

Validación de la metodología ICUMSA “Draft Method N° 3” para determinar la concentración de almidón en jugos de caña de azúcar*

B. Silvia Zossi**, Natalia Sorol**, Marcos Sastre** y R. Marcelo Ruiz**

RESUMEN

En la caña de azúcar, el almidón cumple una función de reserva energética, dependiendo su concentración de la variedad y estado de madurez. Este microcomponente ingresa junto con la caña al proceso de fabricación de azúcar, originando problemas durante las distintas etapas de elaboración y en el producto final, cuando se emplea el azúcar como materia prima para la elaboración de otros alimentos. Debido a esto, su cuantificación durante las distintas etapas de fabricación es común en la industria de procesos, a fin de disminuir sus efectos negativos mediante el empleo de la enzima α -amilasa, cuando su contenido excede los valores normales. En la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, trabajando bajo un sistema de gestión de la calidad de los laboratorios, se busca continuamente actualizar y reemplazar las metodologías vigentes por aquellas que permitan obtener mejores resultados. Por este motivo se validó la aplicación del “Draft Method N° 3” de la International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA) para la determinación de almidón en jugos de caña de azúcar, debido a su sencillez, rapidez y bajo costo, comparado con los métodos usados anteriormente en el laboratorio. Se determinaron parámetros para establecer su repetibilidad, reproducibilidad e incertidumbre. Los resultados obtenidos demostraron que esta técnica es aceptable para determinar almidón en jugo de caña de azúcar en concentraciones comprendidas entre 43,75 mg/l y 500 mg/l, con una incertidumbre de $\pm 6,22\%$, utilizando un factor de cobertura (K) igual a 2.

Palabras clave: técnica analítica; incertidumbre; almidón; jugo de caña de azúcar.

ABSTRACT

Validation of ICUMSA Draft Method No. 3 to determine starch concentration in sugar cane juice

In sugar cane, starch plays a role as energy reservoir and its concentration depends on cane variety and maturity level. This microcomponent interferes with sugar cane manufacturing process, producing problems at different production stages and influencing final products, whenever sugar is used as feedstock for food production. Starch quantification at different production stages is common in process industry, where α -amylase enzyme is used to diminish the negative effects arising from an excess in starch contents. The laboratory of Sección Química of Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, working under a certified quality management system, always strives to update and replace methodologies with those which produce better results. Thus the application of ICUMSA Draft Method No. 3 was validated for determining starch in sugar cane juice, on account of its simplicity, quick results and the low costs incurred in its use, as compared with other methods previously used in the lab. Parameters were determined to establish its repeatability, reproducibility and uncertainty degrees. Results showed that this technique is appropriate for determining starch in sugar cane juice at concentrations between 43.75 and 500 mg/l, with an uncertainty of $\pm 6.22\%$ when a security factor of 2 was used.

Key words: analytical method; uncertainty; starch; sugar cane juice.

* Trabajo presentado (con modificaciones) en el V Congreso Virtual Iberoamericano Gestión de Calidad en Laboratorios (junio de 2009, Barcelona, España).

** Sección Química de Productos Agroindustriales, EEAOC. silviazossi@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN

En la caña de azúcar, el almidón está localizado en los nudos del tallo y no en las áreas internodales, por lo que cualquier factor de crecimiento que incremente el número de nudos por tallo aumentará el nivel de almidón en el jugo. Existe también en altas concentraciones en las hojas y ápice de la caña (Clarke, 1996).

La concentración de almidón en caña depende de la variedad y su estado de madurez. Tiene la función de reserva energética, la cual comparte, en forma alternada, con la sacarosa. El almidón pasa al jugo durante el proceso de molienda, presentándose en forma de gránulos esféricos de diámetro comprendido entre 1 y 5 μm , insolubles y fácilmente removibles por filtración, centrifugación y decantación. A pesar de esto, durante la molienda, estos gránulos se dispersan rápidamente en el jugo y son luego gelatinizados por el calor y la cal durante la clarificación (Godshall *et al.*, 1990), razón por la cual su presencia en el jugo de caña de azúcar es indeseable desde el punto de vista del control de calidad.

Dependiendo de la variedad de caña, el contenido de almidón en los jugos puede variar normalmente desde 200 mg/l % Brix hasta 1200 mg/l % Brix (Godshall *et al.*, 2004). En la Tabla 1 se presentan concentraciones de almidón de las variedades comerciales más difundidas de Tucumán (Zossi *et al.*, 2010).

