

Comparación de dos metodologías de determinación de almidón en azúcar

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

RESUMEN

Debido a la gran importancia que tiene el almidón en el proceso de elaboración de azúcar, y a la necesidad de cuantificarlo, se validó una nueva metodología para su determinación en azúcar, para poder compararla con la técnica de rutina empleada hasta ahora en laboratorio. Desarrollada por el SPRI, el principio del método se basa en la detección colorimétrica del complejo almidón-yoduro. Se determinaron los límites de detección y cuantificación, linealidad, sesgo e incertidumbre. Los resultados obtenidos demostraron que por esta metodología, es posible determinar concentraciones de almidón en diferentes tipos de azúcar, en un intervalo comprendido entre 33 y 2667 mg/kg, con una incertidumbre de $\pm 6,18$ mg/kg. Su comparación con la técnica establecida por COPERSUCAR y empleada en los laboratorios de la Sección Química (EEAOC), permitió llegar a la conclusión de que a pesar de no ser iguales estadísticamente, existe una correlación altamente significativa entre ellas. Además, esta nueva metodología presenta un valor de incertidumbre menor.

Palabras clave: almidón, validación, azúcar.

ABSTRACT

Comparing two methodologies to determine starch in sugar

Because of the great importance starch has during sugar processing, a new and quick methodology was validated to determine starch in sugar before its comparison with the technique employed in the lab. This method was developed by SPRI and is based on starch-iodide complex colorimetric detection. Detection and quantification limits, linearity, bias and uncertainty were determined. The results showed that this method is acceptable to determine starch in different kinds of sugar at levels between 33 and 2667 mg/kg, with an uncertainty of $\pm 6,18$ mg/kg. This methodology was compared with COPERSUCAR technique, and although both methods are statistically different, a high correlation between them exists.

Key words: starch, validation, sugar.

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

INTRODUCCIÓN

El contenido de almidón es un parámetro importante a considerar durante el proceso de elaboración de azúcar crudo, como así también en la producción de azúcar refinado. Su presencia incrementa la viscosidad en los fluidos durante las etapas de fabricación de azúcar, disminuye la velocidad de cristalización e incrementa la pureza de las melazas (Godshall *et al.*, 2004). En la industria, es común cuantificar su contenido en el proceso para disminuir sus efectos negativos, mediante el empleo de la enzima α -amilasa, cuando su contenido excede los valores normales.

Por este motivo surgieron diversos métodos analíticos para su cuantificación, tales como los establecidos por ICUMSA (2005), COPERSUCAR (2004), Matic (1971), etc.

Buscando optimizar estas metodologías Godshall *et al.* (2004) y Godshall (2004) desarrollaron en el Sugar Processing Research Institute (SPRI), un método rápido que puede ser empleado por cualquier laboratorio de fábrica para determinar almidón en azúcares y productos azucarados. Las ventajas que presenta este método frente a los anteriores es que no está basado en la precipitación del almidón mediante alcohol absoluto, ni en su solubilización por cloruro de calcio, sino en la gelatinización del almidón mediante ebullición y posterior reacción colorimétrica con yodo, lo que implica un ahorro importante de reactivos y tiempo. Además, constituye un método sencillo y fácil de realizar en cualquier laboratorio de fábrica. Este método fue sugerido por ICUMSA (2005) como método tentativo.

El objetivo de este trabajo fue comparar, previa validación para las condiciones del laboratorio de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombes" (EEAOC), este método rápido de determinación de almidón en distintos tipos de azúcares, con la metodología establecida por COPERSUCAR, empleada hasta ahora en la EEAOC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para validar esta técnica se emplearon azúcares blancos y refinados. Se preparó una solución patrón de 1 mg/ml de almidón, usando almidón soluble marca Carlo Erba, previa determinación de su contenido de humedad, y agua destilada con una conductividad menor que 5 μ S. A partir de ella, por diluciones, se prepararon las restantes soluciones empleadas en la validación.

