

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS DE DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN DE MAÍZ

Nadia Z. Comba, Romina A. Beltrán

Tutor: Dra. Mariana, Montenegro y Mg. Fernando, Bonaterra

Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química -GISIQ - F. R. Villa María de la UTN Av. Universidad 450, X5900HLR, Villa María, Córdoba, Argentina.

combanadia@gmail.com

Resumen

El almidón es el componente más importante en la producción de etanol a partir de granos, como el maíz, debido a que es el determinante del rendimiento del proceso. Por este motivo se investigaron técnicas de cuantificación de almidón, se ensayaron y se analizaron los resultados obtenidos. Se emplearon técnicas oficiales de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), las cuales emplean hidrólisis ácida y cuantificación por gravimetría o titulación, como así también un método enzimático con cuantificación espectrofotométrica. Los resultados así obtenidos fueron comparados con los generados por el método de determinación de almidón por la técnica polarimétrica de Ewers modificada, norma IRAM15859, realizada por un laboratorio privado.

Del análisis de los resultados obtenidos en las actividades desarrolladas se concluye que el método que menor error presenta es el de polarimetría, para el cual se necesita equipamiento no disponible en todos los laboratorios. El método de hidrólisis ácida de la AOAC utiliza materiales y reactivos simples, dando resultados confiables, pero tiene como desventaja la prolongada duración del ensayo. La hidrólisis enzimática es más rápida, pero los reactivos son costosos y la repetibilidad de los resultados no está asegurada.

PALABRAS CLAVES: cuantificación de almidón, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, técnica polarimétrica de Ewers modificada.

1. Introducción

1.1. Maíz

La producción de bioetanol ha tenido un crecimiento importante en los últimos años, siendo la principal materia prima el maíz, y presenta buenas proyecciones a futuro. Esto se debe a su disponibilidad, como así también al elevado rendimiento que presenta frente a otros cereales (K.A. Jacques, 2003).

El grano de maíz tiene 3 componentes principales almidón, proteína y aceite, los cuales están contenidos en tres estructuras: el germen (embrión), el endospermo y el pericarpio (figura 1). Los componentes principales se encuentran distribuidos en cada estructura en diferentes proporciones, las cuales se muestran en la tabla 1, como así también la composición del grano de maíz entero, siendo el componente más importante el almidón (Alvarez, 2006).

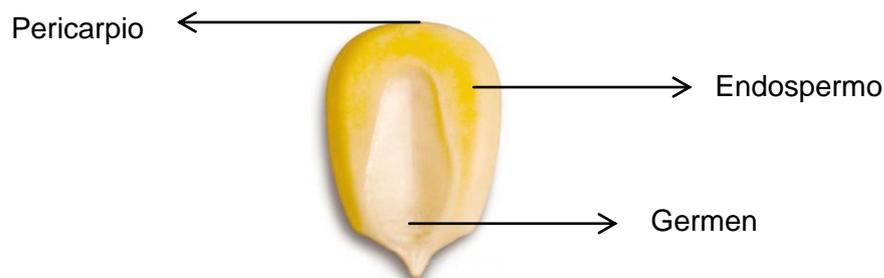


Figura 1: Partes del grano de maíz (Alvarez, 2006)

Tabla 1: Composición de grano de maíz dentado y de sus partes.

	% del grano entero en BS		Composición de las partes del grano en BS (%)		
			Almidón	Grasa	Proteína
Germen	Rango	10,5-13,1	5,1-10,0	31,1-38,9	17,3-20,2
	Promedio	11,5	8,3	34,,4	18,5
Endospermo	Rango	80,30-83,5	89,9-88,9	0,7-1,1	6,7-11,1
	Promedio	82,3	86,6	0,86	8,6
Pericarpio	Rango	4,4-6,2	3,5-10,4	0,7-1,2	2,9-3,9
	Promedio	5,3	7,3	0,98	3,5
Grano Entero	Rango	-	67,8-74,0	3,98-5,8	8,1-11,8
	Promedio	100	72,4	4,7	9,6

FUENTE: (BeMiller & Whistler, 2009)

1.2. Almidón

El almidón, por sus características nutricionales y sus múltiples aplicaciones en la industria, es el carbohidrato más importante. Es un polisacárido vegetal que se encuentra presente principalmente en los granos de cereales, tubérculos, frutas y varias legumbres. Están formados por dos tipos de moléculas, amilosa y amilopectina, ambos son polímeros de unidades α D-glucosa (Alvarez, 2006).

