

Validación de una metodología para determinar el contenido de almidón en azúcar

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

RESUMEN

El almidón es un microcomponente indeseado en el proceso de fabricación de azúcar debido a los problemas que origina durante las distintas etapas de elaboración y en el producto final, cuando se emplea el azúcar como materia prima para la producción de otros alimentos. Por este motivo, es necesario contar con un método confiable para su determinación. En el marco del Sistema de Gestión de la Calidad de los laboratorios de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombes" (EEAOC), se validó la aplicación de la metodología COPERSUCAR para determinación de almidón en azúcar. Los parámetros determinados fueron: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo operativo, precisión, sesgo e incertidumbre relativa. Los resultados obtenidos demostraron que esta técnica es aceptable para determinar almidón en diferentes tipos de azúcares, en concentraciones comprendidas entre 25 y 600 mg/kg, con una incertidumbre de $\pm 10,8\%$.

Palabras clave: almidón, validación, azúcar.

ABSTRACT

Validation of a methodology to determine starch in sugar

Starch is an undesirable microcomponent in sugar processing because of the problems it causes during this process and that of food production using sugar as raw material. For this reason, a reliable determination method is required. As the laboratory of Sección Química of Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombes" (EEAOC) works under a quality system, a technique developed by Copersucar was validated. Detection and quantification limits, linearity, accuracy and uncertainty were determined. The results showed that this method is acceptable to determine starch concentrations in different sugar types at levels between 25 and 600 mg/kg. Uncertainty was $\pm 10,8\%$.

Key words: starch, validation, sugar.

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

INTRODUCCIÓN

El almidón, constituyente natural de la caña de azúcar, es un polisacárido formado por cadenas de amilosa y amilopectina, ambos polímeros de glucosa, que la planta emplea como compuesto de almacenamiento alternativo de energía. Se forma en la caña de azúcar durante la ausencia de luz solar y es convertido en sacarosa en presencia de esta (Van der Poel *et al.*, 1998).

Su concentración en la caña depende de la variedad, oscilando entre 200 y 1200 mg/kg sobre base sólida (Godshall *et al.*, 2004). En años recientes, debido al incremento de cosecha de caña verde a causa de regulaciones ambientales y a la introducción de máquinas cosechadoras integrales, como así también debido a la cosecha de caña muchas veces inmadura, se han podido determinar incrementos en el contenido de almidón en los jugos (Godshall, 2004). En el proceso de molienda, gran parte del almidón que es insoluble en la caña se solubiliza por efecto del calor y pasa a los jugos (Rein, 2007) y, a pesar de que un gran porcentaje puede ser eliminado durante el proceso de clarificación y cristalización, algunos estudios indican que entre un 30% y 40% de este polisacárido puede ocluirse en el cristal de azúcar crudo (Cuddihy *et al.*, 2001; Rein, 2007).

De acuerdo a la bibliografía (Van der Poel *et al.*, 1998; Cuddihy *et al.*, 2001; Rein, 2007), contenidos de almidón en jugo mayores a 250 mg/kg en base seca, causan problemas durante el proceso de elaboración de azúcar, siendo los principales de ellos: el aumento de la viscosidad por efecto de la gelatinización de los gránulos de almidón y la dificultad en los procesos de filtración, decantación, evaporación y cristalización, como así también al incremento de la pureza de las melazas.

Por los motivos antes mencionados, surgieron numerosas técnicas analíticas (Godshall *et al.*, 1990 y 2004; Chavan *et al.*, 1991 y 2001; Matic, 1971; Alexander, 1954; COPERSUCAR, 2004) tanto para evaluar el contenido de almidón en los jugos durante las diferentes etapas del proceso de elaboración de azúcar, como para determinar su concentración en el producto final: azúcar crudo a refinar, azúcar blanco y azúcar refinado.