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).

Los parámetros validados fueron:

- Límite de detección (LD).

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

Estos parámetros fueron calculados según Zossi *et al.* (2008).

Las herramientas estadísticas utilizadas fueron:

- Test t de Student.
- Test de Grubbs para la selección de datos.
- ANOVA.
- Test F.
- Prueba de Student con diferencias pareadas.

Además para comparar ambas metodologías se calcularon (Kornbilit y Sebriano, 2005) los siguientes parámetros:

Límite de repetibilidad: es el valor debajo del cual se espera que se encuentre la diferencia absoluta entre dos análisis obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, con una probabilidad del 95%. Se determina como: $2 \times \sqrt{2\sigma_{\text{Repetibilidad}}}$, siendo $\sigma_{\text{Repetibilidad}}$ la varianza calculada en condiciones de repetibilidad.

Límite de reproducibilidad: es el valor debajo del cual se espera que se encuentre la diferencia absoluta entre dos análisis obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad, con una probabilidad de 95%. Se determina como, $2 \times \sqrt{2\sigma_{\text{Reproducibilidad}}}$ donde $\sigma_{\text{Reproducibilidad}}$ es la varianza determinada en condiciones de reproducibilidad.

Precisión total de cada método: es la raíz cuadrada de la suma de las varianzas calculadas en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

$$\text{Precisión total} = (\sigma_{\text{Repetibilidad}} + \sigma_{\text{Reproducibilidad}})^{1/2}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los parámetros validados.

Linealidad e intervalo operativo: para realizar la curva de calibración, se prepararon soluciones patrones de almidón, de concentraciones comprendidas entre 17 y 2933 mg/kg. Los valores de absorbancia determinados según la metodología analizada (Godshall, 2004), fueron graficados en la Figura 1.

El análisis de la regresión se llevó a cabo de la manera indicada en Zossi *et al.* (2008), comprobándose que la homocedasticidad de la varianza se verifica para el

intervalo 33-2667 mg/kg de almidón, con un valor de F calculado = 2,34, menor que el valor de F tabulado (161,4) para $n_1 - 1 = 1$ y $n_2 - 1 = 1$ grados de libertad, a un nivel de confianza de 95%.

También se comprobó su significancia mediante el análisis de la varianza para la regresión y el estudio de los residuos.

La ecuación obtenida a partir de los datos de la Figura 1:

$$\text{mg/kg de almidón} = 1134,4 \cdot X + 14,17$$

con $R^2 = 0,9999$, es lineal en el intervalo antes mencionado.

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 de 95% de ambos parámetros, la pendiente e intercepto y sus respectivas desviaciones estándares.

$$b \pm t(n - 2, \alpha) \times Sb = 1134,4 \pm 2,08 \times 2,84$$

$$a \pm t(n - 2, \alpha) \times Sa = 14,17 \pm 2,08 \times 2,67$$

Donde t es el estadístico de Student, n el número de determinaciones, Sa es la desviación estándar del intercepto y Sb la desviación estándar de la pendiente. De igual manera que en Zossi *et al.* (2008), se calcularon los intervalos de confianza para la ecuación de regresión, los que se muestran en la Figura 2. Estos límites de confianza predicen la zona donde se espera encontrar, con 95% de probabilidad, el valor de concentración para una absorbancia determinada.

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

Repetibilidad: para su estimación, se evaluaron los datos obtenidos por dos analistas que trabajaron siempre en las mismas condiciones operativas (equipos, materiales y reactivos). Se realizaron 10 replicados de soluciones patrones de concentraciones comprendidas entre 17 y 2667 mg/kg de almidón. Los datos originales se muestran en la Tabla 1.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2, donde se indican también los límites de detección y cuantificación, siendo sus valores 17 y 33 mg/kg de almidón, respectivamente. El primero cumple con la condición de que el coeficiente de variación (CV%) sea menor a 10%, sin importar el valor del error porcentual (E%). Para el segundo, ambos valores son menores a 10%, de acuerdo al criterio adoptado en un trabajo previo (Zossi *et al.*, 2008).

