaron las condiciones óptimas para la separación.

4.1.1. EFECTO DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL

Se estudió la separación a diferentes flujos de fase móvil: **0,6, 0,8, 1 y 1,2 mL/min**. La optimización del flujo se realizó manteniendo una temperatura de columna de 35°C y una fase móvil de composición ACN:H₂O 75:25.

En la tabla 4.4 se muestran los valores de: tr, w, k' y N para cada uno de los flujos ensayados. Podemos observar que con un flujo de 1,2 mL/min es posible eluir todos los carbohidratos en un tiempo de 14 minutos. Pero este hecho lleva consigo una disminución en la resolución de glucosa-galactosa que disminuye desde 0,82 con un flujo de 1mL/min a 0,59 cuando se aumenta el flujo a 1,2 mL/min (Ver tabla 4.5).

Tabla 4.4. Parámetros cromatográficos para cada uno de los flujos de fase móvil ensayados.

	0,6 mL/min				0,8 mL/min			
	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia
Fructosa	11,55	1,45	3,04	1018	8,71	0,99	2,05	1236
Glucosa	13,64	1,10	3,78	2443	10,27	0,89	2,60	2129
Galactosa	-	-	-	-	10,91	0,85	2,82	2663
Maltosa	23,99	1,94	7,40	2443	18,07	1,74	5,33	1733
Lactosa	-	-	-	-	20,12	1,72	6,04	2186
	1 mL/min				1,2 mL/min			
	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia
Fructosa	7,03	0,76	1,46	1362	5,89	0,70	1,06	1147
Glucosa	8,30	0,74	1,91	2006	6,96	0,85	1,44	1066
Galactosa	8,84	0,57	2,10	3830	7,38	0,58	1,59	2626
Maltosa	14,67	1,37	4,14	1841	12,28	1,21	3,30	1651
Lactosa	16,30	1,37	4,71	2273	13,67	1,25	3,79	1904

Tabla 4.5. Resolución (Rs) de los carbohidratos de medida a los diferentes flujos de fase móvil ensayados.

FLUJO (mL/min)	0,6	0,8	1	1,2
Rs Fructosa-Glucosa	1,64	1,66	1,69	1,39
Rs Glucosa-Galactosa	-	0,74	0,82	0,59
Rs Galactosa-Maltosa	-	5,55	6,00	5,49
Rs Maltosa-Lactosa	-	1,18	1,20	1,12

En la figura 4.4 se muestran las resoluciones de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa y se observa que las mejores resoluciones se consiguen con un flujo de 1mL/min, aunque en ninguna de las condiciones se consigue una separación óptima entre la glucosa y la galactosa ($R_s < 1$).

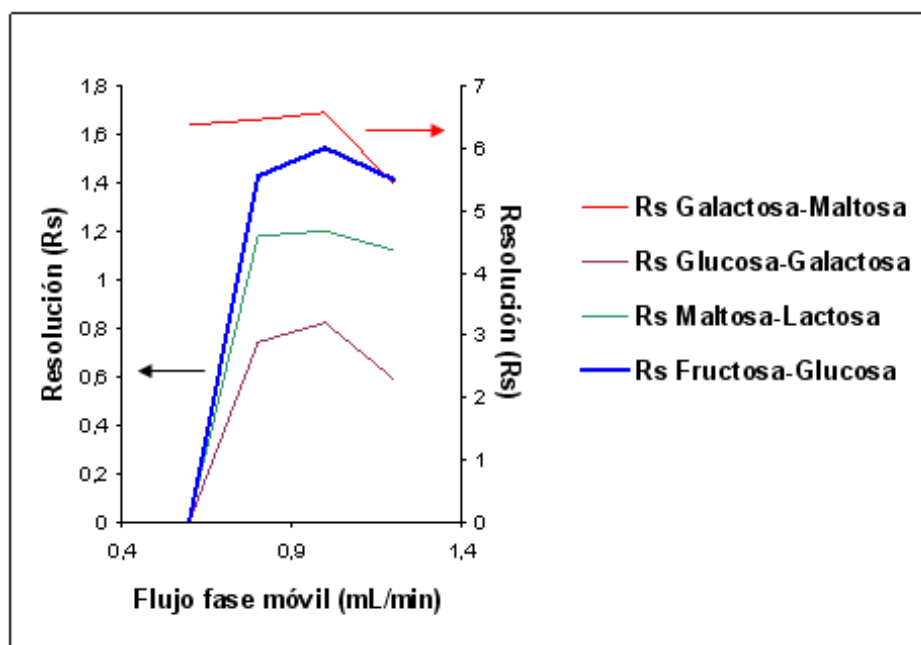


Figura 4.4. Efecto del flujo de la fase móvil en la resolución de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa.

El cromatograma que se obtiene bajo estas condiciones (Flujo de fase móvil de 1 mL/min, T^a de la columna 35°C y composición de la fase móvil ACN:H₂O 75:25) es el que se muestra en la figura 4.5.

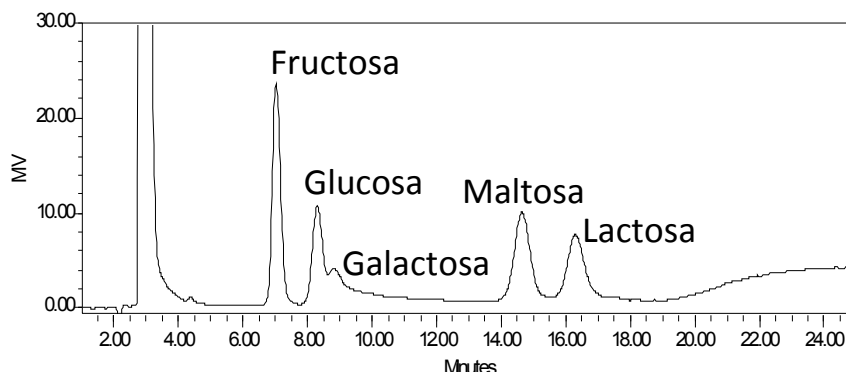


Figura 4.5. Cromatograma de elución de carbohidratos a un flujo de 1 mL/min con fase móvil ACN:H₂O 75:25 y a una T^a de columna de 35°C.

Una vez seleccionado el valor de flujo más adecuado para la separación cromatográfica, se evaluó el efecto de la temperatura de la columna sobre la separación de los carbohidratos.

4.1.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA

Manteniendo el flujo de la fase móvil a 1 mL/min y la proporción ACN:H₂O a 75:25, se procedió a optimizar la temperatura de la columna. El rango de temperaturas ensayadas se mantuvo dentro de los límites indicados en las especificaciones de la columna cromatográfica, estas temperaturas fueron: **25, 30, 35 y 40 °C** (Ver apartado 3.4, tabla 3.1).

En la tabla 4.6 se detallan los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos que evalúan la capacidad y eficacia de la columna cromatográfica a diferentes temperaturas.

Tabla 4.6. Parámetros cromatográficos para cada una de las temperaturas de columna ensayadas.

25°C					30°C			
	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia
Fructosa	7,59	0,83	1,66	1338	7,28	0,83	1,55	1243
Glucosa	8,88	0,79	2,11	2024	8,54	0,72	1,99	2227
Galactosa	9,53	0,72	2,34	2817	9,13	0,70	2,20	2742
Maltosa	15,71	1,43	4,50	1935	15,00	1,37	4,25	1922
Lactosa	17,74	1,53	5,21	2145	16,85	1,36	4,90	2472
35°C					40°C			
	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia
Fructosa	7,03	0,76	1,46	1362	6,62	0,69	1,32	1458
Glucosa	8,30	0,74	1,91	2006	7,81	0,70	1,73	1993
Galactosa	8,84	0,57	2,10	3830	-	-	-	-
Maltosa	14,67	1,37	4,14	1841	13,54	1,19	3,74	2056
Lactosa	16,30	1,37	4,71	2273	14,95	1,12	4,23	2859

A la vista de los resultados podemos afirmar que a 40°C la glucosa y la galactosa coeluyen y que sin apenas incremento en los tiempos de retención, es la temperatura de 30°C la que permite obtener la mejor resolución como se observa en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Resolución (Rs) de los carbohidratos de medida a las diferentes temperaturas de columna ensayadas.

TEMPERATURA (°C)	25	30	35	40
Rs Fructosa-Glucosa	1,08	1,63	1,13	1,71
Rs Glucosa-Galactosa	0,58	0,83	0,57	-
Rs Galactosa-Maltosa	3,46	5,68	3,52	-
Rs Maltosa-Lactosa	0,90	1,35	0,80	1,22

En la figura 4.6 se muestra el efecto que la temperatura ejerce sobre la resolución de la columna. Gráficamente se observa que los mejores resultados se obtienen para una temperatura de 30°C.

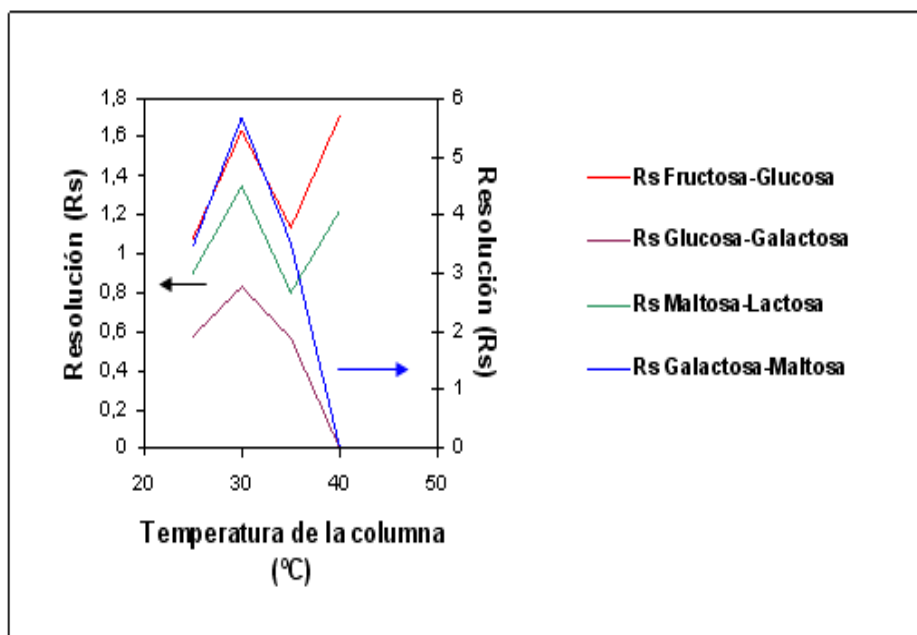


Figura 4.6. Efecto de la temperatura en la resolución de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa.

