

MÉTODO INDIRECTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALMIDONES A TRAVÉS DE AZÚCARES REDUCTORES EN VEGETALES

CAMPO TÉCNICO

5

La presente invención se ubica dentro del campo técnico de los métodos químicos para la determinación de almidón en productos vegetales, el presente método que se proporciona es más confiable y utiliza reactivos que disminuyen el impacto negativo en el medio ambiente, en comparación con otras técnicas.

10

Así las cosas, la presente invención se relaciona con un método indirecto de determinación del almidón presente en las matrices alimenticias de vegetales a partir de la cuantificación espectrofotométrica, de los azúcares reductores obtenidos, por medio del método de Miller modificado.

15

El método propuesto permite obtener la cuantificación de almidón por colorimetría mediante una técnica de fácil implementación en cualquier tipo de laboratorio.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20

En la actualidad, no se cuenta con protocolos que permitan determinar el almidón en productos como papa, tubérculos andinos y vegetales en general. En Colombia, se cuenta con las siguientes normas técnicas para la determinación de almidones en algunas matrices alimentarias específicas:

25

- NTC 926 Almidón de maíz sin modificar: en esta norma no se establece método para determinación de almidón.
- NTC 3228 Harina de achiras: remite a la NTC 926.
- NTC 4566 Productos cárnicos. Determinación del contenido de almidón:

30

establece determinación por método gravimétrico y por espectrofotometría.

En el primero se titula con tiosulfato la reducción producida por el azúcar reductor en el reactivo de Fehling; en el segundo, se realiza una extracción de proteína y azúcares no polisacáridos con etanol al 80% a una temperatura de 80°C, una hidrólisis para obtención de los azúcares reductores y posterior cuantificación espectrofotométrica con el reactivo de Antrona.

5

- NTC 5303 Productos para alimentación animal. Determinación enzimática del contenido total de almidón.
- NTC 6066 Almidón nativo de yuca: remite a la NTC 926, ISO 10529 ó AOAC 945.37 que corresponde a un método polarimétrico.

10

El Invima reporta entre las pruebas que realiza en alimentos, la cuantificación indirecta de almidón a partir de los azúcares por método volumétrico con modificación de la AOAC 935.62 (Revisión 2010) que incluye los métodos: volumétrico de Lane-Eynon, gravimétrico de Munson-Walker y espectrofotométrico de Folin y Wu.

15

Otra norma donde se cuantifica el contenido de azúcares reductores es la NTC 4355 Azúcar. Método de ensayo para la determinación del contenido de azúcares reductores. Método de Knigh y Allen, en el cual se realiza valoración con solución de Fehling.

20

La NTC 440 Productos alimenticios. Métodos de ensayo, establece las técnicas para determinar las características físicas y químicas de los productos alimenticios, y en ella se contempla la determinación de azúcares reductores por el método volumétrico de Lane-Eynon.

25

Lage, Simal y Salgado (1983) realizaron una revisión de los métodos utilizados para la determinación de almidón, identificando los siguientes: enzimático, polarimétrico, gravimétrico, volumétrico y colorimétrico. El método enzimático se basa en la hidrólisis ácida del almidón hasta glucosa mediante la acción de varios enzimas; el

30

método polarimétrico implica la hidrólisis ácida del almidón hasta convertirlo en glucosa y determinación con lectura en polarímetro; el método gravimétrico involucra una hidrólisis ácida del almidón; el método volumétrico conlleva una titulación; y el método colorimétrico se basa en la degradación del carbohidrato a derivados furfúricos por la acción del ácido sulfúrico y lectura con espectrofotometría.

Entre los beneficios y limitaciones de los métodos se encuentra que: el método enzimático es más rápido pero los reactivos son costosos y se requiere una buena elección de las enzimas; el método polarimétrico arroja menores errores en la medición pero tiene como limitante el costo y calibración del equipo, así como el uso de reactivos contaminantes; el método gravimétrico utiliza materiales y reactivos simples, dando resultados confiables, pero tiene como desventaja la prolongada duración del ensayo; el método volumétrico es de bastante uso pero tiene la limitación que no arroja resultados constantes ya que en gran medida depende de la lectura que haga el analista y al tener que realizar una titulación en caliente con agitación constante pueden generarse sesgos en la medición; y finalmente el método colorimétrico es también de uso frecuente pero puede verse afectada la lectura por la presencia de interferentes.

20

El método volumétrico de Lane-Eynon utiliza solución Fehling-Soxhlet la cual se prepara mezclando volúmenes iguales de soluciones de sulfato de cobre pentahidratado (Fehling A) y otra solución alcalina de tartrato de sodio y potasio e hidróxido de sodio (Fehling B). Además de una solución estándar de azúcar invertido al 1% preparada previamente.