Graficando las variaciones del CV% y del E % en función de la concentración de almidón se observa que (Figura 3):

- A medida que aumenta la concentración de almidón de los estándares, el E % tiende a cero y el CV% tiende a un valor constante.
- En la región operativa no hay evidencia de posibles errores sistemáticos producidos durante el análisis.

Precisión intermedia: se determinó mediante la fortificación de dos muestras de azúcar: refinado (M1) y blanco (M2), con agregados de 50 y 350 mg/kg de almidón. Los resultados obtenidos, promedios de los análisis realizados por dos analistas durante siete días, empleando los mismos reactivos y equipos, se muestran en la Tabla 3. Se calcularon también las recuperaciones promedio para las dos

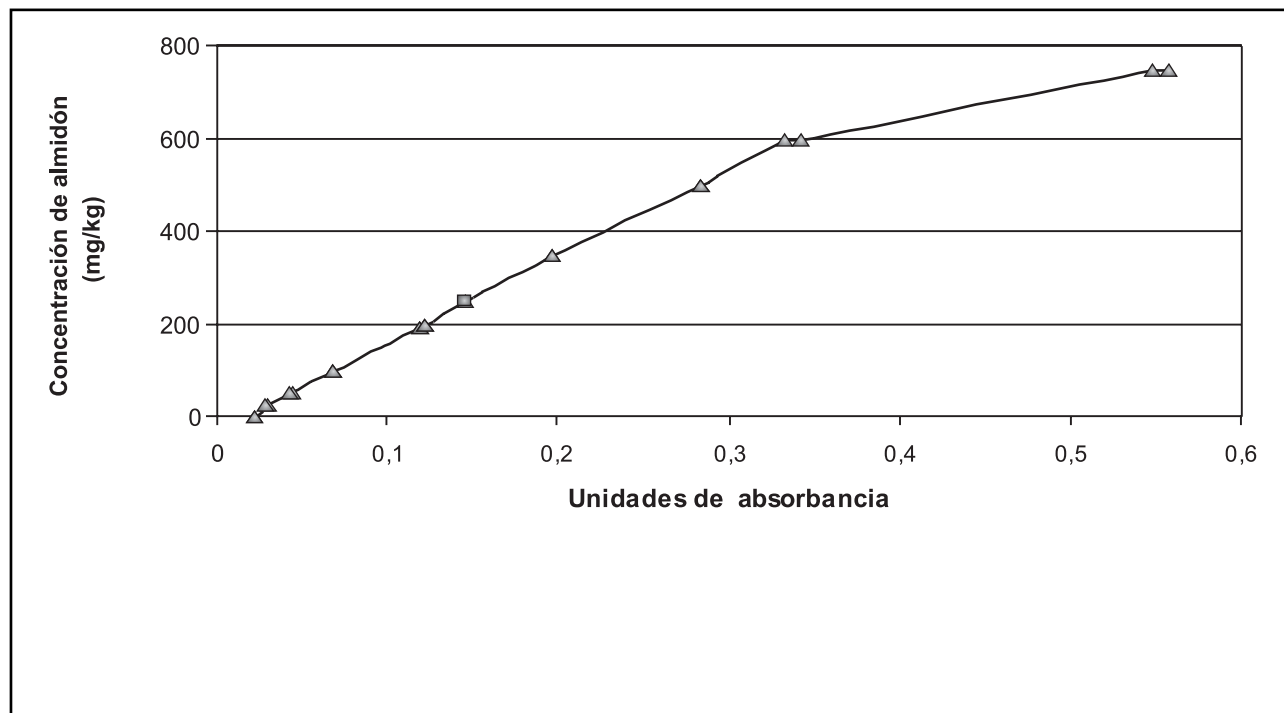


Figura 1. Intervalo operativo y curva de calibración.

