

**CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE AMILOSA Y AMILOPECTINA
EN HARINAS Y ALMIDONES NATIVOS DE YUCA (*Manihot esculenta Crantz*)**

DIANA SULENY BOLAÑOS CASTRO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011**

**CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE AMILOSA Y AMILOPECTINA EN
HARINAS Y ALMIDONES NATIVOS DE YUCA (*Manihot esculenta Crantz*)**

Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar el título de química

DIANA SULENY BOLAÑOS CASTRO

DIRECTOR

OLGA LUCIA HOYOS SAAVEDRA Ph.D.

Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales

ASESOR

MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA Ph.D.

Grupo de Investigación en Biotecnología, Calidad Ambiental y Seguridad
Agroalimentaria

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011**

Nota de Aceptación

Directora _____
Ph.D. OLGA LUCIA HOYOS SAAVEDRA

Jurado _____
Ph.D. RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ

Jurado _____
Ph.D. LUIS ALBERTO LENIS VELASQUEZ

Fecha de sustentación: Popayán, 16 de Septiembre de 2011

A mis padres
Ermencia Castro y Efen Bolaños

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme estar aquí todavía y poder cumplir este sueño.

Al Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural y al Centro Regional de Productividad e Innovación del Cauca por la financiación del proyecto

A la Universidad del Cauca por acogerme durante durante todos estos años de formación profesional.

A la Unidad de Análisis Industriales por el préstamo de los equipos que fueron necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Olga Lucia Hoyos por aceptar ser mi directora de tesis, brindándome la oportunidad de ampliar y afianzar mis conocimientos y porque además de tiempo, paciencia y dedicación siempre tuvo para mí un consejo que me permitió crecer profesional y personalmente.

A mi asesora, la Doctora Maite del Pilar Rada Mendoza por compartir conmigo sus conocimientos y brindarme su colaboración durante el desarrollo de la segunda etapa de este trabajo.

A los Jurados Doctores Luis Alberto Lenis y Ricardo Benítez por sus sugerencias y el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

A los profesores del grupo de Investigación Química de Productos Naturales por brindarme sus consejos y apoyo cuando los necesité.

A todos los profesores del Departamento de Química por los valiosos conocimientos que aportaron para mi formación profesional.

A mis compañeros de estudio por todos los momentos compartidos.

A mi familia por su inmensa paciencia, apoyo y amor incondicional, en especial a mi abuelita Adelaida, mis tías Nelly, Amanda, Aleyda, Magnolia Castro y Olga Bolaños.

A Dani Solarte porque en la última etapa de mi carrera me dio ánimos para seguir adelante y se convirtió en un gran apoyo y consejero.

A todas y cada una de las personas que conocí durante la carrera y que me brindaron su cariño y amistad, sin entrar a especificar quién, ni darle mayor o menor importancia a nadie, todos aún sin saberlo de alguna manera, con una sonrisa o un gesto amable en el momento indicado me ayudaron a seguir adelante este sueño que hoy se hace realidad.

A todos mil y mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	pág
1. MARCO TEÓRICO -----	1
1.1 DESCRIPCIÓN Y HÁBITAT -----	1
1.2 PARTES DE LA PLANTA Y SU UTILIDAD -----	1
1.3 OBTENCIÓN DE HARINA Y ALMIDÓN DE YUCA -----	4
1.4 ALMIDÓN -----	5
1.4.1 Características físicas y químicas del almidón -----	5
1.4.2 Componentes del almidón -----	6
1.4.3 Métodos de análisis del almidón -----	10
1.5 FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA CON YODO -----	13
1.6 ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA – VISIBLE -----	14
1.6.1 Cuantificación de una mezcla por espectrofotometría -----	16
1.7 PARÁMETROS DE CONFIANZA PARA LA CUANTIFICACIÓN -----	19
1.7.1 Linealidad -----	19
1.7.2 Precisión -----	19
1.7.3 Sensibilidad -----	20
1.7.4 Exactitud -----	20
2. OBJETIVOS -----	21
2.1 OBJETIVO GENERAL -----	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	21
3. METODOLOGÍA -----	22
3.1 REACTIVOS Y EQUIPOS -----	22
3.1.1 Reactivos -----	22