El almidón presente en el azúcar crudo se transfiere a la refinación causando problemas diferentes, de acuerdo al tipo de proceso empleado. En la clarificación por fosfatación, el almidón modifica en forma adversa la precipitación y coagulación del fosfato de calcio, obteniéndose un alto nivel de fosfato en el licor claro. Además, la fracción de amilopectina estabiliza los cristales de fosfato de calcio en suspensión causando la formación de coágulos densos y grandes difíciles de eliminar por flotación (Rein, 2007).

Si se emplea carbonatación para producir azúcar refinado, la fracción de amilosa actúa como un coloide protector cubriendo la superficie de los cristales de carbonato de calcio, impidiendo su precipitación y ocasionando problemas en la filtración (Rein, 2007).

En el caso de azúcares blancos que se emplean en la preparación de bebidas, la presencia de almidón puede incidir en la formación de flóculos (Van der Poel *et al.*, 1998). También produce 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 lo dicho anteriormente, es importante conocer el contenido de almidón durante todo el proceso de elaboración de azúcar, en especial en el producto final. Es así que se consideró necesario validar la metodología expuesta en este trabajo, para las condiciones de operación del laboratorio de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombes" (EEAOC).

La validación de métodos analíticos se lleva a cabo mediante la realización de un conjunto de ensayos, que comprueban las hipótesis en las que se basa el método de análisis, demostrando así su aptitud para un determinado fin analítico. Esto implica que se deben determinar las fuentes de variabilidad y de los errores sistemáticos y aleatorios del procedimiento, tanto para el ajuste del método como para el análisis de muestras reales.

El objetivo de este trabajo fue validar, para las condiciones operativas del Laboratorio de la Sección Química, la metodología indicada por COPERSUCAR para la determinación del contenido de almidón en azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para validar este método se emplearon azúcares blancos y refinados. Para la preparación de las soluciones patrones se usó almidón soluble pro análisis marca Carlo Erba, previa determinación de su contenido de humedad. Se preparó una solución patrón de 900 mg/kg y a partir de ella, por diluciones, las soluciones empleadas en la validación. El agua destilada empleada en la preparación de las mismas tenía una conductividad menor que 5 μ S.

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

Se empleó un espectrofotómetro UV - Visible Hewlett Packard con arreglo de diodos, modelo 8452^a, verificado con referencias trazables al NIST.

Los parámetros que se validaron fueron:

- Límite de detección (LD).
- Límite de cuantificación (LQ).
- Linealidad e intervalo operativo.
- Precisión.
- Sesgo.
- Incertidumbre relativa.

Las herramientas estadísticas utilizadas fueron:

- Test t de Student.
- Test de Grubbs para la selección de datos.
- ANOVA.
- Test F.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se detallan los parámetros validados de acuerdo a lo recomendado por la **Guía para la validación de métodos de ensayo** (OAA, 2008), su forma de cálculo y los resultados obtenidos. Los datos originales de las determinaciones realizadas para la validación se presentan en la Tabla 1.

Límite de detección: el laboratorio de la Sección Química adoptó el criterio de establecer como límite de detección la mínima concentración obtenida en condiciones de repetibilidad, donde el coeficiente de variación porcentual (CV %) sea menor o igual a 10%, sin tener en cuenta el error porcentual (E %).

En la Tabla 2 se observa que la menor concentración de almidón que cumple esta condición es de 20 mg/kg, para la cual el CV% es igual a 8,4%.

LD = 20 mg/kg

Límite de cuantificación: dado que la bibliografía establecía el límite de cuantificación para esta metodología, se prepararon diluciones de soluciones patrones cercanas a este valor y, para su determinación, se adoptó el criterio de establecer como límite de cuantificación la menor concentración obtenida en condiciones de repetibilidad para la cual el CV % y el error porcentual sean menores o iguales al 10%. En la Tabla 2, la menor concentración de almidón que cumple con ambos criterios es 25 mg/kg.

LQ = 25 mg/kg

Tabla 1. Determinaciones en condición de repetibilidad.