Tabla 1. Valores promedio de almidón en las variedades comerciales de caña de azúcar más difundidas en Tucumán.

Variedad	Concentración de almidón (mg/kg % Bx)
TUC 77-42	2640
LCP 85-384	2128
RA 87-3	2274
CP 65-357	2735

A su vez, como reporta la bibliografía, el almidón junto con las gomas y otros polisacáridos, contribuye a la formación de flóculos en bebidas carbonatadas (van der Poel *et al.*, 1998) y genera problemas operativos en la etapa de filtración del jarabe de azúcar, dándole un aspecto de turbidez u opalescencia que incide negativamente en la calidad y aspecto de las bebidas.

Por estas razones, es importante poder determinar de manera rápida y confiable el contenido de almidón en las diferentes etapas de un proceso, ya que cuando se encuentra en concentraciones mayores a las normales es necesario eliminarlo, empleando la enzima específica para su hidrólisis (α -amilasa), disminuyendo así los efectos negativos que este polisacárido puede tener.

Recientemente, la International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA, 2007) esta-

bleció un método "draft" para determinar almidón en productos azucarados, el cual aún no fue estadísticamente validado por lo que no tiene el carácter de "Método ICUMSA", pero está disponible para que los usuarios de estas metodologías realicen estudios más profundos.

Esta técnica se basa en la capacidad del almidón de formar en medio ácido un complejo almidón – yoduro de color azul violeta, en presencia de yodo – yodato, que puede medirse a 570 nm empleando un espectrofotómetro. Debido a su sencillez, rapidez y bajo costo, el Laboratorio de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) decidió validarla para implementarla en sus determinaciones de almidón en jugos de caña de azúcar.

El objetivo del presente artículo es validar la metodología para cuantificar almidón en jugo de caña de azúcar presentada por ICUMSA y denominada "Draft Method N° 3", calculando parámetros que determinen su repetibilidad, reproducibilidad e incertidumbre para las condiciones del Laboratorio de Investigaciones Azucareras de la Sección Química de la EEAOC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación de las soluciones patrón se usó almidón soluble pro análisis marca Carlo Erba. Luego de determinar su contenido de humedad, se preparó una solución patrón de 1000 mg/l y a partir de ella, por diluciones, las soluciones empleadas en la validación. El agua destilada empleada en la preparación de estas tenía una conductividad menor que 5 μS .

Se trabajó con material de vidrio (matraces, pipetas) clase A.

Se empleó un espectrofotómetro UV – Visible Hewlett Packard con arreglo de diodos, modelo 8452A, verificado con referencias trazables al National Institute of Standards and Technology (NIST).

En el estudio se consideró de importancia validar los siguientes parámetros (Zossi *et al.*, 2008):

- **Linealidad e intervalo operativo.** Para determinar la linealidad y el intervalo operativo de este método se prepararon soluciones patrón, por triplicado, de concentraciones comprendidas entre 0 mg/l y 1000 mg/l de almidón, y se graficó luego la absorbancia en función de la concentración. Empleando regresión lineal se obtuvo la ecuación de correlación, y su significancia en el intervalo mencionado fue comprobada mediante el análisis de la varianza y el gráfico de residuos.

- **Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.** En el rango de 0 mg/l a 500 mg/l, empleando soluciones patrón, se determinó precisión en condiciones de repetibilidad, los límites de detección y cuantificación, error porcentual y límite de confianza. Esto

fue realizado por dos analistas, trabajando bajo las mismas condiciones (equipos, soluciones, etc.) durante siete días. Para establecer los límites de detección y cuantificación, en el Laboratorio de la Sección Química se adoptó el criterio de establecer, para el primero, la mínima concentración obtenida en condiciones de repetibilidad, donde el coeficiente de variación porcentual (CV%) fuera menor o igual a 10%, sin tener en cuenta el error porcentual (E%). Para el segundo, se adoptó el criterio de establecer, como límite de cuantificación, la menor concentración obtenida en condiciones de repetibilidad, cuando el CV% y el error porcentual fueran menores o iguales a 10%.