A continuación en la figura 4.7 se muestra el cromatograma correspondiente a la separación de carbohidratos al valor de temperatura óptimo seleccionado, 30°C, a un flujo de 1 mL/min y a una composición de fase móvil ACN:H₂O 75:25.

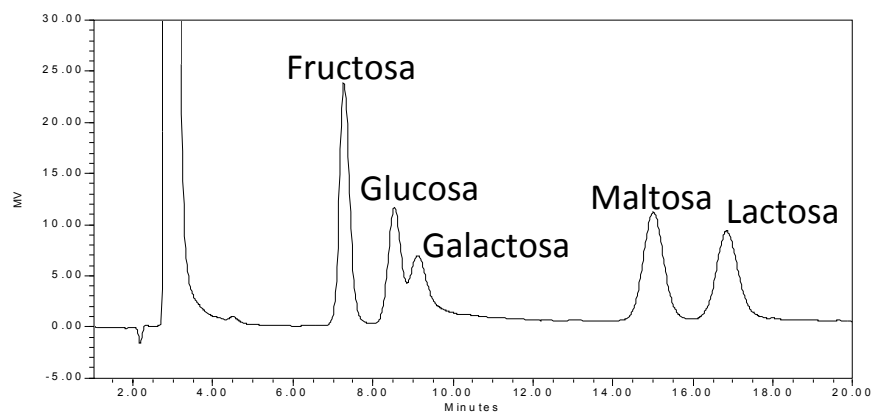


Figura 4.7. Cromatograma de elución de carbohidratos a un flujo de 1mL/min, una T^a de columna de 30°C y una fase móvil de composición ACN:H₂O 75:25.

4.1.3. EFECTO DE LA POLARIDAD DE LA FASE MÓVIL

Tomando los valores seleccionados en los apartados anteriores (Flujo de 1 mL/min y T^a de la columna de 30°C) se procedió a optimizar el último de los parámetros operacionales, el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil, estudiando las siguientes combinaciones de ACN:H₂O: **65:35, 70:30, 75:25, 80:20 y 90:10** (Ver apartado 3.4, tabla 3.1).

En este punto cabe destacar que el equipo HPLC disponible en el laboratorio del SERIDA realiza la mezcla en baja presión, esto quiere decir que primeramente mezcla los disolventes y posteriormente los bombea. Este modo de trabajo puede hacer que se generen distorsiones en la línea de base y que el cromatograma presente mayor ruido en forma de pulsos periódicos (Ver figura 4.8). Para evitar esta situación se procede a preparar las mezclas de disolventes adecuadas para cada uno de los ensayos.

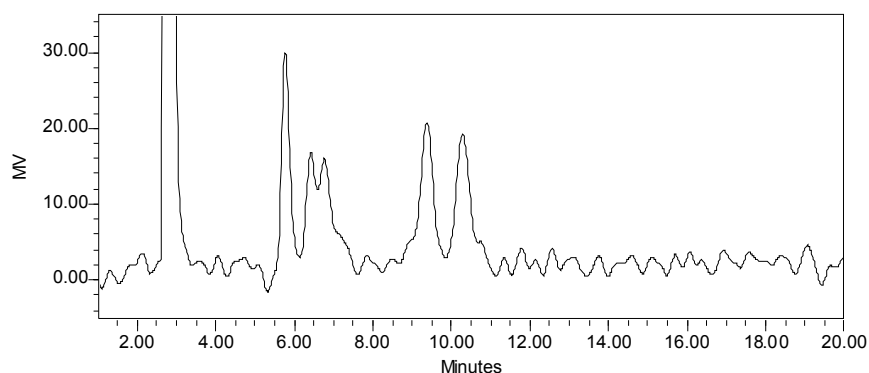


Figura 4.8. Efecto sobre la línea de base del cromatograma de la mezcla de los dos disolventes (Acetonitrilo y Agua).

En la tabla 4.8 se muestra el efecto de las diferentes fases móviles con polaridad variable sobre la separación de los carbohidratos considerando un flujo de 1 mL/min y una temperatura de la columna de 30°C. Por otro lado en la tabla 4.9 se recogen los resultados de las resoluciones obtenidas a las diferentes composiciones de fase móvil.

Tabla 4.8. Parámetros cromatográficos para cada una de las composiciones de fase móvil ensayadas.

	65:35				70:30			
	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia	Tr (min)	w (min)	k'	Eficacia
Fructosa	4,95	0,54	0,73	1352	5,77	0,55	1,02	1743
Glucosa	5,36	0,43	0,88	2522	6,47	0,80	1,27	1047
Galactosa	5,52	0,47	0,93	2165	6,80	0,70	1,38	1510
Maltosa	6,96	0,60	1,44	2146	9,39	0,66	2,29	3247
Lactosa	7,47	0,55	1,62	2910	10,27	0,70	2,60	3417
	75:25				80:20			
	tr (min)	w (min)	k'	Eficacia	Tr (min)	w (min)	k'	Eficacia
Fructosa	7,28	0,83	1,55	1243	9,55	1,27	2,34	899
Glucosa	8,54	0,72	1,99	2227	11,90	1,09	3,17	1902
Galactosa	9,13	0,70	2,20	2742	12,93	1,05	3,53	2416
Maltosa	15,00	1,37	4,25	1922	26,29	2,14	8,21	2406
Lactosa	16,85	1,36	4,90	2472	30,36	2,22	9,63	2981

Tabla 4.9. Resolución (Rs) de los carbohidratos de medida a las diferentes composiciones de fase móvil ensayadas.

ACN:H ₂ O	65:35	70:30	75:25	80:20
Rs Fructosa-Glucosa	0,85	1,04	1,46	1,98
Rs Glucosa-Galactosa	0,35	0,44	0,78	0,96
Rs Galactosa-Maltosa	2,68	3,82	4,90	8,36
Rs Maltosa-Lactosa	0,88	1,28	1,18	1,86

A la vista de los resultados de la tabla 4.9 y figura 4.9 se pone de manifiesto que la mejor resolución se obtiene para una fase móvil que contenga un 80% de ACN, sin embargo, en la tabla 4.8 se observa que el tiempo de retención se incrementa mucho para la lactosa provocando un ensanchamiento de los picos (w) y la consecuente pérdida de sensibilidad en el análisis.

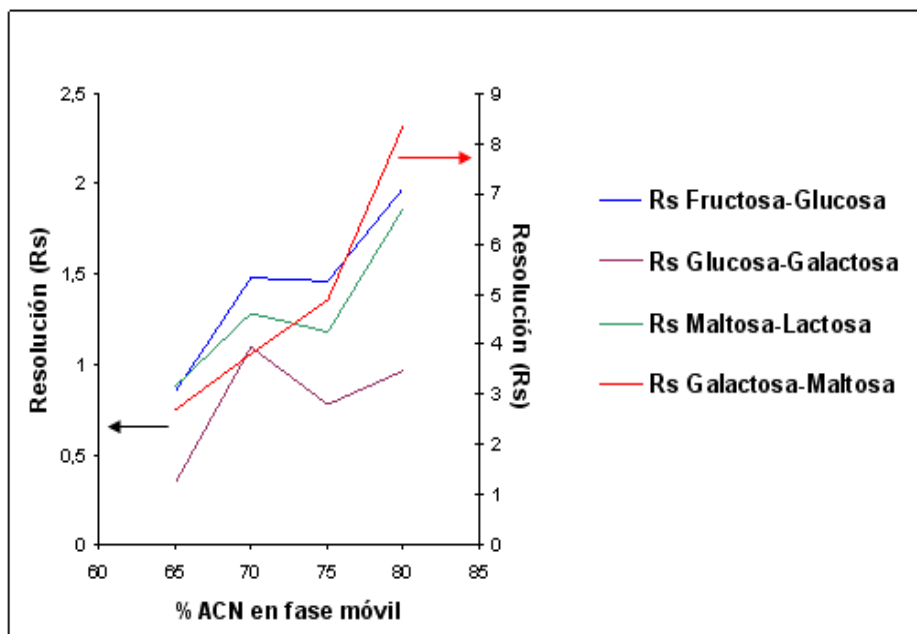


Figura 4.9. Efecto del % de disolvente orgánico en la resolución de la fructosa, glucosa, galactosa, maltosa y lactosa.

Es necesario por tanto buscar un compromiso entre una buena resolución y un tiempo de análisis razonable que no implique ensanchamiento de picos cromatográficos y pérdida de sensibilidad. Si nos fijamos en los resultados obtenidos utilizando una relación ACN:H₂O de 75:25 observamos como la resolución apenas presenta diferencias mientras que el tiempo de análisis se reduce a 16 minutos. Destaca también, que la proporción 90:10 de ACN:H₂O no fue capaz de eluir los carbohidratos. Esto se debe a que al estar trabajando en cromatografía en fase normal, donde la fase estacionaria es polar, se requiere de una fase móvil con un cierto contenido en disolvente polar para conseguir eluir los carbohidratos, ya que estos poseen una polaridad que viene marcada por sus grupos hidroxilo (Ver figura 3.2).

Se seleccionó por lo tanto como óptima una fase móvil con un contenido en acetonitrilo del 75%.

En la figura 4.10 se muestra el cromatograma resultante bajo los **valores óptimos** de los tres parámetros estudiados: flujo de fase móvil de 1mL/min, temperatura de la columna de 30°C y un 75% de ACN en la fase móvil.