Repetición N°	Concentración de almidón (mg/kg)										
	0	12,5	20	25	30	37,5	100	200	500	600	750
1	2	9	20	25	28	42	96	204	491	600	1010
2	-3	9	20	27	28	34	89	186	503	620	1032
3	-3	9	24	24	29	32	95	194	506	629	1014
4	-1	6	24	27	26	37	98	192	528	641	1024
5	-2	11	24	25	30	40	98	204	489	669	1032
6	0	8	22	29	28	37	93	193	489	627	1022
7	4	12	22	29	27	34	97	199	518	655	1014

*Los resultados se muestran en valores enteros de acuerdo a lo indicado en COPERSUCAR (2004).

Tabla 2. Precisión en términos de repetibilidad. Promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, error y límite de confianza.

Datos estadísticos	Concentración de almidón (mg/kg)										
	0	12,5	20	25	30	37,5	100	200	500	600	750
N° total de datos	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
N° de datos OK	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	7
Promedio	-0,6	9,1	22,2	26,6	28	36,6	96,2	196	503,4	634,4	1021,1
desviación estándar	2,5	1,9	1,9	2,1	1,3	3,6	1,9	6,7	15,2	22,9	8,7
CV %	-455,2	21,3	8,4	8,1	4,6	9,7	2	3,4	3	3,6	0,8
E %		36,7	10,1	5,9	7,1	2,5	4	2	0,7	5,4	26,5
Límite de confianza	2,3	1,8	1,7	2	1,2	3,3	2	6,2	14,1	21,2	8

Linealidad e intervalo operativo: se prepararon soluciones estándares en un rango de concentraciones comprendido entre 0 y 750 mg/kg de almidón, teniendo en cuenta el límite de detección y el rango lineal dado por la literatura. Se determinó la absorbancia de estas soluciones, y graficando estos valores versus concentración (Figura 1), se obtuvo el rango de linealidad.

En esta gráfica, se observa claramente que el método es lineal sólo hasta la concentración de 600 mg/kg de almidón. A partir de ella, se produce una variación de la pendiente de la recta, por lo que se decidió analizar la linealidad del intervalo comprendido entre 0 y esta concentración.

Para verificar la linealidad se deben comprobar los siguientes criterios, de acuerdo a lo establecido en la **Guía de validación de métodos analíticos** (NETSALUD):

1 La varianza debe ser constante para todas las concentraciones (homocedasticidad).

2. El análisis de la varianza de la regresión lineal debe demostrar que el paso del intercepto es cero, mediante un test t o mediante el intervalo de confianza con una probabilidad del 95%, y que la desviación no es significativa respecto a la regresión.

3. La distribución de los residuos debe ser aleatoria.

4. El coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0,98 y 1,00, mientras que su cuadrado debe ser superior a 0,995.