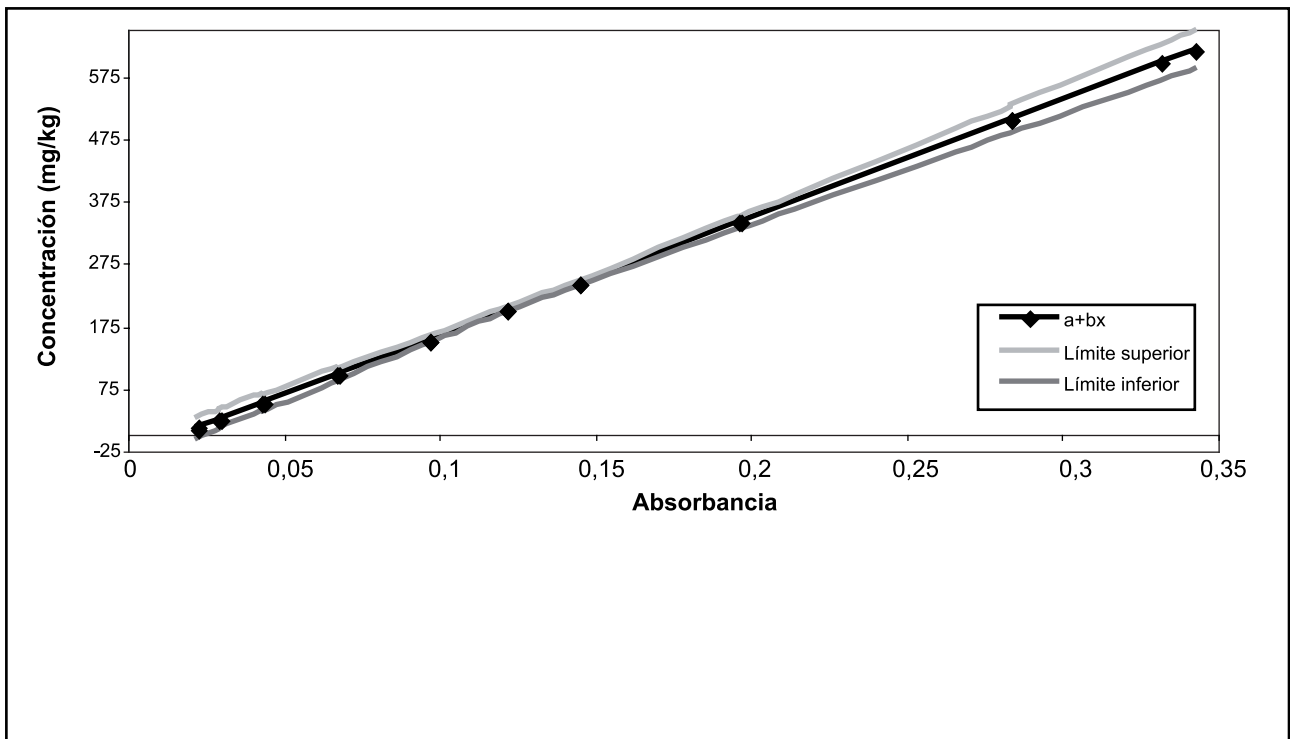


Figura 2. Intervalos de confianza de la ecuación de regresión.

Tabla 1. Datos originales.

Repetición N°	Concentración de almidón (mg/kg)												
	17	33	47	67	107	133	160	167	333	667	1333	2000	2667
1	23	39	51	73	114	132	161	166	329	660	1339	2052	2706
2	22	37	51	73	113	140	160	171	329	666	1342	2055	2710
3	21	37	51	73	114	136	161	168	334	665	1346	2037	2653
4	22	42	51	73	114	137	162	170	333	665	1366	2060	2650
5	19	37	49	73	115	136	162	170	333	668	1335	2050	2643
6	23	37	49	73	117	138	171	166	327	672	1348	2062	2672
7	20	36	47	73	114	138	168	173	327	671	1342	2063	2677
8	23	36	51	71	119	138	163	166	335	684	1339	2064	2658
9	23	35	51	73	118	137	162	174	330	659	1351	2060	2677
10	23	35	51	73	116	138	166	173	330	673	1352	2058	2672

Tabla 2. Precisión en términos de repetibilidad. Promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, error porcentual y límites de confianza (LC).