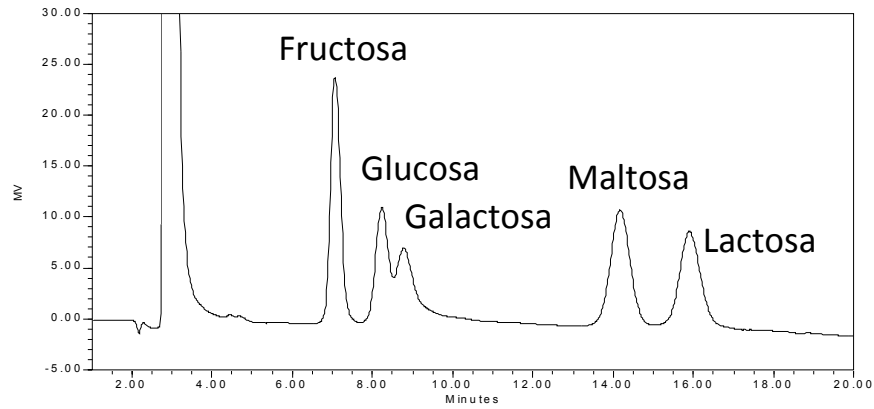


Figura 4.10. Cromatograma de elución de carbohidratos con los tres parámetros estudiados optimizados (Flujo = 1 mL/min, T^a columna = 30°C, %ACN en fase móvil = 75%).

A la vista de los resultados obtenidos las condiciones experimentales seleccionadas para optimizar la separación de los diferentes carbohidratos en el análisis cromatográfico fueron los siguientes:

- Flujo de fase móvil: 1mL/min
- Temperatura de la columna : 30°C
- Fase móvil ACN:H₂O: 75:25

4.2. ADECUACIÓN DE LOS PATRONES A LOS CONTENIDOS EN CARBOHIDRATOS DE MUESTRAS DE FORRAJES

4.2.1. DESARROLLO DE UN CALIBRADO DE MEDIDA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES

Con el objeto de poder determinar la concentración de carbohidratos en muestras de forrajes es necesario el desarrollo previo de un calibrado que relacione el área de pico del carbohidrato problema con su concentración.

Para ello, teniendo en cuenta el rango de variabilidad de forrajes (Ver apartado 1.1.1, tabla 1.3), se estableció un calibrado para cubrir el intervalo necesario de concentraciones, incluyendo todos los carbohidratos estudiados con Rs mayor de 1.

Tabla 4.10. Concentración de los patrones de los diferentes carbohidratos con resolución superior a 1.

	PATRÓN 1	PATRÓN 2	PATRÓN 3	PATRÓN 4	PATRÓN 5
	Concentración (mg/mL)				
Fructosa	0,20	0,25	0,50	1,00	2,00
Glucosa	0,30	0,40	0,80	2,00	4,00
Maltosa	0,75	1,00	2,00	4,00	6,00
Lactosa	0,75	1,00	2,00	4,00	6,00

En la figura 4.11 se muestran superpuestos los cromatogramas obtenidos para cada carbohidrato y concentración de los respectivos patrones.

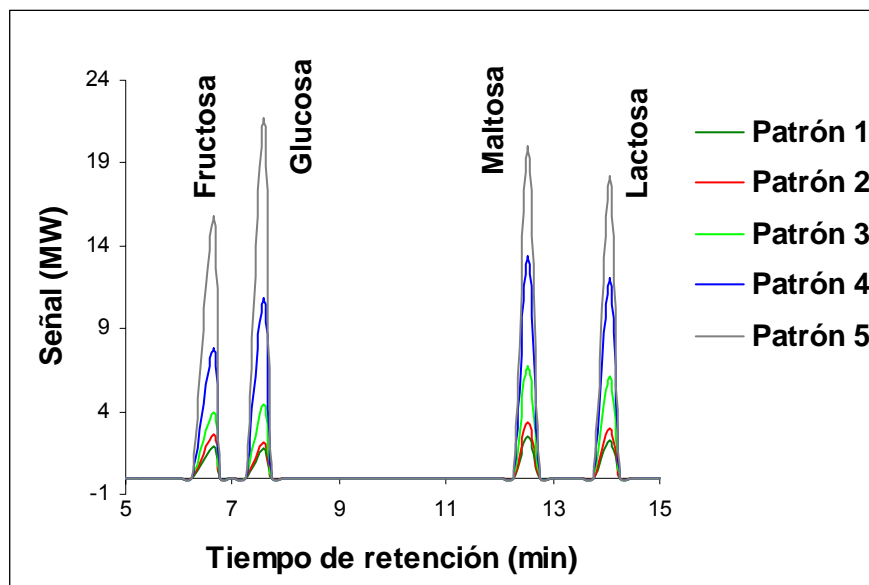


Figura 4.11. Cromatogramas obtenidos con los patrones de calibración de los carbohidratos.

En la figura 4.12 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los carbohidratos analizados con resolución superior a 1 (fructosa, glucosa, maltosa y lactosa), representando el área de pico y la concentración del carbohidrato.

Todas ellas presentan coeficientes de determinación de la calibración (R^2) superiores a 0,998, lo que garantiza una correcta cuantificación. En base a estas rectas de calibrado para cada uno de los carbohidratos se realizó la posterior cuantificación de los mismos en las muestras de forrajes.

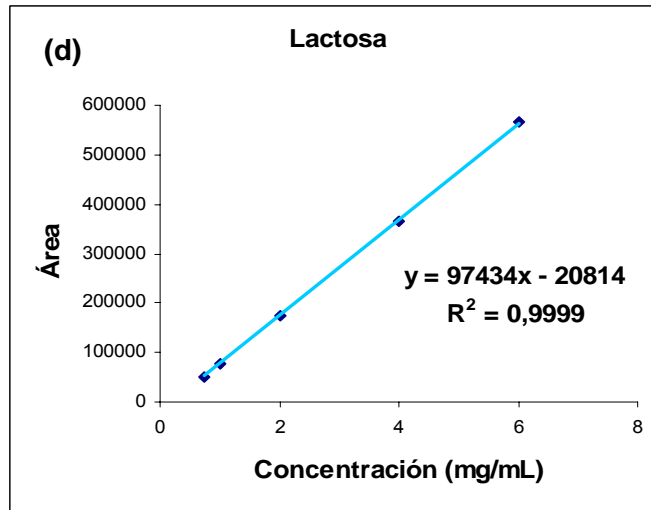
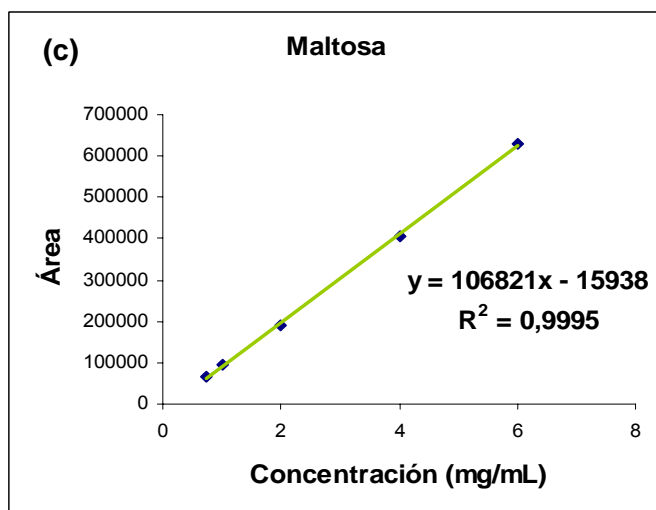
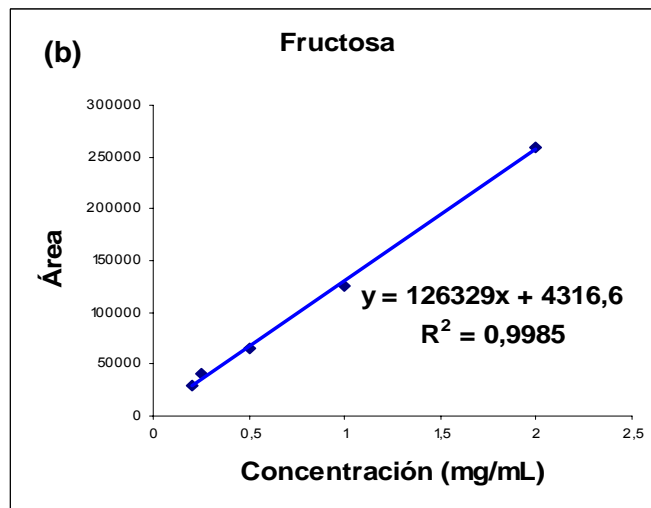
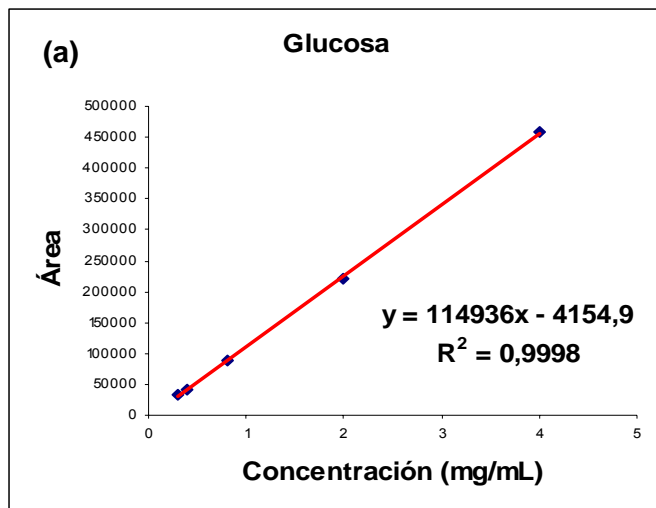


Figura 4.12. Rectas de calibrado para los patrones glucosa (a), fructosa (b), maltosa (c) y lactosa (d).