3.1.2	Equipos -----	23
3.2	TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS -----	23
3.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y ORGANOLÉPTICA DE LAS HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA -----	24
3.4	CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA -----	24
3.4.1	Análisis proximal' -----	25
3.4.2	Determinación de pH -----	25
3.4.3	Propiedades físicas -----	25
3.5	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA ----	26
3.5.1	Selección de las longitudes de onda -----	26
3.5.2	Estandarización del método -----	28
3.5.2.1	Linealidad -----	28
3.5.2.2	Precisión -----	29
3.5.2.3	Sensibilidad -----	30
3.5.2.4	Exactitud -----	31
3.5.3	Determinación de la concentración amilosa y amilopectina en muestras ----	33
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	35
4.1	CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y ORGANOLÉPTICA DE LAS HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA -----	35
4.2	CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA -----	38
4.2.1	Análisis proximal de las harinas de yuca -----	39
4.2.2	Análisis proximal de los almidones de yuca -----	42
4.2.3	Determinación de pH en las harinas y almidones de yuca -----	44
4.2.4	Propiedades físicas de harinas y almidones de yuca -----	46
4.3	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA ----	48
4.3.1	Selección de las seis longitudes de onda de trabajo -----	49
4.3.2	Estandarización del método -----	52

4.3.2.1	Linealidad	52
4.3.2.2	Sensibilidad	56
4.3.2.3	Precisión	57
4.3.2.4	Exactitud	60
4.3.3	Determinación de la concentración de amilosa y amilopectina en muestras.	61
5.	CONCLUSIONES	64
	BIBLIOGRAFÍA	65
	ANEXOS	69

LISTA DE TABLAS

pág

Tabla 1.	Composición química de la harina de yuca (g/100 g de materia seca) ...	3
Tabla 2.	Variedades de harina y almidón de yuca en estudio.....	24
Tabla 3.	Metodología empleada en la determinación de la composición proximal de las muestras de estudio	25
Tabla 4.	Volumen de solución madre de cada analito empleada en la preparación de 25 mL de solución	29
Tabla 5.	Concentraciones de analito empleadas para determinar el porcentaje de recuperación	32
Tabla 6.	Características organolépticas de las harinas de yuca	36
Tabla 7.	Características organolépticas de los almidones de yuca.....	38
Tabla 8.	Composición proximal de las harinas de yuca (g/100 g de muestra)	40
Tabla 9.	Composición proximal de los almidones de yuca (g/100 g de muestra)	43
Tabla 10.	pH de las harinas y almidones de yuca.....	45
Tabla 11.	Propiedades físicas de los almidones de yuca	47
Tabla 12.	Propiedades físicas de las harinas de yuca	48
Tabla 13.	Longitudes de onda seleccionadas a partir de soluciones patrón de amilosa y amilopectina para su cuantificación en almidones y harinas de yuca	50
Tabla 14.	Longitudes de onda seleccionadas para cuantificación de Am Ap en almidones de papa y maíz	51
Tabla 15.	Parámetros de calibración empleados para determinar la linealidad del método a partir de las curvas de amilosa, amilopectina y amilosa + amilopectina a cada longitud de onda.....	54