Datos estadísticos	Concentración de almidón (mg/kg)												
	17	33	47	67	107	133	160	167	333	667	1333	2000	2667
N° total de datos	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
N° de datos OK	10	8	9	10	10	9	10	10	10	10	9	9	10
Promedio (mg/kg)	22	36	50	73	115	137	164	170	331	668	1344	2058	2672
Desv. est.	1,38	0,84	1,55	0,7	1,92	1,38	3,41	3,32	2,85	7,2	5,89	5,03	22,38
CV %	6,32	2,30	3,09	0,96	1,66	1	2,09	1,96	0,86	1,08	0,44	0,24	0,84
E %	31,23	8,85	7,62	9,67	8,24	3,09	2,21	1,79	0,76	0,25	0,78	2,91	0,19
Límite de confianza (mg/kg)	1	1	1	0	1	1	2	2	2	5	4	3	14

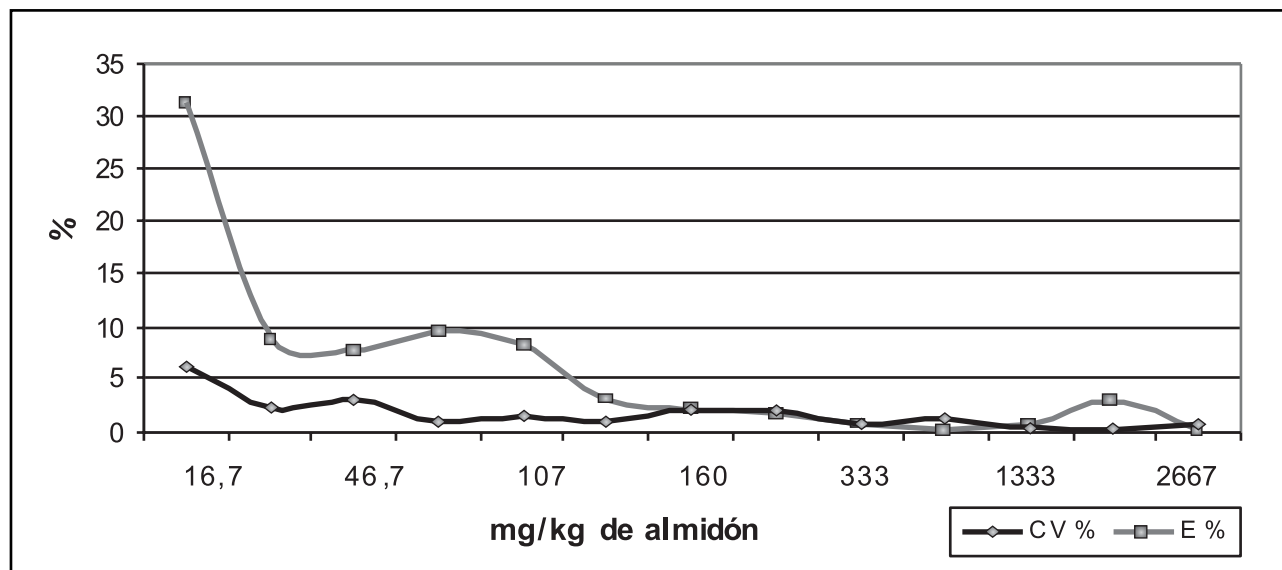


Figura 3. Variación de CV % y E %, en función de la concentración de almidón.