4.2.2. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

Para llevar a cabo la cuantificación de los carbohidratos solubles de una muestra de forraje, es necesario realizar una extracción de los mismos. En el presente trabajo se ensayaron dos alternativas de extracción (A1 y A2):

- A1: Extracción a 60°C e hidrólisis con HCl en ebullición (Hoffman, 1937).
- A2: Extracción a 90°C e hidrólisis con HCl a 80°C (Hall, 2013).

4.2.2.1. Alternativa 1 (A1)

La preparación de la muestra para el análisis se llevó a cabo siguiendo las pautas del procedimiento normalizado de trabajo (PNT) existentes en el laboratorio de Nutrición animal del SERIDA para la determinación espectrofotométrica de carbohidratos.

Se tomó una alícuota para inyectar en el cromatógrafo en diferentes etapas del proceso de extracción/hidrólisis (Ver figura 4.13):

- **Etapas 1:** Extracción con agua durante 30 minutos a 60°C
- **Etapas 2:** Precipitación y filtración
- **Etapas 3:** Hidrólisis con ácido clorhídrico en ebullición durante 2 minutos

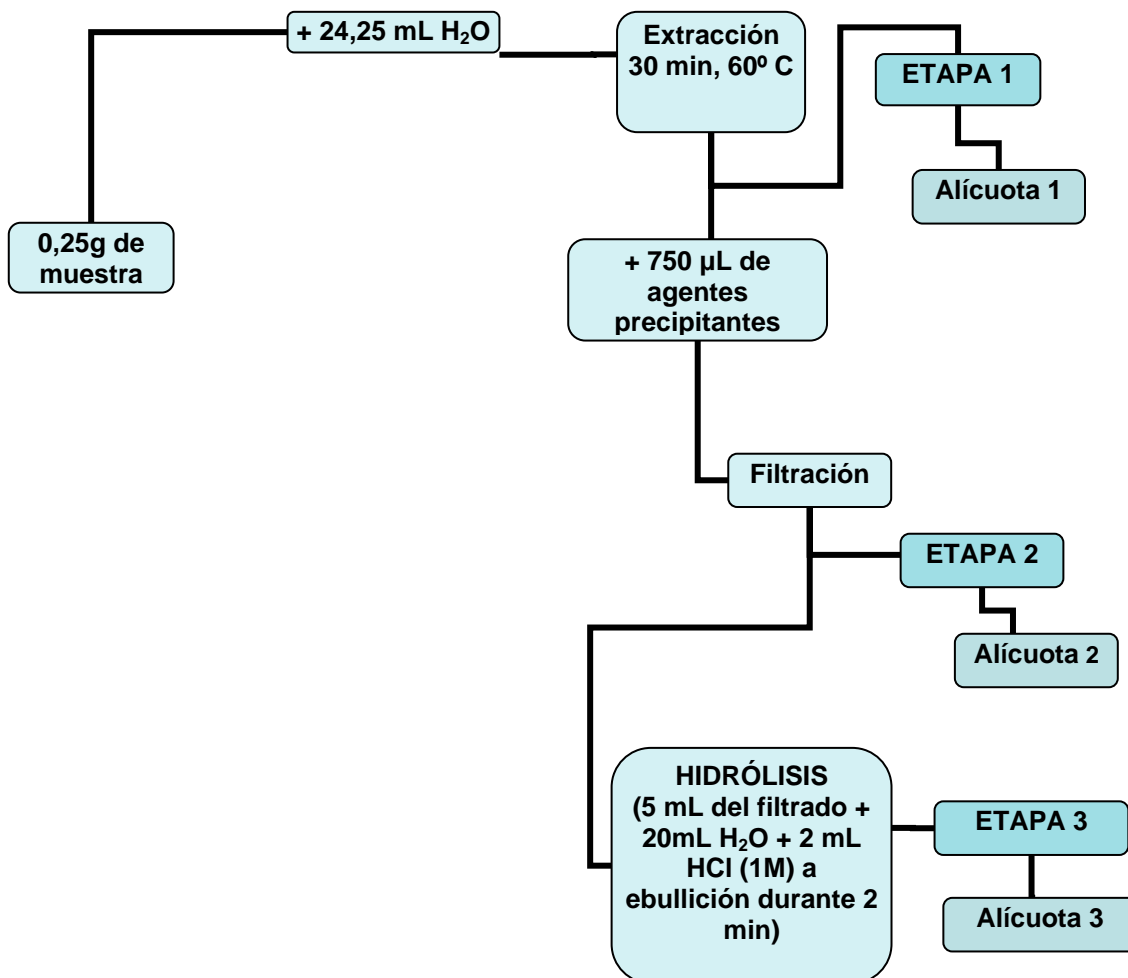


Figura 4.13. Esquema de las etapas de preparación de la muestra para la alternativa 1.

Para la evaluación y optimización del protocolo de preparación de muestras para el análisis se utilizaron dos de los forrajes descritos en el apartado 3.3 (un haba forrajera y un forraje verde mezcla de varias especies pratenses).

Se pesan 0,25 gramos de muestra tal y como tiene establecido la metodología del laboratorio (PNT – Laboratorio de Nutrición Animal) y se procedió a realizar el fraccionamiento en las diferentes etapas. La alícuota recogida en cada etapa ha de filtrarse a través de un cartucho C18 SepPac previamente activado mediante el paso de metanol, agua y aire a través del mismo. El filtrado es recogido en un vial HPLC de 2 mL donde se procedió a su análisis bajo las condiciones cromatográficas previamente descritas y optimizadas (Ver apartado 4.1).

Las figuras 4.14, 4.15 y 4.16 que se representan a continuación muestran los resultados obtenidos al analizar cada muestra en las diferentes etapas (1 y 2 previas a la hidrólisis y 3 posterior a la hidrólisis ácida).

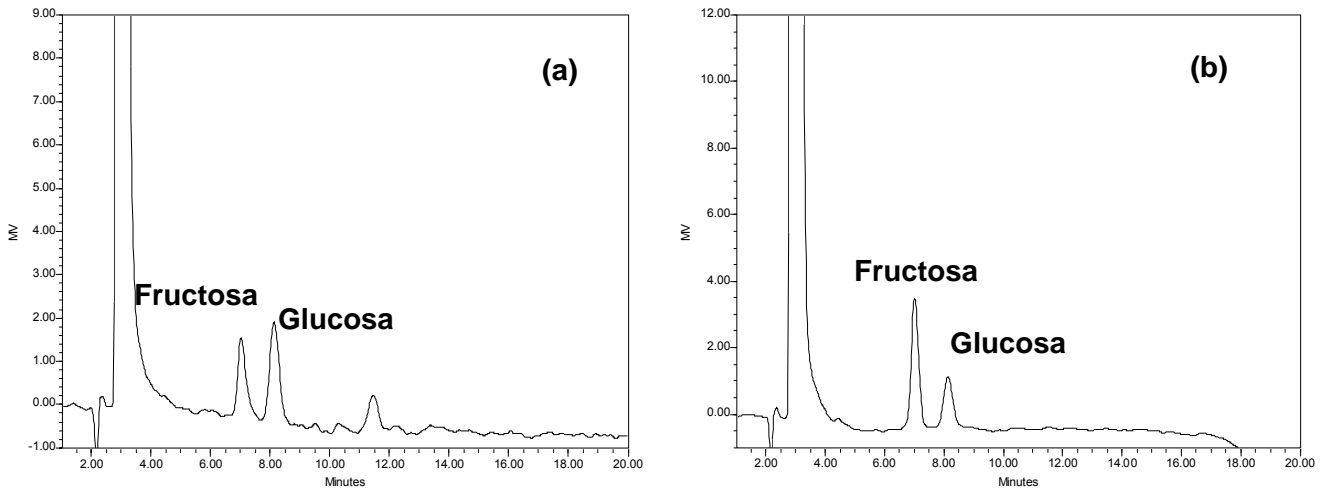


Figura 4.14. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 60°C durante 30 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

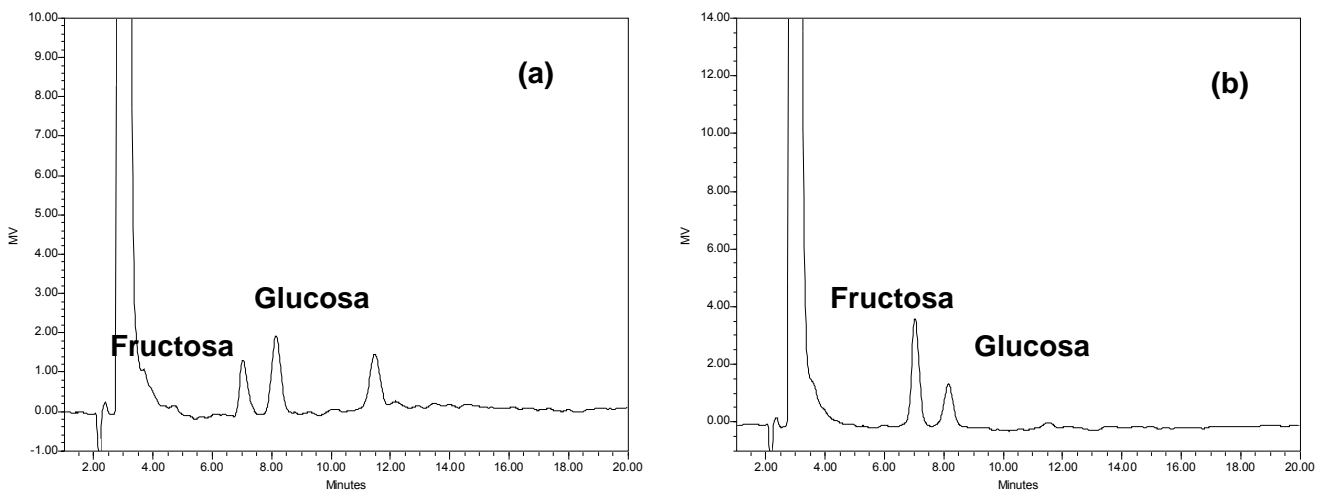


Figura 4.15. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra tras la etapa 2: precipitación y filtración, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