25

En esta técnica se realiza titulación de la solución A + B y neutralización de 10 mL de solución de azúcar invertido con hidróxido de sodio 1M en un matraz volumétrico de 100 mL hasta completar el volumen con agua. Luego se transfiere la disolución a una bureta y se deja caer a un matraz Erlenmeyer que contenga

una mezcla de 5 mL de la solución A, 5 mL de la solución B y 50 mL de agua en ebullición. Se agrega la solución de azúcar invertido hasta un poco antes de la total reducción del cobre, y después 1 mL de la solución de azul de metileno y se completa la titulación hasta la decoloración del indicador. La titulación debe efectuarse en 3 minutos 5 aproximadamente a ebullición y agitación constantes.

Cuando se emplea el reactivo de glucosa se titula directamente, el título de la solución debe ser de 0,0505 a 0,0525 g de azúcares reductores x mL de titulación/ mL solución. Se calcula por multiplicación de los mL de solución requeridos en la titulación por la concentración de ésta en g/mL. El título se expresa indicando que 10 mL de la solución A + B corresponden a X gramos de azúcar invertido; este valor se utiliza en el cálculo de las soluciones problema.

Para la determinación de los reductores directos se pesa la muestra (de 5 a 10 g) y se coloca en un matraz volumétrico de 250 mL, se añaden 100 mL de agua destilada, se agita lo suficiente para que todo el material soluble en agua quede disuelto. Posteriormente, se añaden 2 a 10 mL de la solución saturada de acetato neutro de plomo, se agita y deja sedimentar. Se añade poco a poco oxalato de sodio o potasio hasta la total precipitación del acetato de plomo. Se completa el volumen con agua, se agita y filtra. Luego se transfiere el filtrado obtenido a una bureta y se titula.

Para la determinación de reductores totales se pesa la muestra (de 5 a 10 g) y se añaden 10 mL de HCl concentrado en matraz volumétrico. Se calienta a 65 °C durante 12 horas y se deja enfriar. Se neutraliza con hidróxido de sodio 10 M y se completa el volumen con agua. Se transfiere a una bureta y titula.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Con el presente método se determina de forma indirecta el almidón mediante 4 fases: preparación de la muestra, extracción de interferentes, hidrólisis ácida y cuantificación espectrofotométrica de azúcares reductores.

En la primera fase se calcula la cantidad de muestra para tener un valor representativo y garantizar la homogeneidad de la misma.

10 La segunda fase consiste en la extracción de carbohidratos interferentes de lectura, lo cual se hace con etanol al 85% v/v (ó 14,58 M), donde los monosacáridos, disacáridos y demás oligosacáridos son disueltos. Por centrifugación se obtiene dos fases, en donde el precipitado contiene los polisacáridos, entre ellos el almidón y la celulosa.

15 En la tercera fase se realiza una hidrólisis ácida con una solución de ácido perclórico, ácido acético y agua en proporciones de 3 mL: 3 mL: 4 mL, en su orden (solución acuosa de ácido perclórico 3,08 M en ácido acético 5,26 M). La hidrólisis se realiza con volúmenes bajos de solución ácida por lo que no se presenta
20 hidrólisis de la celulosa, polisacárido de significativa presencia en los productos vegetales y que puede ser un interferente en la cuantificación del almidón.

La cuarta fase implica la cuantificación de los azúcares reductores por espectrofotometría con el método de Miller modificado. El método cuantitativo por espectrofotometría tiene mejores resultados en exactitud y precisión en
25 comparación con los métodos volumétricos y gravimétricos. Con la lectura de los azúcares reductores se realizan los cálculos para expresar la cantidad de almidón presente en la muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, se ilustrará la invención desarrollada mediante ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la técnica.

5

El método que se describe en el presente documento corresponde a un método indirecto por colorimetría de cuantificación de almidón a partir de la medición de los azúcares reductores.

10

En la técnica propuesta se eliminan reactivos contaminantes que afectan a las personas y al medio ambiente, y se disminuyen las cantidades de los reactivos usados, sin afectar la exactitud y la precisión de lectura. Lo anterior reduce los costos del método representados en reactivos y el tiempo de dedicación del analista en la titulación en caliente utilizada con el método de Lane-Eynon, que es una de las técnicas más utilizadas.

15

Aunque existen otra técnica como la polarimetría que es más precisa, el costo del equipo la hace menos accesible a laboratorios, así como a pequeñas y medianas industrias de alimentos; y además utiliza reactivos altamente contaminantes.