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

Día	Porcentaje de almidón recuperado (%)			
	M1 + 50 mg/kg	M1 + 350 mg/kg	M2 + 50 mg/kg	M2 + 350 mg/kg
1	98,00	101,50	100,50	101,00
2	103,00	105,00	102,00	99,50
3	102,50	106,50	102,50	104,50
4	101,00	105,50	101,00	105,00
5	94,00	105,50	98,00	103,50
6	99,50	100,00	97,50	103,50
7	99,50	100,00	101,00	105,00
Promedio	99,64	103,43	100,36	103,14
S	3,05	2,82	1,91	2,12
CV %	3,06	2,73	1,90	2,05
LC a 95%	2,83	2,61	1,77	1,96

muestras (referidos al valor teórico), S, CV % y el límite de confianza (LC) a 95%.

La recuperación promedio obtenida para bajos y altos niveles de fortificación, está dentro del rango de aceptación establecido por el Codex Alimentarius (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, de acuerdo a lo realizado por Zossi *et. al* (2008).

En la Tabla 2 se observa que el error relativo porcentual en el intervalo de trabajo es siempre inferior a 10%, permaneciendo entre 0,19% y 9,67%, lo que comprueba que el método es confiable en dicho intervalo y presenta sesgos aceptables para la cuantificación de las diferentes concentraciones.

Para la recuperación, se emplearon las mismas mues-

tras 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. En ella, se observa que el promedio de almidón recuperado para ambos azúcares, con bajo y alto contenido de almidón, es aceptable para ambos niveles de fortificación, variando su promedio entre 99,6 y 103,4%, con un coeficiente de variación comprendido entre 3,6 y 1,9% mayor para la menor concentración de almidón.

Incertidumbre: para su estimación se empleó una evaluación de tipo A (Gor y Ruiz, 2006):

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

Siendo:

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

De esta manera:

Tabla 4. Resumen de los parámetros calculados.

Límite de detección (LD)	17 mg/kg	
Límite de cuantificación (LQ)	33 mg/kg	
Intervalo operativo	33 a 2667 mg/kg	
Repetibilidad	CV% máximo: 3,1%	
Reproducibilidad	CV% máximo: 3,1%	
Sesgo	Recuperación	99,6 a 103,4%
	Error relativo	< 10 %
Incertidumbre relativa	6,18%	

$$\mu_{\text{precint}} = 3,09$$

$$K = 2$$

La incertidumbre relativa resulta de esta manera:

$$U = \pm 6,18\%$$

Los resultados obtenidos durante la validación de esta metodología se presentan en la Tabla 4.

Comparación de los métodos de determinación de almidón validados

Dado que los resultados obtenidos en la validación de este método resultaron satisfactorios para determinar almidón, en diferentes tipos de azúcar y en concentraciones comprendidas entre 33 y 2667 mg/kg, se decidió comparar este método con la técnica establecida por COPER-SUCAR (2004) e ICUMSA (2005), validada previamente por Zossi *et al.* (2008).

Para llevar a cabo esto, fueron analizadas tres muestras de azúcar con contenidos de almidón bajo, medio y alto mediante ambos métodos, durante 10 días por dos analistas, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Los resultados obtenidos de 10 repeticiones realizadas para cada técnica se muestran en la Tabla 5.

Empleando estos valores se calcularon desviaciones estándares de repetibilidad y reproducibilidad, sus correspondientes límites y la precisión total para ambas técnicas (Gor y Ruiz, 2006). Los resultados pueden observarse en la Tabla 6.

Estos parámetros, límite de repetibilidad y límite de reproducibilidad, son inferiores a los indicados en ICUMSA (2005) para ambas metodologías, por lo que se considera aceptable la precisión de ambas.

Tabla 5. Resultados obtenidos para tres muestras diferentes de azúcar analizados por ambos métodos.