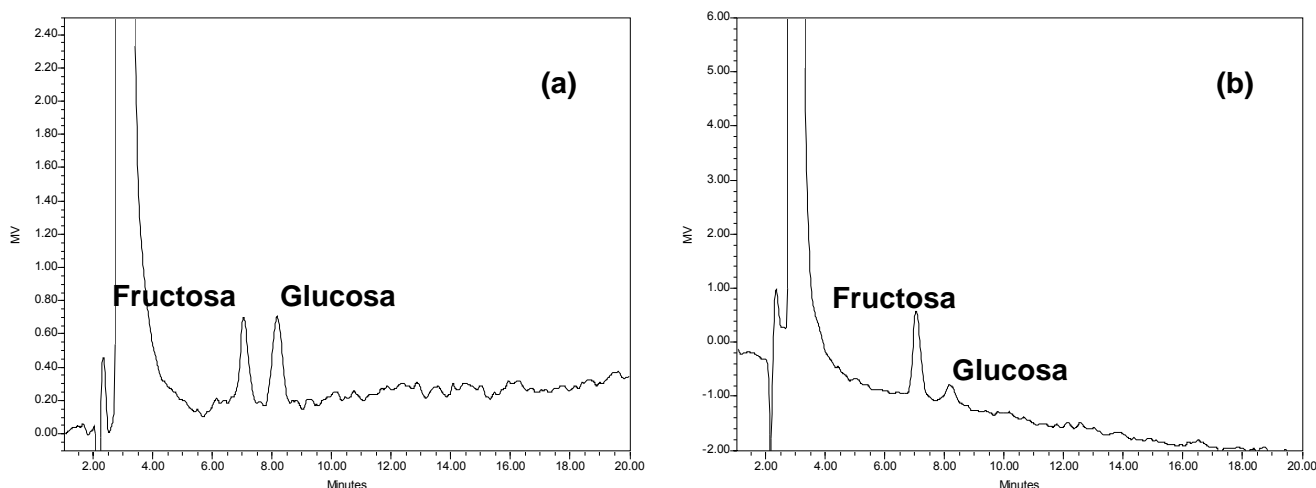


Figura 4.16. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra tras la etapa 3: hidrólisis con HCL en ebullición, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

Atendiendo a los resultados podemos afirmar que no existen diferencias entre las etapas 1 y 2. Sin embargo, en la etapa 3 (en la que se produce la hidrólisis de los oligo- y polisacáridos) se observan sólo los picos de la glucosa y la fructosa. La baja intensidad de los picos en esta etapa 3 está relacionada con las diluciones que sufre la muestra hasta este punto tal y como se detalla en la figura 4.13.

A la vista de los resultados obtenidos en las figuras 4.14, 4.15 y 4.16, podemos observar que la altura de los picos cromatográficos es muy baja, lo que significa que los carbohidratos de la muestra están muy diluidos (especialmente en la etapa 3 en la cual ya se ha realizado una hidrólisis con HCl).

Una alternativa para mejorar la cuantificación puede ser incrementar la cantidad de forraje a pesar (0,50 ó 0,75 gramos) manteniendo los volúmenes de disolvente en la extracción.

Teniendo en cuenta los resultados, los siguientes ensayos en el proceso de optimización se llevaron a cabo pesando 0,50 y 0,75 gramos de forraje y tomando extractos de las etapas 1,2 y 3.

En las figuras 4.17 y 4.18 se muestran los cromatogramas obtenidos pesando 0,50 gramos de forraje y con los extractos recogidos en las etapas 1 y 2 respectivamente.

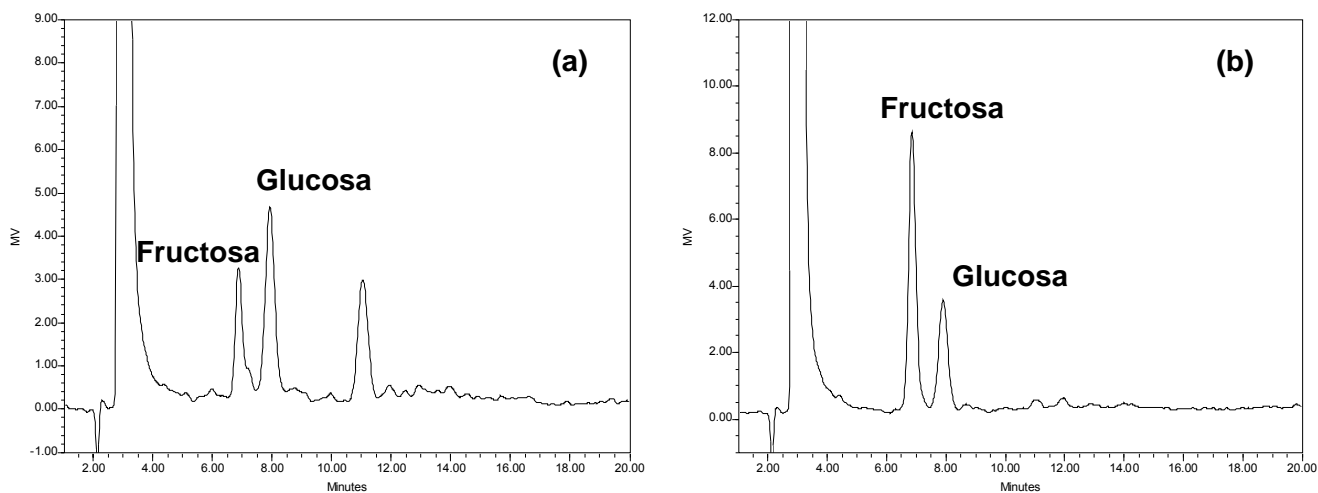


Figura 4.17. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,5 gramos tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 60°C durante 30 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

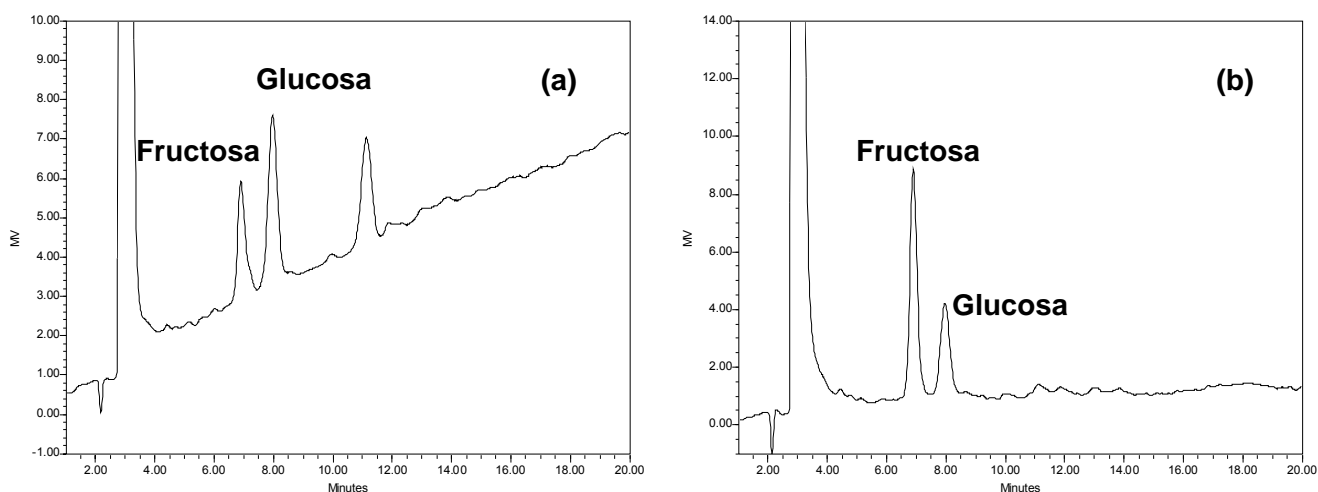


Figura 4.18. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,5 gramos tras la etapa 2: precipitación y filtración, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

Del mismo modo en las figuras 4.19 y 4.20 se recoge la información cromatográfica obtenida utilizando 0,75 gramos de forraje.

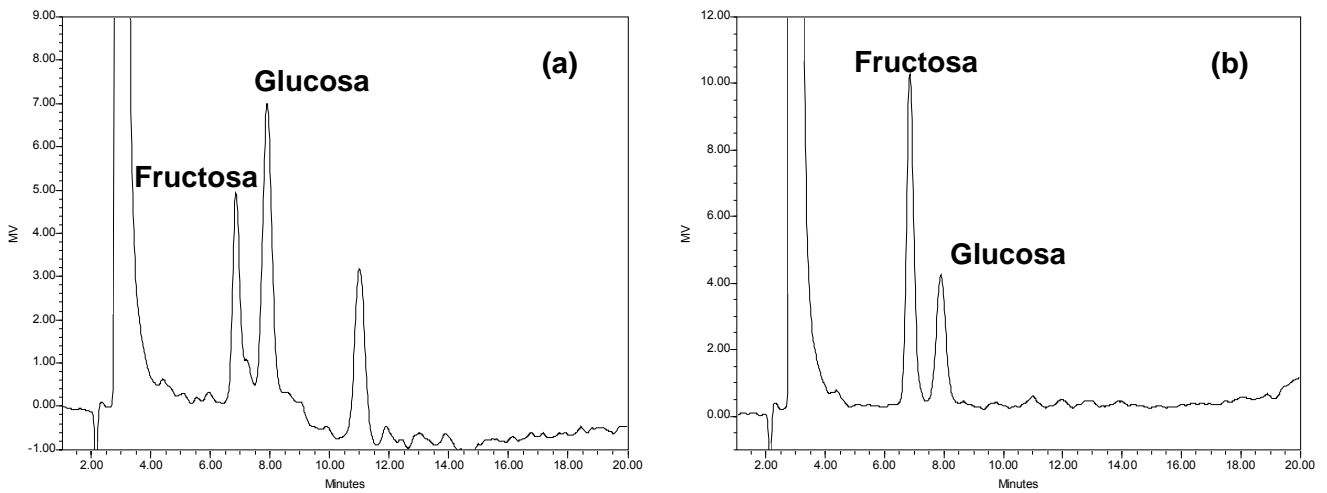


Figura 4.19. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,75 gramos tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 60°C durante 30 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