Para evaluar la precisión del método en condiciones de repetibilidad, dos analistas determinaron la concentración de almidón en ocho muestras de jugo de caña, mientras que para la evaluación en condiciones de precisión intermedia, se empleó una muestra de jugo de caña de azúcar fortificado con 50 mg/l, 250 mg/l y 400 mg/l de almidón. Estas muestras fueron analizadas, durante siete días por duplicado, por dos analistas. Se calcularon las recuperaciones promedio obtenidas por ambos analistas referidas al valor teórico, la desviación estándar (DE), CV % y el límite de confianza (LC) al 95%.

• **Sesgo evaluado como error porcentual y recuperación.** El sesgo del método se determinó en términos del error relativo y de la recuperación del analito (Sánchez Martínez, 2005). El primero se obtuvo en condiciones de repetibilidad para cada solución patrón utilizada en el rango seleccionado, mientras que la recuperación se calculó en base a la evaluación de muestras fortificadas en niveles bajo, medio y alto.

• **Incertidumbre relativa expandida.** Se empleó una evaluación de tipo A¹:

$$U = K * (\mu_1^2 + \mu_2^2 + \mu_3^2)^{1/2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo U la incertidumbre expandida; K, un factor de cobertura, considerado en este caso igual a 2; μ_1 y μ_2 , la incertidumbre estándar en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, respectivamente y μ_3 , la incertidumbre estándar del sesgo en condiciones de repetibilidad, evaluada como el promedio del error porcentual en dicha condición. Estos coeficientes se calcularon como:

$$\mu_1 = (\sum CV_i^2/n)^{1/2} \text{ en condiciones de repetibilidad;}$$

$$\mu_2 = (\sum CV_i^2/n)^{1/2} \text{ en condiciones de reproducibilidad;}$$

$$\mu_3 = \sum |E\%|/n \text{ en condiciones de repetibilidad.}$$

Donde n es el número de muestras analizadas para cada caso.

Las herramientas estadísticas utilizadas fueron:

• prueba t de Student para calcular los límites de confianza;

• prueba de Grubbs para la eliminación de datos anómalos;

• ANOVA y prueba F para comprobar la significancia de la regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra la curva de calibración obtenida para el intervalo 0 mg/l – 1000 mg/l y sus límites de confianza.

El coeficiente de correlación obtenido (R^2) fue igual a 0,9995, pero a pesar de que se había comprobado la linealidad del método mediante el análisis de la varianza y gráfico de residuos hasta una concentración de almidón de 1000 mg/l, solamente se validó el intervalo de concentración de 0 mg/l a 500 mg/l, rango establecido por la bibliografía (ICUMSA, 2007). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Puede observarse que las soluciones estándar que cumplen con las condiciones establecidas para los límites de detección y cuantificación corresponden a concentraciones de almidón de 6,25 mg/l y 43,75 mg/l, respectivamente. De esta manera, el límite de detección quedó establecido en 6,25 mg/l y el intervalo de trabajo quedó comprendido entre 43,75 mg/l y 500 mg/l de almidón.

Los resultados encontrados para los jugos analizados en condiciones de repetibilidad se presentan en la Tabla 3. Se observa que la metodología empleada para la determinación de almidón en jugos de caña presenta condiciones aceptables de precisión en términos de repetibilidad, con coeficientes de variación porcentual comprendidos entre 0,46% y 4,16%, mayor para el jugo de menor concentración.

Los resultados obtenidos en condiciones de precisión intermedia se presentan en la Tabla 4.

La recuperación promedio obtenida para niveles de fortificación bajos y altos está dentro del rango de aceptación establecido por la Food and Agriculture Organization/ Organización Mundial de la Salud (FAO/ OMS, 2003), que determina que para concentraciones mayores a 1 mg/kg, la recuperación debe estar comprendida entre 70% y 110%.

Puede observarse en la Tabla 2 que para el intervalo de trabajo comprendido entre 43,75 mg/l y 500 mg/l de almidón, el error porcentual (E %) es siempre menor a 10%, lo que indica que el método es confiable en dicho intervalo y presenta un sesgo despreciable en la cuantificación de las diferentes concentraciones.

Para el cálculo de incertidumbre, de las Tablas 3 y 4 se obtuvieron $\mu_1 = 2,21$ y $\mu_2 = 1,76$, y de la Tabla 2, $\mu_3 = 1,30$. De esta manera, la incertidumbre expandida del método calculada mediante la Ecuación 1 resultó igual a $\pm 6,22\%$ para el intervalo de trabajo comprendido entre 43,75 y 500 mg almidón/l jugo.