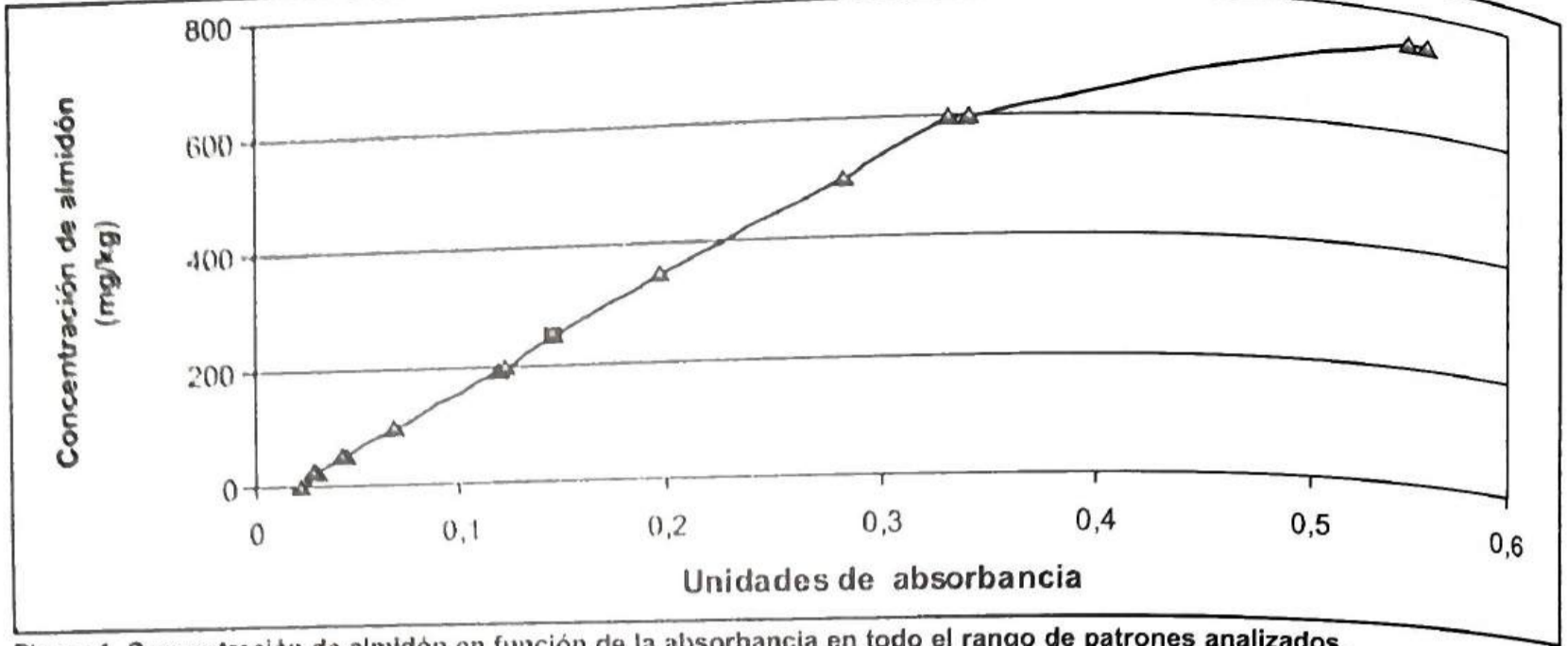


Figura 1. Concentración de almidón en función de la absorbancia en todo el rango de patrones analizados.

Para verificar la homocedasticidad se realizó una prueba F entre las varianzas de dos grupos de datos: el de mayor y el de menor concentración (600 y 20 mg/kg, respectivamente), ya que si en ambos extremos la varianza es homogénea, también lo será en concentraciones intermedias (Goicoechea y Olivieri, 2007). Como el valor calculado (153) es menor al de F tabulado (161,4) para $n_{1-1} = 1$ y $n_{2-1} = 1$ grados de libertad, a un nivel de confianza del 95%, se acepta la hipótesis de la igualdad de las varianzas.

El análisis de la varianza comprobó que la correlación es significativa y que la distribución de residuos es aleatoria.

La ecuación obtenida (Ecuación 1) para el rango comprendido entre 0 y 600 mg/kg:

$$Y = 1888,4 \cdot X - 31,459 \quad R^2 = 0,9988 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

cumple con estas cuatro condiciones. El valor de R es 0,9994 y su cuadrado 0,9988 que, al no presentar tendencias sistemáticas, indica que la ecuación es lineal.

Sin embargo, al ser el intercepto distinto de cero, tanto su valor como el de la pendiente, estimados mediante el método de cuadrados mínimos, están sujetos a errores aleatorios que deben considerarse para determinar los valores de concentración. Con los valores graficados en la Figura 1, en la región donde la ecuación es lineal, se obtuvieron los intervalos de confianza a un nivel de probabilidad del 95% de ambos parámetros: pendiente e intercepto y sus respectivas desviaciones estándares (Ecuaciones 2 y 3).

$$b \pm t(n - 2, \alpha) \times S_b = 1884,4 \pm 2,10 \times 6,25 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$a \pm t(n - 2, \alpha) \times S_a = -31,459 \pm 2,10 \times 1,38 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde t es el estadístico de Student, n el número de determinaciones, S_a es la desviación estándar del intercepto y S_b la desviación estándar de la pendiente.