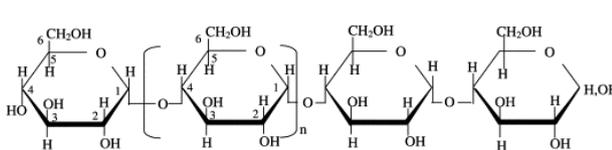


Figura 2: Estructura de amilosa (Tester R. F., 2004)

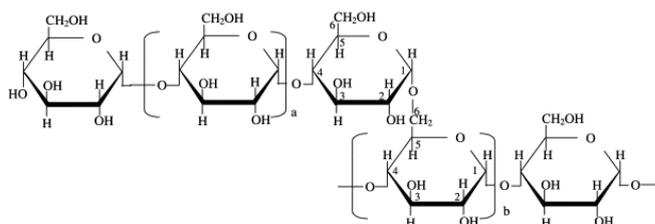


Figura 3: Estructura de amilopectina (Tester R. F., 2004)

Los métodos utilizados para la determinación cuantitativa de almidón consisten básicamente de dos etapas, hidrólisis de almidón a glucosa y cuantificación de la misma. Las técnicas analíticas oficiales de la AOAC constan de una hidrólisis ácida y formación de óxido de cobre (I), medido luego por gravimetría o titulación (AOAC, 1988). Otro método analizado es el basado en el Kit Sigma-Aldrich que involucra las etapas de hidrólisis enzimática y posterior cuantificación por colorimetría. Los resultados obtenidos mediante las técnicas antes mencionadas, fueron comparados con los generados por el método de polarimetría, determinación realizada en un laboratorio privado, el cual da resultados en base seca, por lo que fue necesario realizar determinaciones de humedad a las muestras analizadas.

2. Materiales y Métodos

2.1. Reactivos

Para las técnicas de la AOAC se emplearon ácido clorhídrico y tartrato de sodio y potasio grado ACS, Anedra Argentina, hidróxido de sodio, permanganato de potasio, sulfato férrico amonio, oxalato de sodio y o-fenantrolina grado ACS, Cicarelli Argentina, sulfato de cobre grado Pro-análisis, Cicarelli Argentina, Celite Hyflo Super-Cel, Celite. Mientras que para el método enzimático se emplearon los reactivos incluidos en el kit de determinación de almidón, α -amilasa, almidón de maíz, glucosa oxidasa/peroxidasa, o-dianisidina, glucosa, Sigma-Aldrich, Estados Unidos.

2.2. Muestras

Se utilizaron muestras de maíz dentado provenientes de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

2.3. Equipos

En las determinaciones se emplearon molino Arcano, agitador magnético, balanza Analítica OHAUS, bomba de vacío Arcano, filtros Gooch, baño termostático, Espectrofotómetro UV-Vis MetroLab 1700, estufa de secado con corriente de aire y desecador.

2.4. Técnicas analíticas de la AOAC

Se utilizó la técnica 920.44 para la hidrólisis ácida del almidón y la 906.03 para la precipitación y cuantificación del óxido de cobre (AOAC, 1988).

Para la determinación se emplearon 5 g de muestra molida. Se ensayaron los métodos de hidrólisis ácida indirecta (muestras con calcio) y directa (muestras sin calcio), cuya diferencia entre ambas es el tratamiento de la muestra con ácido clorhídrico diluido o agua destilada, respectivamente, determinándose que el método directo es el correcto para las muestras en análisis. Posteriormente se filtró y lavó la muestra tratada, recuperándose el residuo insoluble, al cual se le agregó 20 ml de ácido clorhídrico, $\delta=1,125$ g/ml, 200 ml de agua destilada y se calentó durante 2,5 h en un balón provisto de condensador para evitar la evaporación. A continuación se enfrió y neutralizó con hidróxido de sodio en perlas, se transfirió a un matraz de 250 ml, se enrasó con agua destilada y se filtró. A 25 ml del líquido obtenido se le agregaron iguales volúmenes de tartrato alcalino, sulfato de cobre (preparados según el método 923.09, (AOAC, 1988)) y agua destilada, dando un volumen final de 100 ml. Se procedió a calentar cuidadosamente esta solución durante 4 minutos, seguidos de 2 minutos de ebullición, tiempos que debieron respetarse de manera rigurosa. En caliente se filtró mediante un filtro Gooch, previamente preparado con un lecho de diatomea, secado a estufa a 100°C, hasta peso constante. Luego del filtrar la totalidad de la muestra se lavó con agua, a 60°C, y con alcohol etílico, para acelerar el proceso posterior de secado. Se secó en estufa a 100°C hasta peso constante, luego se pesó y el contenido de óxido de cobre (I), se leyó en la tabla contenida en el apartado 940.39 (AOAC, 1988), para convertirlo en glucosa y posteriormente en almidón.