¹Gor, S y M. Ruiz (2006). Curso **Validación de técnicas analíticas de ensayos**, Universidad Nacional de Tucumán.

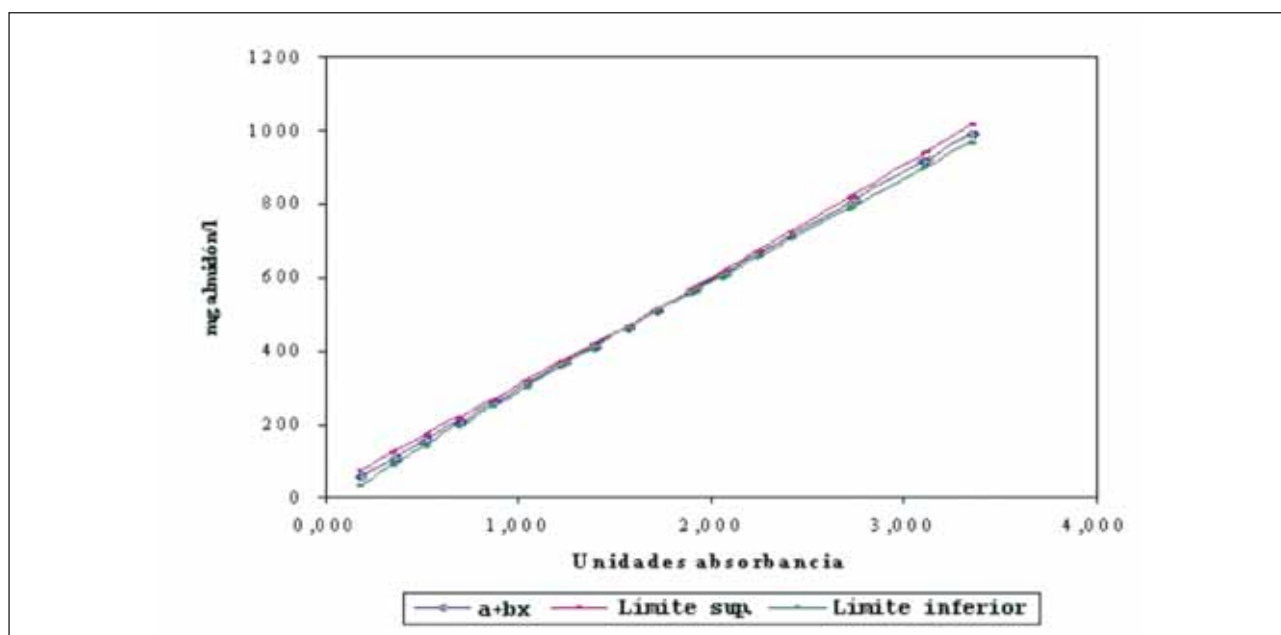


Figura 1. Curva de calibración y límites de confianza.

Tabla 2. Valores promedio, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV%) y límites de confianza (LC) para soluciones patrones de almidón en condición de repetibilidad.

Valor teórico (mg/l)	6,25	12,50	25	37,50	43,75	50	100	250	400	500
Promedio	3,03	8,86	20,46	32,29	41,83	49,70	99,33	250,47	402,10	492,86
DE	0,21	0,12	0,24	0,57	1,16	0,88	1,32	1,48	0,65	3,20
CV%	7,05	1,33	1,18	1,77	2,77	1,77	1,33	0,59	0,16	0,65
E%	51,59	29,14	18,17	13,89	4,38	0,60	0,67	-0,19	-0,52	1,43
LC	0,12	0,07	0,14	0,33	0,67	0,51	0,76	0,86	0,38	1,85

Nota: no se eliminó ningún valor mediante la prueba de Grubbs.

Tabla 3. Valores promedio, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y límites de confianza (LC) de las determinaciones en jugos de caña realizadas en condiciones de repetibilidad.