Estas ecuaciones también comprueban que el intercepto de la recta es estadísticamente diferente de cero, lo

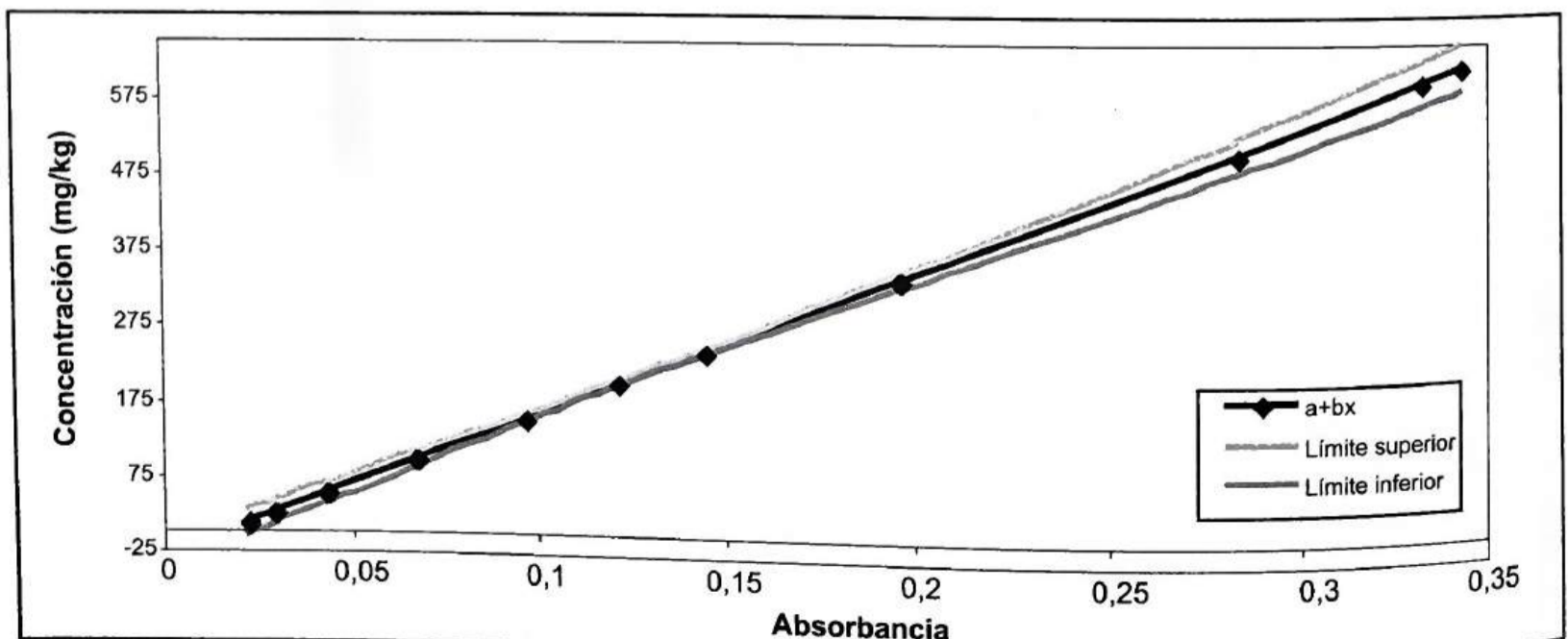


Figura 2. Límites de confianza de la línea de regresión.

que indica la existencia de un error sistemático constante, que será menos importante en la región de concentraciones altas.

Se obtuvieron los límites de confianza de la línea de regresión (Figura 2), mediante la expresión:

Límite de confianza $LC95 = s * t_{n-1} / \sqrt{n}$
(Kornblit y Sebriano, 2005).