20

El presente método implica las siguientes 4 fases:

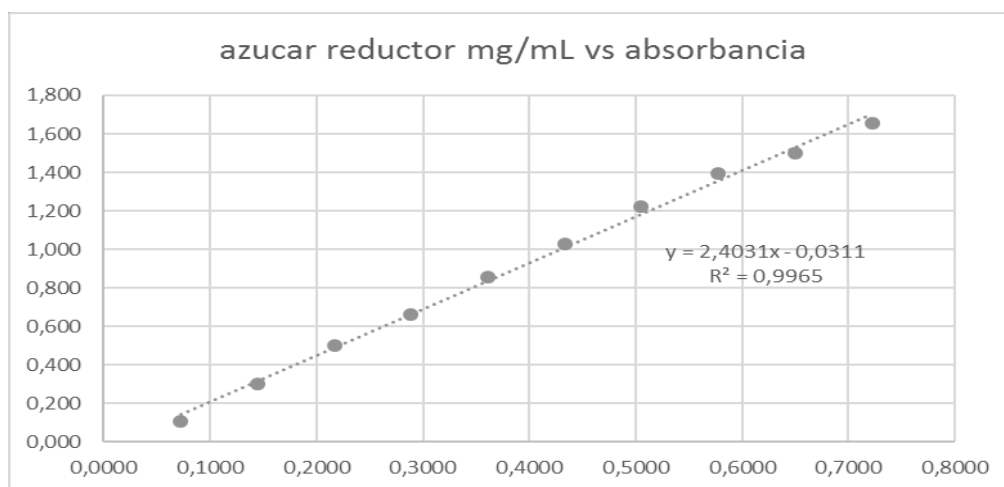
Fase 1. Preparación de la muestra

25

El método inicia con el cálculo de la muestra según el tipo de producto. Para esto, se toma un patrón de glucosa de concentración 0,700 mg/mL con el que se realizan 10 diluciones acuosas en un rango entre 0,07 y 0,700 mg/mL. Posteriormente se adiciona a cada dilución ácido dinitro salicílico (DNS) el cual al hacer reacción produce coloración naranja y permite la lectura de la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.

30

Con los datos obtenidos se elabora la curva de calibración:



5 Grafica 1: curva de calibración glucosa

Se toma el valor de concentración de azúcares reductores más cercano a 0.5 de absorbancia para realizar el cálculo de la muestra.

10 Por otro lado, se toma el valor teórico de contenido de almidón presente en la matriz alimentaria en su composición nutricional.

Con los valores anteriores se calcula el peso de la muestra con la siguiente ecuación:

15

Ecuación 1: cálculo del peso de la muestra

$$g \text{ muestra} = \left(\frac{100 \text{ g de muestra}}{X \text{ g de almidon teorico}} * \frac{\text{valor de concentracion de azucar red. correspondiente a absorbancia cercana 0.5 de absorbancia}}{10} \right)$$

20 Se toman 100 g del producto a analizar y se homogeniza mediante licuado hasta obtener una textura tipo puré. De este puré se toma la muestra calculada mediante la ecuación.

Fase 2. Extracción de interferentes

Se toma la muestra calculada en la fase anterior, se mezcla con 10 mL de etanol al 85% v/v ó 14,58 M, y se lleva a baño maría por 5 minutos a 75°C, temperatura inferior a la de ebullición del etanol, que corresponde a 78.3°C, y evita su evaporación. La mezcla obtenida se deja reposar por 30 minutos, luego del reposo se centrifuga a 3600 r.p.m por 20 minutos. Del producto de centrifugado se separa el sobrenadante y el precipitado. El sobrenadante se desecha y se utiliza el precipitado en la siguiente fase.

10

Fase 3. Hidrólisis ácida

El precipitado se mezcla con una solución ácida de ácido perclórico, ácido acético y agua en una proporcionalidad de 3 mL: 3 mL: 4 mL, en su orden (o solución acuosa de ácido perclórico 3,08 M en ácido acético 5,26 M). La mezcla obtenida se debe dejar en digestión entre 40 a 50 horas a una temperatura entre 50 °C a 57 °C, esta temperatura es inferior al punto de gelificación del almidón y favorece la hidrólisis de los ácidos sin atacar la celulosa. Se debe realizar agitación cada 12 horas, y al terminar el período de reposo, con un Vortex. El tiempo y la agitación facilitan el rompimiento de las cadenas de almidón, la hidrólisis total del mismo y su homogenización.