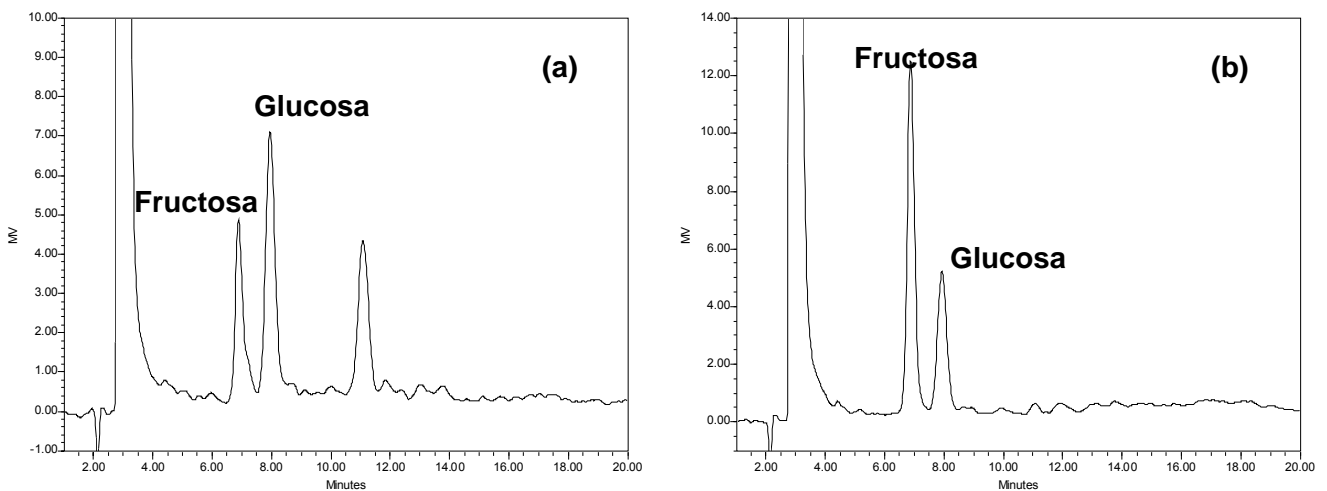


Figura 4.20. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,75 gramos tras la etapa 2: precipitación y filtración, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

Atendiendo a los resultados reflejados en las figuras 4.17, 4.18, 4.19 y 4.20, se confirma que utilizando **0,75 g** de muestra, las intensidades de las señales obtenidas son más elevadas y se mejora la cuantificación del área de los picos cromatográficos. Por lo que se selecciona este peso de muestra para el análisis posterior de los forrajes.

Respecto a las diferentes etapas dónde se ha tomado la muestra para su medida, apenas se observan diferencias significativas entre las señales, por lo que se selecciona la opción más sencilla, que es tomar la muestra en la **etapa 1**, minimizando así el pretratamiento de la muestra.

Seleccionando este peso de 0,75 gramos de forraje se repitió el ensayo recogiendo la fracción de muestra a analizar extraída después de la hidrólisis con HCl en ebullición. En la figura 4.21 se muestran los cromatogramas obtenidos en estas condiciones.

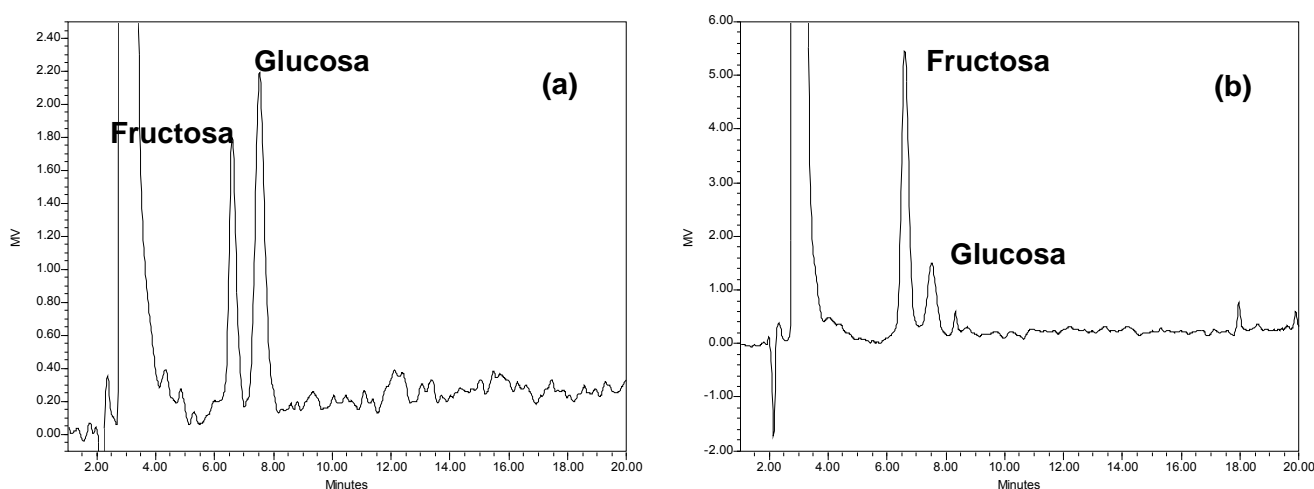


Figura 4.21. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,75 gramos tras la etapa 3: hidrólisis con HCl en ebullición, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

La evaluación comparativa de los cromatogramas de cada una de las etapas del proceso de pretratamiento de la muestra, pone de manifiesto, que en el caso de las habas forrajeras el tercer pico (no identificado) (Figuras 4.19 y 4.20), podría ser un carbohidrato que tras la hidrólisis desaparece transformándose en glucosa y/o fructosa. Con respecto al forraje verde señalar que la hidrólisis de los oligo- y polisacáridos presentes en el forraje proporcionan un incremento apreciable en el contenido de fructosa de las muestras. La cuantificación exacta de cada uno de estos carbohidratos se evaluará en el apartado 4.2.3. (Estudio comparativo de los resultados de análisis de muestras).

4.2.2.2. Alternativa 2 (A2)

La preparación de la muestra para el análisis se llevó a cabo siguiendo las pautas descritas en la bibliografía (Hall, 2013). Existen diferentes etapas en las que se tomó una alícuota para inyectar en el cromatógrafo (Ver figura 4.22):

- **Etapa 1:** Extracción con agua durante 60 minutos a 90°C
- **Etapa 2:** Hidrólisis con ácido clorhídrico durante 90 minutos a 80°C

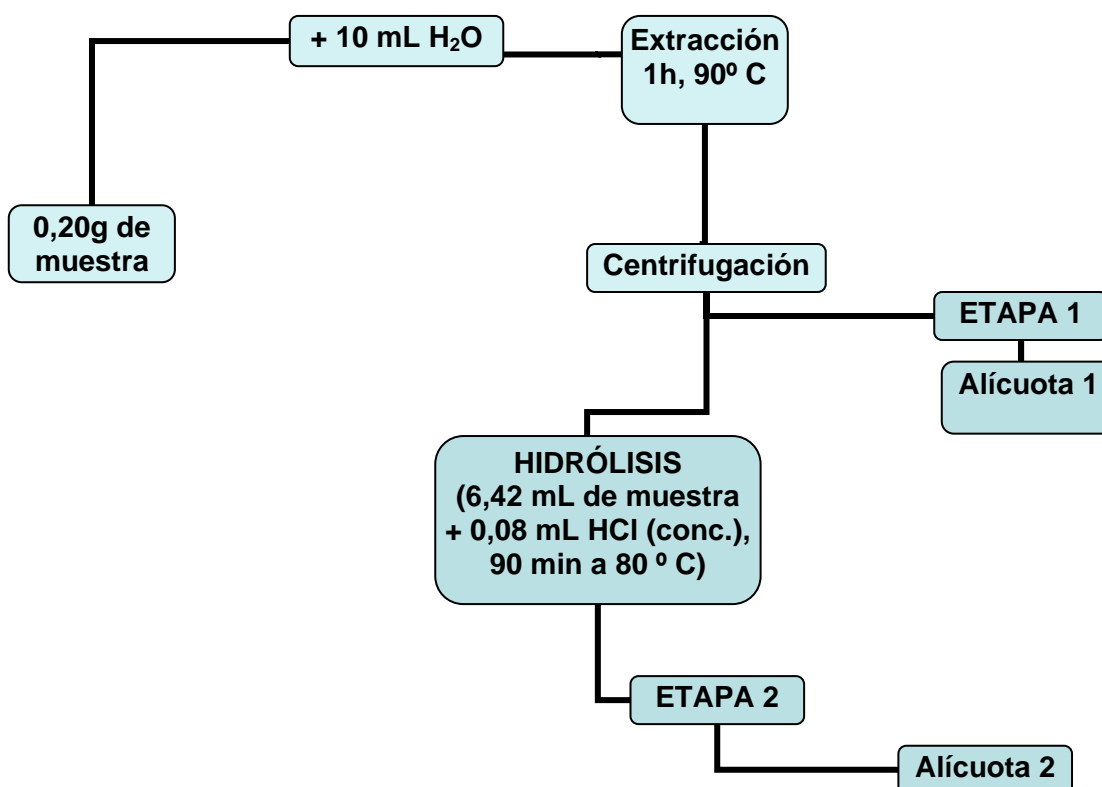


Figura 4.22. Esquema de las etapas de preparación de la muestra para la alternativa 2.

Se analizaron de nuevo las muestras de haba forrajera y forraje verde siguiendo la alternativa 2 (Ver figura 4.22) con el objeto de llevar a cabo a posteriori un estudio comparativo entre los resultados obtenidos siguiendo las alternativas 1 y 2.

En las figuras 4.23 y 4.24 se muestran los resultados obtenidos del análisis de forrajes en las distintas etapas de esta segunda alternativa.