Tabla 16. Valores de t calculado para cada una de las curvas a cada longitud de onda	55
Tabla 17. Coeficientes de absorción de los complejos de I ₆ -amilosa y I ₆ -amilopectina calculados a partir de las absorbancias de las curvas de calibración a cada longitud de onda.....	56
Tabla 18. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación del método (LC)	56
Tabla 19. Repetibilidad del método.....	57
Tabla 20. Concentración de soluciones de amilosa medidas durante cinco días para calcular la precisión intermedia.....	58
Tabla 21. Concentración de soluciones de amilopectina medidas durante cinco días para calcular la precisión intermedia	58
Tabla 22. Concentración de soluciones de amilosa + amilopectina medidas durante cinco días para calcular la precisión intermedia.....	58
Tabla 23. Concentración de soluciones de amilosa medidas durante cinco días para calcular la reproducibilidad del método.....	59
Tabla 24. Concentración de soluciones de amilopectina medidas durante cinco días para calcular la reproducibilidad del método	59
Tabla 25. Concentración de soluciones de amilosa+amilopectina medidas durante cinco días para calcular la reproducibilidad del método.....	59
Tabla 26. Porcentaje de recuperación promedio tomando como referencia una de las harinas y uno de los almidones analizados	61
Tabla 27. Contenido de amilosa y amilopectina en los almidones de yuca (g/100 g de muestra seca)	62
Tabla 28. Contenido de amilosa y amilopectina en las harinas de yuca (g/100 g de muestra seca)	62

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Raíz, planta y corte transversal de una raíz de yuca	2
Figura 2. Estructura de la amilosa.....	7
Figura 3. Estructura de la amilopectina.....	8
Figura 4. Vista frontal y superior de la inclusión de la molécula de I ₆ en la hélice de amilosa y amilopectina.....	14
Figura 5. Superposición de espectros Uv-Vis de dos compuestos que presentan absorbancia máxima en una misma región.....	16
Figura 6. Superposición de espectros Uv-Vis de dos compuestos que presentan máxima absorbancia en regiones diferentes.....	18
Figura 7. Superposición de espectros de los complejos de I ₆ -amilosa y I ₆ -amilopectina.....	49
Figura 8. Espectros de las soluciones patrón de los complejos de I ₆ -amilosa y I ₆ -amilopectina empleadas para seleccionar las longitudes de onda	51
Figura 9. Representación gráfica de las curvas de calibración de a) I ₆ - amilosa, b) I ₆ - amilopectina y c) su mezcla, medidas a las seis longitudes de onda	53

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Absorbancia
A_m	Absorbancia de la mezcla
Am	Amilosa
AOAC	Asociación de Comunidades Analíticas
Ap	Amilopectina
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
Conc, [], C	Concentración
CV	Coefficiente de Variación
CHOS	Carbohidratos
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DESV. EST	Desviación Estandar
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación
g	Gramos
h	Hora
IAA	Índice de absorción de agua
ISA	Índice de solubilidad en agua
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
M	Molar
m	Muestra
Máx	Máxima-o
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanometro
PH	Poder de hinchamiento
PLA	Ácido poliláctico
ppm	Partes por millón
sol	Solución
Vol	Volúmen
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

RESUMEN

El almidón es un producto que se emplea ampliamente en los diferentes tipos de industria, su utilidad se debe a las propiedades que le confieren sus componentes principales que son amilosa y amilopectina, los cuales están conformados por cadenas de glucosa. El contenido de estos dos componentes varía dependiendo de la fuente de la cual provenga el almidón y esto influye en sus propiedades.

Debido a que en la industria el almidón se somete a algunas modificaciones necesarias, es importante conocer el contenido de amilosa y amilopectina para poder precisar el tratamiento que se debe realizar. Uno de los usos más importantes de la actualidad es su papel como componente principal en la fabricación de materiales plásticos biodegradables.

En la Universidad del Cauca, con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural se lleva a cabo un proyecto de investigación que busca obtener películas y materiales termoformados biodegradables a partir de harina y almidón nativo de yuca para ello es necesario conocer el contenido de estos dos componentes.

En la bibliografía se encuentran varios métodos que sirven para analizar almidón y/o sus componentes, algunos permiten cuantificar uno de los dos y existe uno con el cual es posible conocer de forma simultánea el contenido de amilosa y amilopectina, en poco tiempo con resultados confiables. Éste método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el yodo y los componentes del almidón, cuya absorbancia se lee a seis longitudes de onda previamente establecidas. Debido a su eficiencia, éste método se escogió para ser estandarizado y aplicado para cuantificar amilosa y amilopectina en harina y almidón nativos de siete variedades de yuca del Departamento del Cauca.