2.5. Método de hidrólisis enzimática, Sigma

El procedimiento fue realizado de acuerdo a lo indicado en el kit de determinación de almidón STA20 de Sigma- Aldrich, Inc. (Sigma)

La muestra debió ser finamente molida, lo cual se realizó con molino de laboratorio y luego con mortero, no llegando a obtenerse la granulometría indicada en el procedimiento. Se ensayaron los pre-tratamientos para muestras que contuviesen glucosa o maltodextrina y/o almidón resistente, concluyéndose que los mismos no eran necesarios para las muestras en análisis.

Al no ser necesarios pre-tratamientos, el análisis comenzó con la digestión del almidón. Se pesó 10 mg de muestra, a la cual se le agregó 0,2 ml de etanol 80%, se mezcló y agregó 3 ml de agua y 0,02 ml de α -amilasa, se agitó e incubó 5 minutos en baño de agua hirviente. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se llevó el volumen a 10 ml con agua destilada. Se tomó 1 ml de esta solución, a la cual se le agregó 1 ml de la solución de almidón provista por el kit, se mezcló e incubó 15 minutos en baño de agua a 60°C con agitación. Se tomó 1 ml y se lo enrasó a 10 ml con agua.

La siguiente etapa fue la determinación de la glucosa, para la cual se tomó 1 ml de la solución obtenida al final de la digestión del almidón, se le agregó 2 ml de reactivo de glucosa, se mezcló e incubó exactamente 60 minutos (tiempo corregido de acuerdo a la granulometría de la muestra). La reacción se frenó con 2 ml de ácido sulfúrico 12N, se mezcló y midió la absorbancia a 540 nm. La técnica requiere un blanco de reacción, el cual consiste en un análisis en paralelo sin muestra.

La curva de calibración se realizó analizando cantidades conocidas del almidón de maíz de referencia, con el procedimiento descrito anteriormente, con la única diferencia que aquí se incubó 30 minutos, ya que la granulometría era óptima.

2.6. Método polarimétrico Ewers

Este ensayo fue realizado por un laboratorio privado, y corresponde a una determinación oficial. El método comprende una doble determinación. En la primera, la muestra se trató en caliente mediante ácido clorhídrico diluido. Previa evacuación y filtración, se midió mediante un polarímetro el poder rotatorio de la solución. Esta etapa permitió determinar el contenido en almidón y sus productos de degradación de alto peso molecular. En un segundo paso, la muestra se extrajo con etanol al 40%. Tras la acidificación del filtrado con ácido clorhídrico, evacuación y filtración, se midió el poder rotatorio en las mismas condiciones que en la primera determinación. Mediante esta determinación se eliminan los productos que interfieren en la primera lectura (FEDNA, 2000).

2.7. Humedad

Se secaron cápsulas de vidrio a 130°C hasta peso constante, en ellas se pesaron muestras de aproximadamente 1g, se llevó el producto a 130°C bajo presión atmosférica normal, durante una hora y media, continuando el tratamiento hasta peso constante (Panreac Química S.A., 2006). La determinación se realizó por duplicado.

2.8. Análisis de datos

El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa StatGraphics Centurion.

3. Resultados y Discusión

Para la realización de las técnicas seleccionadas, fueron necesarias algunas modificaciones y/o pruebas para asegurar la correcta elección. Los métodos de la AOAC presentan diversas opciones para cuantificar el óxido de cobre (I), de las cuales se probaron titulación y gravimetría, resultando más conveniente esta última. Para la titulación era necesario disolver el precipitado de óxido de cobre (I), generándose en este paso pérdida de muestra. Además se reemplazó el lecho filtrante dado en la técnica, debido a su demostrada toxicidad.