Luego de cumplir el reposo, se debe traspasar a un vaso de precipitados de forma analítica, es decir que se arrastra la totalidad del líquido sin tener pérdidas. Esto se hace mediante 2 enjuagues con agua destilada y un posterior enjuague final con 5 mL de NaOH al 10 M. La mezcla se neutraliza con solución de NaOH al 10 M, ó hasta un pH entre 8 y 10. Finalmente se afora la mezcla a 100 mL en un balón con agua destilada y se agita para su homogenización.

25

Fase 4. Cuantificación espectrofotométrica de los azúcares reductores

Esta fase se realiza con el método Miller modificado. Para tal fin, se toma 1 mL de la solución obtenida en la fase anterior y se agrega 1 mL de DNS, en un tubo con tapa rosca de 10 mL. Esta mezcla se lleva a un baño maría en ebullición por 10 minutos, pasado este tiempo se adiciona 1 mL de agua destilada y se lleva a refrigeración a 4°C por 10 minutos en oscuridad, para detener la reacción y evitar el efecto de la luz en la reacción, que es de tipo colorimétrico.

Posteriormente, se realiza lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm para medir la absorbancia del producto, previa calibración a cero del equipo con el blanco de reactivos. La lectura del espectrofotómetro corresponde a la absorbancia que refleja el grado de concentración de los azúcares reductores.

Con la curva de calibración inicial de la primera fase (gráfica 1) de las diluciones del patrón de glucosa, se calcula el valor de la pendiente y el intercepto, que se obtienen de la relación entre absorbancia y concentración de azúcares reductores de los patrones de glucosa.

Mediante la siguiente ecuación se establece la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra:

Ecuación 2: Cálculo para determinar azucares reductores.

$$\text{azúcares reductores} = \frac{g \text{ azúcares reductores}}{100 g \text{ de muestra}} = \left\{ \frac{A_m - B}{P} \right\} \frac{mg \text{ azúcares reductores}}{mL} * \frac{V_i}{W} * \frac{1 g}{1000 mg} * 100\%$$

Dónde:

A_m = absorbancia de la muestra

B = intercepto de la curva de calibración inicial

5 P = pendiente de la curva de calibración inicial,

estos 3 valores se expresan en mg de azúcares reductores /mL

V_i = volumen de aforo de la muestra en mL, valor que corresponde a 100 mL

W = peso de la muestra en g

10 Con el valor de los azúcares reductores se calcula el contenido del almidón con la siguiente ecuación:

Ecuación 3: Cálculo para determinar el porcentaje de almidón en la muestra.

$$\text{almidon en \%} = \frac{g \text{ almidón}}{100 g \text{ de muestra}} = \text{azucars reductores obtenidos} * 0,98$$

15

La prueba se validó realizando análisis de muestras de almidón soluble de grado analítico que reporta en su composición un contenido de almidón promedio del 99%, con el método propuesto y con la técnica de Lane-Eynon. Para el método propuesto se obtuvieron valores promedio de almidón de 94,24%, mientras que con la técnica

20 de Lane-Eynon se obtuvo un valor promedio de 73,78%.

20

Con el fin de comprobar que en el método propuesto se retiran los interferentes y que no se presenta destrucción de la glucosa, que corresponde al azúcar mayoritario presente en el almidón, se realizaron las técnicas de la invención y la

25 de Lane-Eynon, con un patrón de glucosa.

25

En el análisis se evidencia que, con la fase de extracción de interferentes, la glucosa se retira por acción del etanol; esto se comprueba con la espectrofotometría por cuanto su valor es inferior al rango de lectura (0.05 mg/mL). Por otra parte, al

determinar los azúcares totales, de otra muestra de glucosa, se encontraron valores promedio del 94,69%, situación que confirma la presencia de este analito, y por tanto que ninguno de los pasos de la técnica destruye la glucosa.

- 5 Por otro lado, con el fin de evaluar que los reactivos utilizados en la hidrólisis ácida no destruyen la celulosa y se obtenga falsos positivos, representados en azúcares reductores provenientes de este polisacárido, se realizaron mediciones a muestras de celulosa con la invención y la técnica de Lane-Eynon. En los resultados arrojados con las dos técnicas no se encontró la presencia de celulosa.

10

En todos los análisis realizados con el método de Lane-Eynon se encontró que los resultados no son constantes debido a que dependen de la lectura que haga el analista en la titulación, la cual se realiza en caliente con agitación constante, condiciones que pueden ocasionar sesgos en la medición además de la exposición a altas temperaturas por tiempos prolongados de la persona. Adicionalmente, se consumen cantidades significativas de reactivos lo cual tiene impacto en el costo de la prueba y sobre el medio ambiente.