Estos límites de confianza predicen la zona donde se espera encontrar, con un 95% de probabilidad, el valor de concentración para una absorbancia determinada. De la gráfica se observa que la mejor zona de trabajo se encuentra en la región central del intervalo, ya que estas bandas se estrechan indicando una menor dispersión de los valores de concentración de almidón.

Precisión: se determinó en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad: para su estimación se evaluaron los datos obtenidos por dos operadores, que trabajaron siempre en las mismas condiciones operativas (equipos, materiales y reactivos). Cada uno realizó al menos siete repeticiones de cada estándar.

El promedio de los resultados originales obtenidos por ambos analistas se muestran en la Tabla 1.

Aplicando el test de Grubbs (Nist /sematech, 2006) se rechazó un dato anómalo (89) y se determinó el promedio, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación porcentual (CV %) y el límite de confianza para cada grupo de datos. Estos resultados se muestran en la Tabla 2.

Se puede apreciar que para el rango operativo (25 y 600 mg/kg de almidón), tanto el coeficiente de variación como el error porcentual son menores al 10% y, como se observa en la Figura 3, no presentan una tendencia definida y tampoco se evidencian posibles errores sistemáticos en las determinaciones efectuadas por los dos analistas.

También se verifica el criterio de aceptación para

microcomponentes establecido por Abelaira y Álvarez (2003), quienes expresan que el CV % determinado en condiciones de repetibilidad no debe ser mayor al 11% para el rango de concentraciones estudiadas.

Se observa que el CV % y E % tienden a disminuir con el incremento de la concentración dentro del rango lineal determinado.

Precisión intermedia: para su determinación se emplearon dos tipos de azúcares: azúcar refinado (M1) y azúcar común (M2), ambos fortificados con 50 y 350 mg/kg de almidón. Estas muestras fueron analizadas, empleando los mismos reactivos y equipos, durante siete días por duplicado por dos analistas. Se calcularon las recuperaciones promedio (Prom.) obtenidas por ambos analistas para las dos muestras (referidos al valor teórico), además de S, CV % y el límite de confianza al 95%. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

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

Sesgo: el sesgo del método se determinó en términos de error relativo y de la recuperación del analito (Sánchez Martínez, 2005). El primero se obtuvo para cada solución patrón utilizada en el rango de repetibilidad, y la recuperación se calculó en base a la evaluación de muestras fortificadas.

Como puede verse en la Tabla 3, el error relativo en el intervalo de trabajo es siempre inferior al 10%, lo que comprueba que el método es confiable en dicho intervalo y no presenta sesgos en la cuantificación de las diferentes concentraciones (Sánchez Martínez, 2005).

Para la recuperación, se emplearon las mismas muestras fortificadas que las empleadas en la precisión intermedia. Los promedios de los porcentajes de almidón recuperado por los dos analistas son los presentados en la Tabla 3.