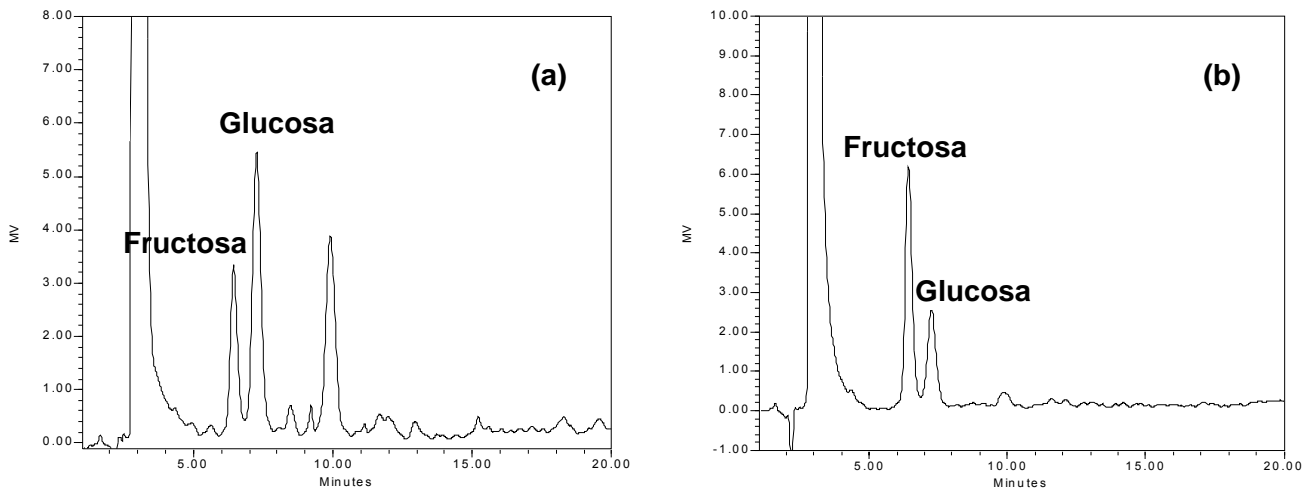


Figura 4.23. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,20 gramos tras la etapa 1: extracción en agua caliente a 90°C durante 60 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

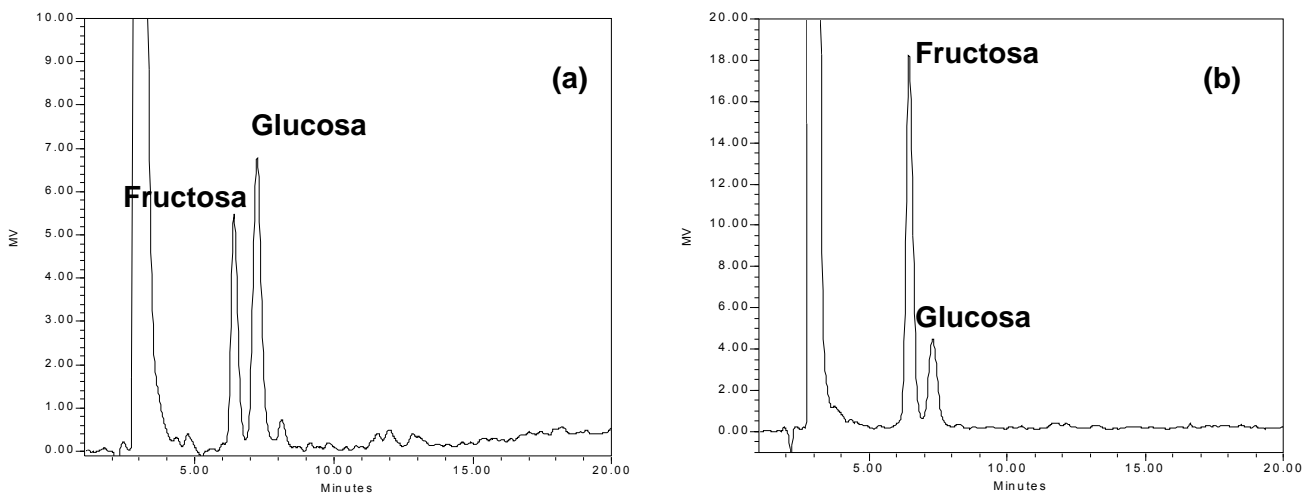


Figura 4.24. Cromatograma obtenido al analizar la fracción de muestra de 0,20 gramos tras la etapa 2: hidrólisis con ácido clorhídrico durante 90 minutos, (a) Haba forrajera, (b) Forraje verde.

Los resultados cualitativos obtenidos son similares a los de la estrategia 1. Señalar además que en la etapa 1, el tercer pico (no identificado) que se observa en el cromatograma de las habas forrajeras (Figura 4.23 (a)) es mayor con este modo de extracción, a temperaturas más elevadas, que el que se aprecia en la estrategia 1 (Figuras 4.19 y 4.20 (a)). Con respecto al forraje verde, los resultados cualitativos son similares.

4.2.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE FORRAJES

Se llevó a cabo el análisis de distintas muestras de forrajes mediante el método espectrofotométrico clásico utilizado en el laboratorio (Ver apartado 1.1.3) y, mediante la metodología HPLC desarrollada en este trabajo de investigación, siguiendo las dos alternativas de extracción evaluadas (Ver apartados 4.2.2.1 y 4.2.2.2) con el fin de poder llevar a cabo un estudio comparativo entre los diferentes procedimientos de análisis de carbohidratos solubles en forrajes.

Las tres muestras de forrajes (haba forrajera prehenificada, raygrass deshidratado y forraje verde prehenificado) fueron analizadas recogiendo alícuotas en las distintas etapas de pretratamiento de la muestra descritas en el apartado anterior (Ver figuras 4.13 y 4.22) y siguiendo el procedimiento normalizado de trabajo del método espectrofotométrico clásico (Ver figura 1.1).

Se utilizó el ray-grass deshidratado procedente de un ensayo de intercomparación acreditado (BIPEA), y que disponía de valor de referencia asignado por consenso, entre los 8 laboratorios europeos participantes, para evaluar la **exactitud** de la metodología clásica por espectrofotometría y de las alternativas ensayadas. Asimismo, se evaluó el parámetro z-score para estimar la dispersión de los resultados obtenidos con respecto al valor asignado, considerando una distribución normal, dónde:

$$z\text{-score} = (\text{Valor medido} - \text{Valor asignado}) / \text{Desviación estándar de la población (n=8)}$$

y considerando que $z\text{-score} \leq |2|$ indica que el valor de la propiedad está dentro del intervalo de aceptación con una probabilidad del 95%. En la tabla 4.11 se muestran de forma comparada los resultados obtenidos.

Tabla 4.11. Estudio comparativo de la exactitud entre las diferentes metodologías ensayadas en una muestra de ray-grass deshidratado.

	% TOTAL DE CARBOHIDRATOS	VALOR DE REFERENCIA	EXACTITUD	Z-SCORE
	METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA CLÁSICA			
	16,20	11,80	137	1,43
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 1			
Etapa 1	6,75	11,80	57	1,64
Etapa 2	6,88	11,80	58	1,60
Etapa 3	14,03	11,80	118	-0,72
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 2			
Etapa 1	7,20	11,80	59	-1,60
Etapa 2	9,74	11,80	82	-0,67

A la vista de los resultados podemos afirmar que:

- Considerando la alternativa 1, los mejores resultados se obtuvieron en la Etapa 3, utilizando 0,75 g de muestra, extracción a 60°C y ebullición con HCl. En estas condiciones se obtuvo un error por exceso en el valor analítico con respecto al valor de referencia del 19%, y siempre dentro del intervalo de aceptación del intercomparativo ($|z| = 0,72$).
- Considerando la alternativa 2, los mejores resultados se obtuvieron en la Etapa 2, con 0,20 g de muestra, extracción a 90°C, e hidrólisis ácida a 80°C. Los resultados obtenidos tuvieron un error por defecto del 17% respecto al valor de referencia y siempre dentro del intervalo de aceptación del ejercicio de intercomparación ($|z| = 0,67$).

En ambos casos se obtuvieron exactitudes superiores a la alcanzada con el método espectrofotométrico, que dentro del intervalo de aceptación presentó un error por exceso del 37% frente al valor asignado y un $|z| = 1.43$.

Con el fin de evaluar la **reproducibilidad** de las metodologías desarrolladas, se analizaron por triplicado los tres forrajes verdes descritos en el apartado 3.3 de Material y métodos. La reproducibilidad se evaluó en base al coeficiente de variación y los resultados se muestran en las tablas 4.12, 4.13 y 4.14.

Los resultados muestran que en términos generales el método cromatográfico presenta coeficientes de variación más bajos que el método espectrofotométrico y siempre inferiores al 5%.

Tabla 4.12. Estudio comparativo de la reproducibilidad entre las diferentes metodologías ensayadas en muestra de ray-grass deshidratado.

	% FRUCTOSA	% GLUCOSA	% MALTOSA	% LACTOSA	% TOTAL DE CARBOHIDRATOS	COEFICIENTE VARIACIÓN (CV)
	METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA CLÁSICA					
	0,00	16,20	0,00	0,00	16,20	6,58
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 1					
Etapa 1	4,07	2,68	0,00	0,00	6,75	1,13
Etapa 2	4,22	2,66	0,00	0,00	6,88	1,18
Etapa 3	11,01	3,02	0,00	0,00	14,03	2,18
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 2					
Etapa 1	4,36	2,84	0,00	0,00	7,20	1,78
Etapa 2	7,83	1,91	0,00	0,00	9,74	1,58

Tabla 4.13. Estudio comparativo de la reproducibilidad entre las diferentes metodologías ensayadas en muestra de forraje verde prehenificado.