15

La descripción hecha hasta ahora no es ni pretende ser de alguna manera limitante del alcance de la presente solicitud, de acuerdo a como se establece y define en el capítulo reivindicatorio adjunto.

20

Ejemplos

25

Se realizaron análisis para 3 matrices alimentarias (cebolla de rama, cubio y papa criolla) utilizando la invención y la técnica de Lane-Eynon, reportada en la NTC 440, la cual es de amplio uso, para determinar el contenido de almidón y también el de azúcares reductores libres y carbohidratos totales.

Los valores obtenidos, expresados en g por 100 g de muestra, se presentan a continuación:

Componente	Técnica	Cebolla de rama	Cubio	Papa criolla
% promedio almidón	Invención	2,17	4,23	13,92
	Lane-Eynon	5,41	5,27	15,97
	Teórico	No se encuentran datos	3,99 (Barrera, Tapia y Monteros, 2004)	12,45 (Alba, Duarte, Peña y Piñeros, 2013)
% promedio azúcares reductores libres	Invención	2,91	2,94	0,36
	Lane-Eynon	4,57	4,34	1,03
	Teórico	4,28 (Fatsecret, s.f.)	2,90 (Barrera, Tapia y Monteros, 2004)	0,77 (Fatsecret, s.f.)
% promedio carbohidratos totales	Invención	4,77	6,44	17,78
	Lane-Eynon	6,27	9,26	21,60
	Teórico (según tabla de ICBF)	5,5	4,7	19,3

Tabla 1: medición de almidón, azúcares reductores libres y carbohidratos totales para tres matrices.

- 5 Es de anotar que, en el análisis estadístico, aplicado también en laboratorio químico, se consideran como márgenes aceptables de error alrededor del 5% (Miller & Miller, 2002).

- 10 Adicionalmente, en la literatura se encuentra que para productos vegetales se reportan valores de su composición nutricional, en los que se incluyen los carbohidratos totales, pero en muy pocas ocasiones se encuentran valores para almidón y azúcares reductores libres. El conocimiento de la cantidad presente de estos componentes es significativo cuando se evalúan los productos en procesos de transformación a nivel industrial.

Referencias bibliográficas

- 5 Alba, A., Duarte, D., Peña, C. y Piñeros, C. (2013). La papa como alimento. Proyecto SAN Nariño. Pasto: Universidad de McGill y Universidad Nacional de Colombia.
- Association of Official Agricultural Chemists (2010). *Official Methods of Analysis*. AOAC 935.62. Washington.
- 10 Barrera, V., Tapia, C. y Monteros, A. (2004). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Lima: Centro Internacional de la papa.
- 15 Fatsecret España (15 de agosto de 2018). Alimentos. Recuperado de: <https://www.fatsecret.es/calor%C3%ADas-nutrici%C3%B3n/>
- 20 Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2016). NTC 926. Productos de molinería. Almidón de maíz no modificado. 13 de abril de 2016. Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2015). NTC 440. Productos alimenticios. Métodos de ensayo. 25 de agosto de 2015. Colombia.
- 25 Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2015). NTC 926. Productos de molinería. Almidón de maíz no modificado. 13 de abril de 2016. Colombia.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2014). NTC 5303. Productos de molinería. Almidón nativo de yuca. Determinación enzimática del contenido total de almidón. 16 de julio de 2014. Colombia.

- 5 Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2012). NTC 4355. Azúcar. Método de ensayo para la determinación del contenido de azúcares reductores. Método de Knigh y Allen. 12 de diciembre de 2012. Colombia.

- 10 Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2009). NTC 4566. Productos cárnicos. Determinación del contenido de almidón. 19 de agosto de 2009. Colombia.

- 15 Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2004). NTC 5303. Productos para alimentación animal. Determinación enzimática del contenido total de almidón. 12 de noviembre de 2004. Colombia.

- 20 Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (1991). NTC 3228. Industrias alimentarias. Almidón de achira. 20 de noviembre de 1991. Colombia.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2012). NTC 4355. Azúcar. Método de ensayo para la determinación del contenido de azúcares reductores. Método de Knigh y Allen. 12 de diciembre de 2012. Colombia.

- 25 Lage, Ma A., Simal, J. y Salgado, G. (1983). Determinación de almidón en alimentos. Revista: Trabajos compostelanos de biología. 10, 15-25. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Jesus_Simal-Lozano/publication/235700249_Determinacion_de_almidon_en_alimentos/links/02bfe513dc78894e15000000/Determinacion-de-almidon-en-alimentos.pdf
- 30

Miller, J.C. y Miller, J.N. Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid:
Prentice Hall.