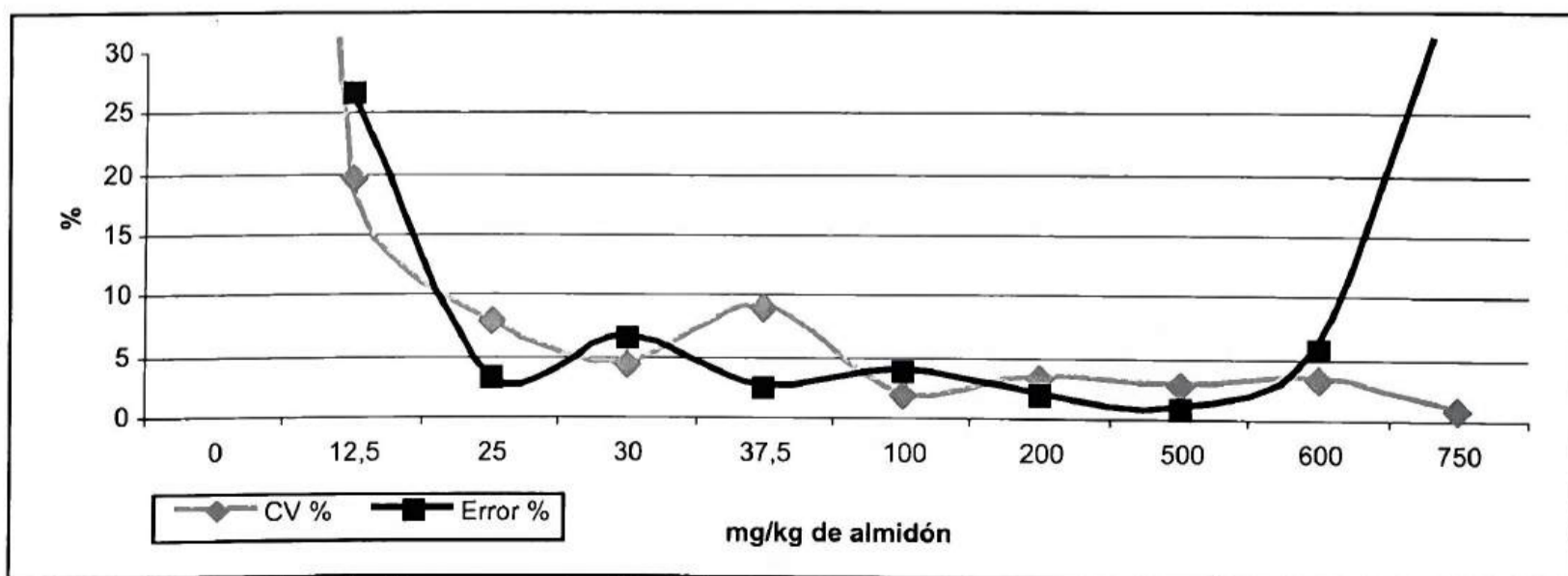


Figura 3. Coeficiente de variación y error en función de la concentración.

Tabla 3. Porcentaje de almidón recuperado en dos muestras de azúcar con dos niveles de fortificación.

Día	M1 + 50 mg / kg	M1 + 350 mg / kg	M2 + 50 mg / kg	M2 + 350 mg / kg
1	94	97	99	101
2	99	93	98	102
3	100	101	103	102
4	95	94	98	98
5	90	93	108	102
6	86	93	103	99
7	98	97	98	102
Prom.	94,6	95,4	101	100,9
S	5,1	3,0	3,8	1,7
CV%	5,4	3,2	3,8	1,7
LC	4,5	2,7	3,4	1,5

En dicha tabla se observa que el promedio de almidón recuperado para azúcar refinado, con bajo contenido de almidón, y aquel obtenido para azúcar blanco, con concentración de almidón mayor, representan valores aceptables para ambos niveles de fortificación, variando su promedio entre 94,6 y 101%, con un coeficiente de variación comprendido entre 5,4 y 1,7%, mayor para la menor concentración de almidón.

Incertidumbre: de acuerdo a la guía de Eurachem (2005), la incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Existen diversos modelos para estimarla, y para este caso en particular, se empleó una evaluación de tipo A (Gor y Ruiz, 2006).

$$U = K (\eta_{\text{precint}})^{1/2}$$

Siendo U: la incertidumbre expandida; η_{precint} : el máximo coeficiente de variación porcentual calculado en condiciones de precisión intermedia y K: un factor de cobertura.

De esta manera:

$$\eta_{\text{precint}} = 5,4$$

$$K = 2$$

La incertidumbre relativa resulta de esta manera:

$$U = \pm 10,8\%$$

A continuación, en la Tabla 4 se indican los valores de los parámetros calculados durante la validación.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la validación de la metodología recomendada por COPERSUCAR (2004) para la determinación de almidón en azúcar para las condiciones del Laboratorio de Química de la EEAOC, se puede concluir que esta metodología es aceptable para

Tabla 4. Resumen de los parámetros calculados.