Muestra	Método COPER-SUCAR			Método SPRI		
	Promedio	S	CV %	Promedio	S	CV %
1	133	4,0	3,0	181	1,7	1,0
2	238	5,8	2,4	285	6,6	2,3
3	1011	12,3	1,2	1117	13,6	1,2

Nota: el método 1 es el validado en Zossi *et al.*, (2008) y el método 2 es el validado en el presente trabajo.

Tabla 6. Límites de repetibilidad, reproducibilidad y precisión total para ambas metodologías.

	Método 1	Método 2
Límite de repetibilidad	6,90	2,45
Límite de reproducibilidad	7,98	8,41
Precisión total	3,73	3,10

Tabla 7. Comparación de muestras de azúcares. Prueba de Student con muestras apareadas.

	Variable 1	Variable 2
Media	363,00242	537,9823914
Varianza	59991,05384	88193,84141
Observaciones	15	15
Coefficiente de correlación de Pearson	0,986112807	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	-9,855030178	
P(T<=t) una cola	5,60E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,761310115	
P(T<=t) dos colas	1,12E-07	
Valor crítico de t (dos colas)	2,144786681	

También se analizaron 15 muestras de azúcares mediante ambos métodos y los resultados obtenidos fueron analizados mediante prueba estadística de diferencias pareadas y regresión lineal. Estos resultados se muestran en la Tabla 7 y Figura 4, respectivamente.

El análisis estadístico de comparación de muestras apareadas concluye que los métodos no son iguales, ya que el valor del estadístico t calculado es mayor que el valor crítico de t para prueba de dos colas.

$$Y = 1,1956X + 103,96$$

$$R^2 = 0,9724$$

R² indica que existe una correlación significativa entre ambas técnicas para una probabilidad de 95%, aunque por el método 2 se obtendrán siempre resultados mayores.

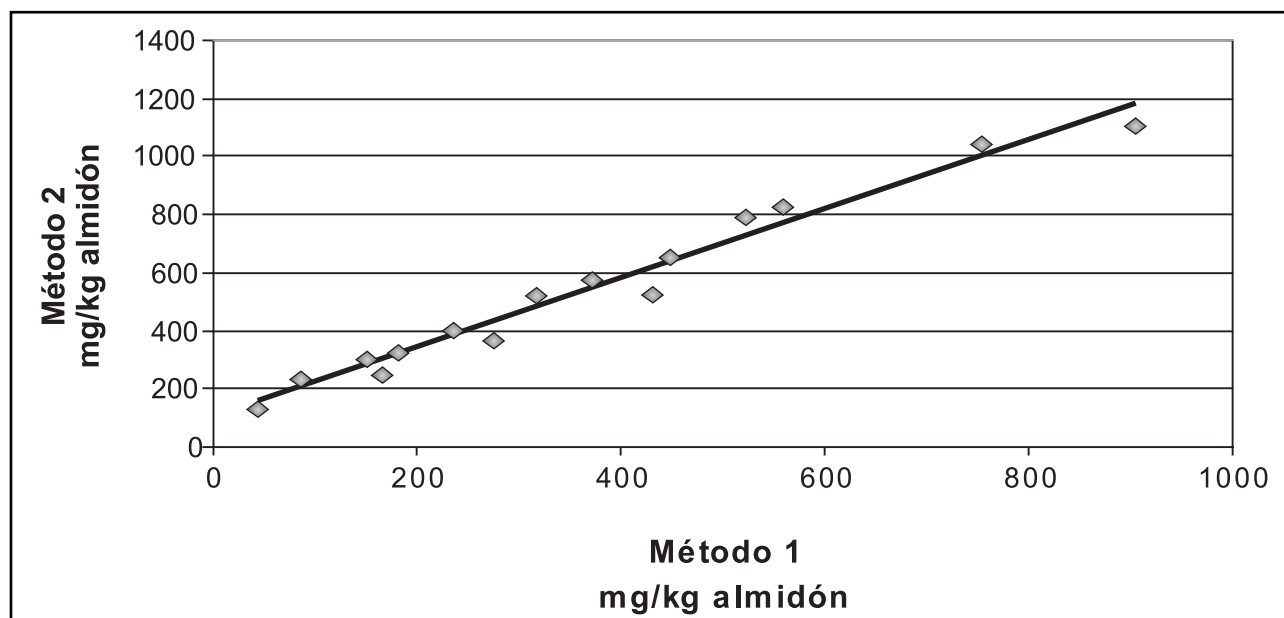


Figura 4. Regresión lineal entre ambos métodos.