En relación a la determinación por hidrólisis enzimática, se probaron los tratamientos sugeridos por el kit de determinación de almidón de Sigma-Aldrich, para muestras con glucosa, maltodextrina y/o almidón resistente, determinándose que para los maíces en análisis no fueron necesarios. Debido a las dificultades para lograr la granulometría indicada en el procedimiento, se ensayaron tiempos de digestión más prolongados, verificándose la necesidad de incubar la muestra durante 60 minutos, no 30 minutos como se especifica en el procedimiento. Para la interpretación de los resultados debió elaborarse una curva de calibración, analizando almidón de maíz de referencia.

Las determinaciones por el método polarimétrico se encargó a un laboratorio privado y no presentaron mayores dificultades.

Las comparaciones que a continuación se analizan, fueron realizadas con los datos de almidón en base seca.

Se analizaron 26 muestras mediante las técnicas de la AOAC por duplicados, en algunos casos por el mismo analista y en otros por diferentes, razón por la cual se consideró en primer lugar la influencia de estos en la obtención de resultados, mediante el análisis de muestras pareadas. Se concluyó que los duplicados, realizados por el mismo analista o distintos, son estadísticamente iguales, pudiendo promediarse para ser comparados luego con los resultados de los demás métodos.

El método enzimático se realizó a 6 muestras por duplicados. De los datos obtenidos sólo se analizaron aquellos cuya diferencia entre duplicados fue menor al 5%, descartándose 2 muestras con diferencias superiores al 14%.

La comparación entre métodos fue realizada tomándolos de a dos, mediante el análisis de muestras pareadas. La distribución de las diferencias entre los resultados del método de la AOAC con la polarimétrica es sesgada, mostrando una tendencia de este último a dar valores superiores a los obtenidos por el método analítico, con una mayor frecuencia la diferencia entre 1,8% y 2,1%.

Cuando se analizaron los resultados del equipo de polarimetría versus el método enzimático la curva de densidad de diferencias se mostró sesgada, significando que el método enzimático dio valores mayores para idénticas muestras. Mediante los ensayos realizados se comprobó además que este método presenta también el inconveniente de la falta de repetibilidad de los resultados, siendo una de las probables causas la mínima cantidad de muestra con la que se trabajó, y los errores que esto conlleva. Cabe destacar que la cantidad de muestras analizadas con el kit Sigma es significativamente menor que con los otros métodos.

Al compararse los métodos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática, en este caso también se observa que los valores obtenidos mediante el último método son significativamente mayores.

Finalmente se analizaron los tres métodos simultáneamente, obteniéndose los valores estadísticos mostrados en la Tabla 2. Aquí puede observarse que la menor desviación estándar y coeficiente de variación los presenta el método de polarimetría, teniendo la hidrólisis ácida valores levemente superiores.

Tabla 2: Resumen estadístico de los métodos analizados

	Muestras analizadas	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo (%)	Máximo (%)	Rango (%)
Hidrólisis ácida	26	68,73	1,44	2,09%	66,10	71,44	5,34
Polarimetría	26	71,01	1,24	1,75%	66,60	72,60	6,00
Hidrólisis enzimática	4	72,95	3,54	4,86%	68,49	77,13	8,64

Al realizar la gráfica de dispersión de los datos obtenidos mediante los tres métodos (Figura 4), puede concluirse que el método polarimétrico presenta la menor desviación, siendo esta levemente superior para la hidrólisis ácida. La diferencia entre los valores obtenidos mediante los métodos antes mencionados es del -2,6%, tomando como referencia el método polarimétrico, siendo esta variación independiente del contenido de almidón. El método de hidrólisis enzimática presenta mayor desviación, con tendencia a valores superiores.