Límite de detección (LD)	20 mg/kg	
Límite de cuantificación (LQ)	25 mg/kg	
Intervalo operativo	25 a 600 mg/kg	
Repetibilidad	CV% < 10%	
Precisión intermedia	CV% máximo: 5,4%	
Sesgo	Recuperación	94 a 101%
	Error relativo	7,10%
Incertidumbre relativa	10,80%	

determinar almidón en distintos tipos de azúcares en concentraciones comprendidas entre 25 y 600 mg/kg.

COPERSUSAR (2004) determinó, para esta metodología, un intervalo de trabajo comprendido entre 25 y 500 mg/kg de almidón en azúcar y un valor de incertidumbre relativa de $\pm 12\%$, para un 95% de confianza y $K=2$.

Además, los valores de CV % obtenidos en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad concuerdan con lo establecido por Abelaira y Álvarez (2003) como criterios de aceptación de microcomponentes en concentraciones comprendidas entre 10 y 1000 mg/kg (11 y 7%, respectivamente).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Licenciada Mariana Alva por su colaboración en las tareas experimentales.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abelaira, S. y P. Álvarez. 2003. Validación de métodos analíticos. Asociación Química Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Alexander, J. B. 1954. Starch in Natal cane sugar. S. Afr. Sugar J. 54 (9): 617-623.
- Chavan, S. M.; D. D. Borawake and S. J. Jadhav. 2001. Quantitative analysis and enzymatic hydrolysis of starch and dextran in white sugar mill process mate-

- rials. En: Proc. ISSCT Congress, 24, Brisbane, Australia, pp. 166-168.
- Chavan, S. M.; A. Kumar and S. J. Jadhav. 1991.** Rapid quantitative analysis of starch in sugar cane juice. *Int. Sugar J.* 93 (1107): 56-58.
- COPERSUCAR. 2004.** Métodos de análises em açúcar, álcool e processos. Versão 03 [CD ROM]. Centro de Tecnologia COPERSUCAR, Estado de São Paulo, Brazil.
- Cuddihy Jr, J. A.; M. E. Porro and J. S. Rauh. 2001.** The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. *J. Amer. Soc. of Sugar Cane Technol.* 21: 73-91.
- Eurachem. 2005.** Métodos analíticos adecuados a su propósito. Publicación técnica CNM-MRD-PT030. Centro Nacional de Metrología (CENAM), Los Cués, Qro, México.
- 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. 2004.** Collaborative study on starch in raw sugar using the SPRI rapid starch method. En: Proc. SPRI Conference, Atlanta, Georgia, USA, pp. 442-448.
- 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, Georgia, USA, pp. 428-440.
- Golcochea, H. y A. Olivieri. 2007.** La calibración en química analítica. Ediciones UNL, Santa Fé, Argentina.
- Gor, B. y M. Ruiz. 2006.** Curso Validación de técnicas analíticas de ensayos. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Kornblit, F. y E. Sebriano. 2005.** Curso: Herramientas estadísticas para laboratorios. Sensplus, Buenos Aires, Argentina.
- Matic, M. 1971.** Starch determination in raw sugar by colorimetric methods. En: Proc. ISSCT Congress, 14, New Orleans, Luisiana, USA, pp. 1434-1443.
- NETSALUD.** Guía de validación de métodos analíticos. [En línea]. Disponible en: <http://netsalud.sa.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>. (consultado 25 marzo 2007).
- Nist/sematech. 2006.** Engineering statistic handbook. [En línea]. Disponible en: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/> (consultado 7 enero 2008).
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2008.** Guía para la validación de métodos de ensayo, DC-LE-05 Versión 02. Organismo Argentino de Acreditación (OAA), Buenos Aires, Argentina.
- Rein, P. 2007.** Cane Sugar Engineering. 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> (consultado 1 abril 2007).
- Van der Poel, P. W.; H. Schiweck and T. Schwartz. 1998.** Sugar technology. beet and cane sugar manufacture. Ed. Bartens, Berlin, Germany.