1. MARCO TEÓRICO

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituyen las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo, contribuye significativamente a la nutrición y sustento de más de quinientos millones de procesadores y comerciantes a nivel mundial. Es el cuarto producto básico más importante después del arroz, trigo y maíz, y es un componente básico en la dieta de más de 1000 millones de personas. Además es usada como fuente de carbohidratos en nutrición animal.¹

1.1 DESCRIPCIÓN Y HÁBITAT ²

Conocida también como mandioca, cassava, manioc, manioca, mhogo, omowgo, suahili o tapioca en distintos lugares del mundo, la yuca es originaria de América del Sur, domesticada hace unos 500 años y cultivada extensamente desde entonces en zonas tropicales y subtropicales del continente.

Es un arbusto perenne que alcanza alturas entre 1 – 4 m, pertenece a la familia *Euphorbiaceae* constituida por unas 7200 especies, el género *Manihot* reporta cerca de cien especies, de las cuales solo la *Manihot esculenta Crantz* se cultiva comercialmente. Es un importante cultivo en regiones que van desde el nivel del mar hasta los 1800 m.s.n.m., requiere altos niveles de humedad y de sol para crecer, es resistente a la sequía, suelos ácidos, plagas y enfermedades.

1.2 PARTES DE LA PLANTA Y SU UTILIDAD³

Cada una de las partes de la planta es importante y presenta utilidad tanto para la planta misma como para el ser humano y los animales.

- **El tallo:** Es un órgano de vital importancia ya que es el medio de reproducción asexual de la planta y el más utilizado para su producción comercial,

¹ OSPINA, Bernardo y CEBALLOS, Hernán. La yuca en el tercer milenio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Mayo 2002. Cap 1. p. 1-5.[En línea]: <http://www.clayuca.org/contenido.htm> [Citado en Noviembre de 2008]

²Ibid., Cap 2. p.16 -17.

³Ibid., p.17 – 28.

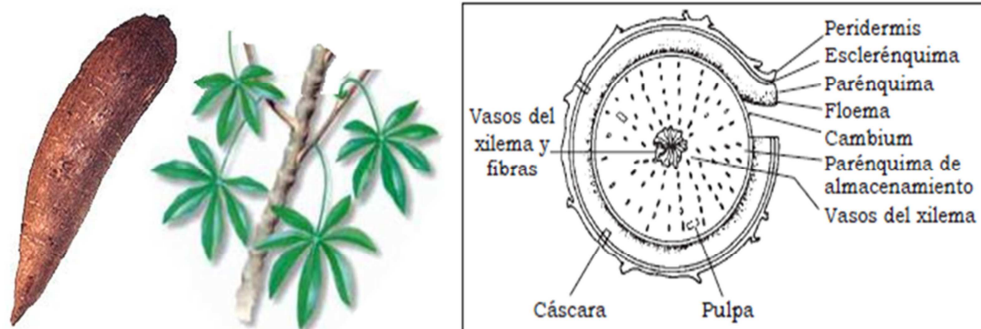
debido a que de esta forma la planta se demora menos tiempo en crecer, que por medio de la reproducción sexual. Además, también se utiliza en la fabricación de madera prensada para construcción y como parte de formulaciones alimenticias para animales.

- **Las hojas:** En general son palmeadas y los lóbulos presentan diferente forma y longitud según la variedad del cultivo, al igual que en la mayoría de las plantas, en la yuca las hojas son las encargadas de captar la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Por su contenido proteico, vitamínico y mineral, las hojas se emplean como vegetal en ensaladas para la alimentación humana y en preparaciones medicinales, ya que le han sido atribuidas propiedades curativas, también es procesada con el fin de obtener una harina que se aprovecha en alimentación animal.

- **Las flores, frutos y semillas:** Por ser una especie monoica, la yuca posee en la misma planta flores masculinas y femeninas, cuya independencia no genera dificultad en su reproducción, ya que la planta posee reproducción vegetativa. Sin embargo, una vez la flor femenina ha sido polinizada, se inicia la formación del fruto que contiene en su interior las semillas, que se utilizan principalmente en investigación genética con el objetivo de mejorar la especie.