	% FRUCTOSA	% GLUCOSA	% MALTOSA	% LACTOSA	% TOTAL DE CARBOHIDRATOS	COEFICIENTE VARIACIÓN (CV)
	METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA CLÁSICA					
	0,00	20,33	0,00	0,00	20,33	1,55
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 1					
Etapa 1	5,67	3,19	0,00	0,00	8,85	1,01
Etapa 2	5,73	3,18	0,00	0,00	8,91	1,44
Etapa 3	12,28	4,37	0,00	0,00	16,64	0,28
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 2					
Etapa 1	3,75	2,11	0,00	0,00	5,87	1,95
Etapa 2	7,71	2,38	0,00	0,00	10,08	0,75

Tabla 4.14. Estudio comparativo de la reproducibilidad entre las diferentes metodologías ensayadas en muestra de haba forrajera prehenificada.

	% FRUCTOSA	% GLUCOSA	% MALTOSA	% LACTOSA	% TOTAL DE CARBOHIDRATOS	COEFICIENTE VARIACIÓN (CV)
	METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA CLÁSICA					
	0,00	15,43	0,00	0,00	15,43	5,24
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 1					
Etapa 1	1,90	4,47	0,00	0,00	6,37	2,07
Etapa 2	2,13	4,45	0,00	0,00	6,58	1,78
Etapa 3	2,81	6,50	0,00	0,00	9,31	3,96
	METODOLOGÍA HPLC, Alternativa 2					
Etapa 1	1,78	4,65	0,00	0,00	6,43	1,11
Etapa 2	2,06	3,86	0,00	0,00	5,93	1,59

5. CONCLUSIONES

1. La metodología cromatográfica propuesta es una buena alternativa con respecto a la metodología espectrofotométrica clásica del laboratorio para la cuantificación de carbohidratos solubles, ya que resultó más exacta y precisa.
2. Las dos alternativas de análisis por HPLC propuestas, permiten cuantificar los carbohidratos totales tras la hidrólisis ácida.
3. El análisis por HPLC permite reducir el coste analítico al disminuir en más de un 50% el tiempo del análisis y necesitar menos reactivos. Asimismo, se disminuye también la generación de residuos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Albalasmeh, Ammar A., Asefaw Berhe, Asmeret. y Ghezzehei, Teamrat A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*. 97, 253 - 261.

Amer, S., Hassanat, F., Berthiaume, R., Seguin, P. y Mustafa, A.F. (2012). Effects of water soluble carbohydrate content on ensiling characteristics, chemicals composition and in vitro gas production of forage millet and forage sorghum silages. *Animal Feed Science and Technology*. 177, 23 - 29.

Barnes, R. (1995). Forages in a changing World. In Forages, Vol. 1: An Introduction to Grassland Agriculture. *Iowa State University Press*, 2 - 13.

CE-2009. Reglamento (CE) nº 152/2009 de la comisión europea por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.

Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Hernáinz-Bermúdez de Castro, M. y Fernández-Gutiérrez, A. (2004). Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection. *Food Chemistry*. 87, 471 - 476.

De la Roza, B. y Martinez, A. (1996). Pérdidas de los ensilados. *Tecnología Agroalimentaria*. C. I. A. T. A. 6, 4 pp.

De la Roza, B. (2003). El ensilado como método de conservación de forrajes. Informe técnico. SERIDA. KRK ediciones, 61pp.

Demarquilly, C. (1973). Composition chimique, caractéristiques fermentaires, digestibilité et quantité ingérée des ensilages de fourrages : modifications par rapport au fourrage vert initial. *Ann. Zootech.* 22, 1 - 35.

Dulphy, J.R., y Demarquilly, C. (1981). Problèmes particuliers aux silages. *Previsión de la valeur nutritive des aliments des ruminants*, 81 - 104.

Eyégghé-Bickong, H.A., Alexandersson, E.O., Gouws, L.M., Young, P.R. y Vivier, M.A. (2012). Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography*. 885-886, 43 - 49.

Ferrer, C., San Miguel, A. y Olea, L. (2001). Nomenclator básico de pastos en España. *Pastos*, 31 (1), 7 - 44.

Forage and Grazing Terminology Committee. (1991). Terminology for grazing lands and grazing animals. Pocahontas Press, Inc., Blacksburg, Virg.

Glyad, V.M. (2002). Determination of monosaccharides, disaccharides, and oligosaccharides in the same plant sample by high-performance liquid chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology*. 49, 277 - 282.

Haigh, P. M. (1987). The effect of DM content and silage additives on fermentation of grass silage and commercial farms. *Grass and Forage Science*. 42, 1 - 8.

Hall, M.B. (2013). Efficacy of reducing sugar and phenol-sulfuric acid assays for analysis of soluble carbohydrates in feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 185, 94 - 100.

Harrison, J., Gallagher, J.A. y Pollock, C.J. (1997). A simple and rapid method for the analysis of water-soluble carbohydrates from small segments of cereal leaf tissue. *Journal of Plant Physiology*. 151, 654 - 659.

Hoffman, W. S., (1937). A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. *J. Biol. Chem*, 120, 51 - 55.

Institut National de la Recherche Agronomique (1981). Prévission de la valeur nutritive des aliments des ruminants. Ed. : I.N.R.A publications. Versailles (France). 590 pp.

Knudsen, K.E.B, (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science Technology*. 67, 319 - 338.

Liu, Z., Mouradov, A., Smith, K.F. y Spangenberg, G. (2011). An improved method for quantitative analysis of total fructants in plant tissues. *Analytical Biochemistry*. 418, 253 - 259.

Martínez-Fernández, A. (1994). Evolución de la aptitud para ensilar de las especies pratenses: *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* y *Dactylis glomerata*. Seminario de investigación. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo. España. 25 pp.

Martínez-Fernández, A. (2003). Ensilabilidad de especies pratenses en Asturias. *Tesis doctoral*. Universidad de Oviedo. 450 pp.

Martínez-Fernández, A., De la Roza, B. y Fernández García, O. (1998). Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados. *Tecnología Agroalimentaria*. Edit: Centro de investigación aplicada y tecnología agroalimentaria. Año III. Nº 2.

Martínez-Fernández, A., González Arrojo, M., Soldado, A. y Argamentería A. (2011). Obtención de un índice de ensilabilidad adaptado a zonas templado-húmedas a partir de una población de forrajes de parámetros de ensilabilidad conocida. En: Pastos, paisajes culturales entre la tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI. (Eds) López-Carrasco *et al.*, Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, 381 – 386, Toledo (España).

Martínez-Fernández, A., Soldado, A., de la Roza-Delgado, B., Vicente, F., González-Arrojo, M.A. y Argamentería, A. (2013). Modelling a quantitative ensilability index adapted to forages from wet temperate areas. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11 (2), 455 - 462.

McDonald, P., Henderson, A.R. y Heron, S.J.E. (1991). *The Biochemistry of Silage*. Chapter 2: Crops for Silage. Chalcome publications. Great Britain. 19 - 80.

Melvin, J. F. (1965). Variations in the carbohydrate content of lucerne and the effect on ensilage. *Australian Journal of Agricultural Research*. 16, 951 - 959.

Minson, D. J. (1982). Effect of chemical composition on feed digestibility and metabolizable energy. *Nutr. Abs Rev. (B)*. 52, 591 - 615.

O'Kiely, P. (1977). The use of additives: Effects on conservation and nutritive value. En: Actas del seminario "Uso de aditivos para ensilados. Valor nutritivo, estabilidad aeróbica y control medioambiental". Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria. Villaviciosa. 46 pp.

O'Kiely, P., Flinn, V. y Poole, D. B R. (1989). Sulphuric acid as silage preservative. 1. Silage preservation, animal performance and copper status. *Irish. J. Agric. Res.* 28, 1 - 9.

Raessler, M., Wissuwa, B., Breul, A., Unger, W. Y Grimm, T. (2008). Determination of water-extractable nonstructural carbohydrates, including inulin, in grass samples with high-performance anion Exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56, 7649 - 7654.

Raymond, F., Shepperson, G. y Wajtham, R. (1977). *Forraje. Conservación y Alimentación*. Ediciones GEA. Barcelona.

San Miguel, A. (2001). Pastos naturales españoles. Caracterización, aprovechamiento y posibilidades de mejora. Coedición Fundación Conde del Valle de Salazar- Mundi-Prensa. 320pp.

Skoog, D.A., Holler, F.J. y Nieman, T.A. (2001). *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill. 5ª Edición. ISBN: 84-481-2775-2000.

Wang, H., Zhang, Z., Liang, L., Wen, S., Liu, C. Y Xu, X. (2010). A comparative study of high-performance liquid chromatography and colorimetric method for inulin determination. *European Food and Research Technology.* 230, 701 - 706.

Wilson, J.R. y Ford, C.W. (1971). Temperature influences on the growth, digestibility, and carbohydrate compositions of two tropical grasses, *Panicum maximum* var *Trichoglume* and *Setaria sphacelata*, and two cultivars of the temperate grass *Lolium perenne*. *Australian Journal of Agricultural Research* 22 (4) 563 - 571.

ANEXO I:**CONTINUACIÓN PARA FUTUROS TRABAJOS**

Con el propósito de ver la aplicabilidad de la metodología propuesta a otras muestras de diferente naturaleza, se analizó con el método cromatográfico una muestra de pienso de lechones, procedente de un excedente de un ensayo de intercomparación (ASFAC-LAB) con valores asignados por consenso tanto para carbohidratos reductores (Etapa 1 en alternativas 1 y 2) como totales (Etapas 2 y 3 en las alternativas 1 y 2 respectivamente). Los resultados son satisfactorios y similares a los obtenidos para forrajes como se muestra en la tabla A.I.

Tabla A.I. Evaluación de la exactitud y la reproducibilidad en muestras de pienso de lechones.

			VALOR ASIGNADO	VALOR MEDIDO	EXACTITUD	COEFICIENTE VARIACIÓN (CV)
Espectrofotometría			5,58	6,14	110	15,4
HPLC	Alternativa 1	Etapa 1	1,91	1,96	103	6,96
		Etapa 3	5,58	4,96	89	0,72
	Alternativa 2	Etapa 1	1,91	1,82	95	12,22
		Etapa 2	5,58	3,24	59	2,23

Si bien, estos resultados son muy preliminares por lo que es necesario continuar los estudios para validar la metodología propuesta en otros alimentos.