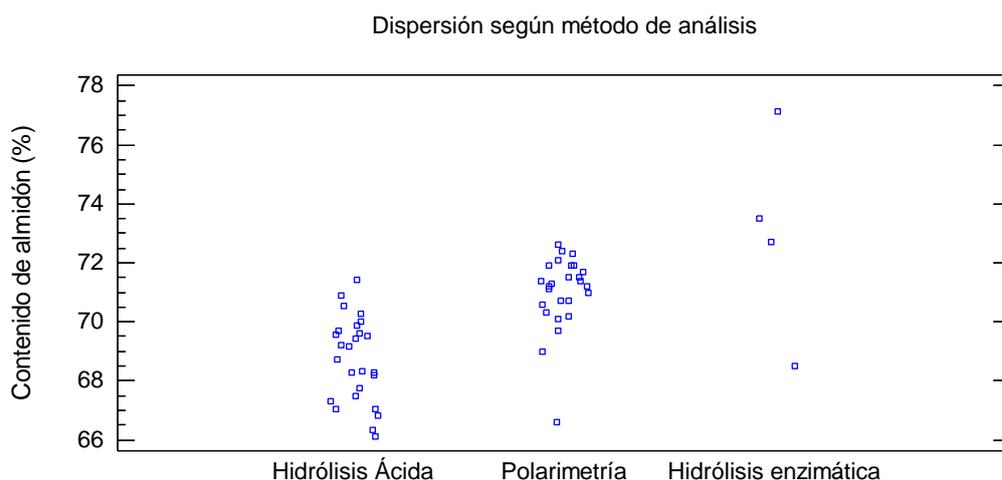


Figura 4: Gráfico de dispersión según el método de análisis.

4. Conclusiones

La puesta a punto del método de hidrólisis ácida de la AOAC no fue simple. Se cambió el lecho filtrante, debiendo encontrarse uno que funcionara adecuadamente y no fuese nocivo para los analistas y/o el medio ambiente. Los materiales necesarios para el desarrollo de la técnica son comunes y están disponibles en la mayoría de los laboratorios. Los reactivos necesarios tampoco llevaron mayores complicaciones. La cuantificación de óxido de cobre (I) puede realizarse de diversas maneras, se ensayaron titulación y gravimetría, para determinar que esta última era menos laboriosa y más precisa. Como cualquier técnica analítica, los resultados dependen de la habilidad del analista, en algunos casos debieron realizarse más de 2 ensayos para obtener datos confiables. Para completar esta técnica, al igual que la hidrólisis enzimática, fue necesaria la determinación de la humedad de la muestra. La hidrólisis es un proceso que requiere mucho tiempo, más aún la ácida, motivo por el cual la técnica de la AOAC es prolongada y requiere muchos materiales.

El método enzimático es más rápido que la hidrólisis ácida, requiere de espectrofotómetro, y los reactivos incluidos en el Kit de determinación de almidón de Sigma, los cuales son costosos. Al utilizarse pequeñas cantidades de muestra puede inferirse en importantes errores de muestreo y pesada principalmente.

Si se comparan las medias obtenidas con el valor promedio de almidón en maíz, 72,4% en base seca, la menor diferencia la presenta el método de hidrólisis enzimática, pero la desviación estándar es elevada, razón por la cual se elige como más preciso la determinación polarimétrica. Si se cuenta con el polarímetro, esta técnica es la recomendada, además de ser oficial y estar certificada. En laboratorios que no cuenten con el equipo antes mencionado se recomienda utilizar la técnica de hidrólisis ácida, cuantificando por gravimetría, ya que la desviación estándar y el error no son aceptables.

5. Agradecimientos

A la SCyT de la FRVM de la UTN por el apoyo recibido para el desarrollo del presente trabajo y a la empresa PORTA Hnos S.A. por sus aportes de insumos, equipamientos y disponibilidad de información técnica específica que permitieron la realización de los ensayos experimentales. Los cuales fueron recibidos en el contexto del convenio de vinculación tecnológica existente.

Al Mg. José Peralta de la FRVM por el apoyo en el análisis e interpretación de los datos estadísticos.

6. Referencias

- Alvarez, A. (2006). Aplicaciones del maíz en la tecnología alimentaria y otras industrias. ILSI Argentina.
- AOAC. (1988). Official methods of analysis of AOAC international.
- BeMiller, J., & Whistler, R. (2009). Starch, Chemistry and technology. Elsevier.
- FEDNA. (2000). Almidón. Método polarimétrico (EWERS). España.
- K.A. Jacques, T. L. (2003). The alcohol textbook.
- Panreac Química S.A. (2006). Métodos analíticos en alimentaria. Cereales, derivados de cereales y cerveza.
- Sigma. Kit de determinación de almidón (método amilasa/amiloglucosilasa). Producto STA20. USA.
- Tester R. F., K. J. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39, 151-165.