En la Tabla 8 se resumen los parámetros obtenidos para ambos métodos.

CONCLUSIONES

El método desarrollado en el Sugar Processing Research Institute y validado para las condiciones de trabajo del Laboratorio de la Sección Química de la EEOC presentó resultados satisfactorios, ya que cumplen con las condiciones establecidas en un trabajo anterior (Zossi *et al.*, 2008). Se determinó su incertidumbre relativa, resultando igual a $\pm 6,18$ mg/kg para un intervalo de trabajo comprendido entre 33 y 2667 mg/kg de almidón en azúcar. Estos valores son menores a los mencionados como precisión en ICUMSA (2005).

El método validado en este trabajo fue comparado con el establecido por COPERSUCAR (2004) e ICUMSA

(2005), validado en un trabajo anterior (Zossi *et al.*, 2008), llegándose a la conclusión de que esta técnica rápida presenta un mayor rango de trabajo y menor incertidumbre.

Si bien a 95% de confianza, existe una diferencia estadística entre los resultados obtenidos con ambos métodos, hay una correlación lineal estadísticamente significativa entre ellos. Esto permitiría inferir resultados obtenidos mediante una metodología, con la otra.

Las cualidades a destacar del método rápido son su simpleza analítica, bajo tiempo de ejecución y menores requerimientos de reactivos químicos, lo que se traduce finalmente en una ventaja económica.

Por lo expresado anteriormente, se puede recomendar el empleo de esta técnica en trabajos de investigación, siendo también aconsejable su utilización como técnica de rutina en cualquier laboratorio de fábricas azucareras.

Tabla 8. Comparación estadística entre método 1 y 2.

	Método 1	Método 2
LD (mg/kg)	20	17
LQ (mg/kg)	25	33
Intervalo de trabajo (mg/kg)	25 – 600	33 – 2667
σ repetibilidad	5,95	0,75
Lím. repetibilidad (mg/kg)	6,90	2,45
σ reproducibilidad	7,96	8,84
Lím. de reproducibilidad (mg/kg)	7,98	8,41
Precisión total (mg/kg)	9,94	8,86
Lím. de confianza (mg/kg)	1 – 21	0 – 14
Recuperación	96 – 101 %	99 – 103 %
R ²	0,9988	0,9999
Incertidumbre relativa	10,80	6,18

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- COPERSUCAR. 2004.** Métodos de análisis em açúcar, alcohol 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. 2004.** Collaborative study on starch in raw sugar using the SPRI rapid starch method. En: Proc. SPRI Conference on Sugar Processing Research, Atlanta, Georgia, USA, pp. 442-448.
- Godshall, M. A., R. Triche and S. J. Moore. 2004.** A rapid starch test for use in cane mills. En: Proc. SPRI Conference on Sugar Processing Research, Atlanta, Georgia, USA, pp. 428-440.
- Gor, S. y M. Ruiz. 2006.** Curso Validación de técnicas analíticas de ensayos. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). 2005.** Method Book. Ed. Bartens, Berlin, Germany.
- Kornbilit, F. y E. Sebriano. 2005.** Curso: herramientas estadísticas para laboratorio. Sensplus, Buenos Aires, Argentina.
- Matic, M. 1971.** Starch determination in raw sugar by colorimetric methods. En: Proc. ISSCT Congress, 14, New Orleans, Louisiana, USA: pp 1434-1443.
- 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): completar con paginado al diagramarse el número.
-