- **La raíz:** Es el órgano más aprovechado y de mayor valor comercial que presenta la planta. En él se almacena casi la totalidad del almidón que se genera, aunque no todas las raíces producidas se convierten en órganos de almacenamiento. Según la variedad de la planta, las raíces presentan diferentes tamaños y formas, pueden ser cilíndricas, fusiformes o cónicas. Está compuesta por cáscara, pulpa y fibras centrales (figura 1).

Figura 1. Raíz, planta y corte transversal de una raíz de yuca



Fuente: OSPINA, 2002. Cap. 2. p. 26.

La cáscara está compuesta por la peridermis, que es la capa externa que se caracteriza por las fisuras que se van presentando a medida que la raíz comienza a engrosar. Su color varía entre blanco, crema a marrón oscuro y la corteza cuyo color varía entre blanco, crema a rosado, presenta tejidos que contienen un alto contenido de glucósido cianogénico a partir de los cuales se produce ácido cianhídrico, que además de ser tóxico le confiere sabor amargo a la yuca.

La pulpa es la parte utilizable de la raíz. Es una masa sólida cuyas células contienen una cantidad abundante de almidón en forma de gránulos de diferente tamaño. También está conformada en gran parte por parénquima que contiene a su vez amiloplastos, dentro de los cuales se va almacenando almidón en forma de gránulos más o menos esféricos, se encuentra separada de la corteza por el cambium.

La pulpa corresponde aproximadamente al 80% del peso fresco de la raíz. La materia seca del parénquima está constituida entre 90% – 95% por almidón y azúcares, aproximadamente 2% de proteína, 0.5% – 1% de grasa, 1.5% de cenizas y 1% – 2% de fibra. En la tabla 1 se presenta la composición de la raíz cuando ha sido procesada para la obtención de harina.

Tabla 1. Composición química de la harina de yuca (g/100 g de materia seca)

COMPONENTE	Raíz con cáscara	Raíz sin cáscara
Materia seca	100.00	100.00
Ceniza	2.45	2.00
Proteína cruda	3.05	1.56
Extracto etéreo	1.04	0.88
Fibra detergente neutra	6.01	3.40
Fibra detergente ácida	4.85	1.95
Carbohidratos disponibles	83.80	92.40
Hemicelulosa	1.16	1.45

Fuente: OSPINA, 2002. p.28.

Las fibras centrales están conformadas por filas de vasos duros de xilema y esclerénquima, cuya dureza, longitud y grosor pueden afectar la calidad de la raíz, sobre todo cuando se usan directamente para consumo humano.

Las raíces de la yuca son una fuente importante de carbohidratos para el ser humano y animales. En Colombia al igual que en otros países la raíz de yuca, preferiblemente dulce, se emplea de varias formas en la preparación de innumerables recetas.

1.3 OBTENCIÓN DE HARINA Y ALMIDÓN DE YUCA ⁴

La obtención de estos productos puede realizarse en plantas procesadoras artesanales y/o industriales.

- **Harina de Yuca:** Inicialmente se realiza una selección de las raíces, luego se lavan y se pelan en forma manual o mecánica, existen máquinas que lavan y pelan las raíces al mismo tiempo pero su uso no se justifica si la cantidad de raíces a procesar es pequeña, si la harina se va a destinar para alimentación animal se puede eliminar la etapa de descascarado. Cuando las raíces están limpias, se parten en trozos más pequeños que son secados al ambiente, en hornos o estufas, con el fin de eliminar humedad y el glucósido cianogénico que genera toxicidad. Una vez seca se muele usando molinos-tamices de diferentes tamaños (3 mm, 177 y 100 μm), finalmente la harina producida es clasificada por medio de ciclones obteniéndose harinas de diferentes tamaños de partícula.
- **Almidón de yuca:** La obtención de almidón presenta las mismas etapas iniciales de la harina, de lavado y pelado de las raíces, seguidas por una etapa de rallado, (determinante del rendimiento) que generalmente se realiza en seco, luego se procede a tamizar en presencia de agua para eliminar el afrecho, posteriormente se deja sedimentar el almidón y finalmente se seca.