Jugo N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Promedio(mg/l)	89	99	52	73	294	451	147	338
DE	0,78	2,47	2,17	0,66	2,21	16,21	0,84	1,56
CV%	0,88	2,48	4,16	0,90	0,75	3,59	0,57	0,46
LC al 95%	0,72	2,29	2,01	0,61	2,04	15,01	0,78	1,45

CONCLUSIONES

Las cualidades a destacar del método desarrollado por Vasantdada Sugar Institute y difundido por ICUMSA en 2007 como "Draft Method N° 3", son su simpleza analítica, reducido tiempo de ejecución y bajos requerimientos de reactivos químicos. El no precipitar el almidón con alcohol ni emplear cloruro de calcio, tal como lo requieren las técnicas empleadas hasta ahora en el Laboratorio de la Sección Química de la EEAOC (COPERSUCAR, 2004; Godshall *et*

al., 2004), representa claramente una ventaja económica.

Su incertidumbre relativa expandida fue igual a $\pm 6,22\%$ (utilizando un factor de cobertura $K=2$) para un intervalo de trabajo comprendido entre 43,75 mg/l y 500 mg/l de almidón en jugos de caña de azúcar.

En base a los resultados obtenidos en cuanto a los parámetros determinados, se puede afirmar que estos cumplen con las condiciones establecidas por el Laboratorio de la Sección Química de la EEAOC para la validación de un método analítico.

Tabla 4. Valores promedio de porcentaje de almidón recuperado en una muestra de jugo de caña con tres niveles de fortificación, en condiciones de precisión intermedia.

		Jugo + 50 mg/l	Jugo + 250 mg/l	Jugo + 400 mg/l
Analista 1	Día 1	100,0	95,0	99,0
	Día 2	101,0	95,0	99,0
	Día 3	100,0	95,0	98,0
	Día 4	101,0	95,0	100,0
	Día 5	99,0	95,0	98,0
	Día 6	99,0	95,0	99,0
	Día 7	100,0	95,0	99,0
Analista 2	Día 1	95,0	97,0	100,0
	Día 2	94,0	96,0	99,0
	Día 3	95,0	96,0	100,0
	Día 4	97,0	96,0	97,0
	Día 5	95,0	97,0	100,0
	Día 6	97,0	98,0	97,0
	Día 7	96,0	96,0	96,0
Promedio		98,0	96,0	98,0
DE		2,5	0,9	1,3
CV %		2,6	1,0	1,3
LC al 95%		1,5	0,5	0,7

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Clarke, M. 1996.** Sugarbeet and sugarcane polysaccharides: a new review. En: Proc. SPRI Conference, New Orleans, LA, USA, pp. 368-383.
- COPERSUCAR. 2004.** Métodos de análise em açúcar, álcool e processos. Versão 03. [CD ROM]. Centro de Tecnologia Copersucar, Estado de Sao Paulo, Brazil.
- Food and Agriculture Organization/ Organización Mundial de la Salud (FAO/ OMS). 2003.** Codex Alimentarius. Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas. Secretaría del Programa Conjunto FAO/ OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma, Italia.
- Godshall, M. A.; M. A. Clarke and C. D. Dooley. 1990.** Starch: process problems and analytical developments. En: Proc. SPRI Conference, San Francisco, CA, USA, pp. 244-264.
- Godshall, M. A.; R. Triche and S. J. Moore. 2004.** A rapid starch test for use in cane mills. En: Proc. SPRI Conference, Atlanta, GA, USA, pp. 428-440.
- International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). 2007.** Method book. Ed. Bartens, Berlin, Germany.
- Sánchez Martínez, D. L. 2005.** Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinos térreos (calcio y magnesio) por volumetría EDTA. [En línea]. Disponible en <http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes/dililian/contenido.htm> (consultado 25 marzo 2007). Trabajo de grado inédito (Lic. Química), Univ. Distrit. F. J. de Caldas-IDEAM, Colombia.
- Van der Poel, P. W.; H. Schiweck and T. Schwartz. 1998.** Sugar technology. Beet and cane sugar manufacture. Verlag Dr. Albert Bartens KG Berlin, Germany.
- Zossi, B. S.; G. Cárdenas, N. Sorol y M. Sastre. 2010.** Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina). Parte 1: caña limpia y despuntada. Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán 87 (1): 15-27.
- Zossi, B. S.; M. E. Navarro; N. Sorol; M. Sastre y R. M. Ruiz. 2008.** Validación de una metodología para determinar el contenido de almidón en azúcar. Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán 85 (2): 1-7.