Para la obtención de almidón agrio o fermentado, lo cual ocurre por acción de bacterias lácticas amilolíticas, el material sedimentado se deposita en tanques de fermentación donde se cubre con una capa delgada de agua y se mantiene por un espacio de 20 – 30 días. Pasado este tiempo el almidón se seca y una vez seco el almidón, tanto nativo como agrio, se muele y se cierne para ser empacado.

⁴OSPINA, Op. Cit., Cap 26. p.475-486.

1.4 ALMIDÓN⁵

Es un polisacárido de reserva que se encuentra distribuido en los diferentes órganos de las plantas según el tipo, en cereales y leguminosas se almacena en el grano, en la papa y la yuca se almacena en el tubérculo, en el caso del sagú en el tallo o en las frutas no maduras como el banano verde.

Se obtiene industrialmente de tubérculos como la papa y la yuca, o de cereales como maíz, trigo y arroz. Los procesos de obtención son similares, las etapas básicas son: la limpieza de la materia prima (en cereales se elimina el germen), molienda, tamizado para la separación de los diferentes componentes y finalmente se obtiene una suspensión de almidón.

Las principales propiedades fisicoquímicas de un almidón son el contenido relativo de amilosa, solubilidad, peso molecular, tamaño y forma del grano, composición proximal, naturaleza cristalina y capacidad de hinchamiento.⁶

1.4.1 Características físicas y químicas del almidón⁷

Las características o propiedades físicas y/o químicas del almidón son las que finalmente definen su utilidad. Además de la relación en que se encuentran sus componentes amilosa y amilopectina, que es la más determinante, existen otras que ayudan a predecir para que tipo de actividades es apto un almidón.

Entre estas propiedades se encuentran la composición proximal de nutrientes, de los cuales se destacan el contenido de proteínas y grasa. El almidón de yuca contiene cantidades más bajas de estos dos en comparación con almidones provenientes de otras fuentes como los cereales, lo cual es una ventaja, ya que la proteína altera las propiedades organolépticas del almidón y la grasa con el tiempo, puede generar rancidez, además de acomplejar sus componentes restringiendo su disponibilidad.

Otras propiedades importantes son la solubilidad en agua, poder de hinchamiento y absorción de agua que, como sus nombres lo indican, se basan en la capacidad

⁵ GUZMÁN, Rosa. y BERMUDEZ, Ana. Química de Alimentos. Bogotá: Universidad Estatal Abierta y a Distancia, 1989. p.51.

⁶ OSPINA, Op. Cit., Cap 2. p.29.

⁷Ibid.

que tienen los gránulos de almidón de absorber agua y solubilizarse. Este proceso se lleva a cabo en soluciones acuosas de almidón, en las cuales a medida que aumenta la temperatura, el agua se introduce en el gránulo provocando el hinchamiento. Luego, al alcanzar un punto denominado temperatura de transición vítrea, sus componentes se solubilizan parcialmente como consecuencia de un fenómeno conocido como *gelatinización*, que a su vez induce otras propiedades como la *viscosidad* y *elasticidad*, importantes en la obtención de películas, en esta etapa el gránulo se rompe y sus componentes se dispersan. A partir de este punto, la dispersión acuosa se enfría dando paso a la *gelificación*, en donde las moléculas se vuelven menos solubles y tienden a agregarse conduciendo a la *retrogradación*, en la que estas moléculas se cristalizan. Toda esta cadena de procesos son los que definen la calidad y utilidad de un almidón.

1.4.2 Componentes del almidón

Está constituido por gránulos que se sintetizan en los amiloplastos y presentan formas y tamaños diferentes según su procedencia. En su interior, cada gránulo contiene dos tipos de polímeros de glucosa que son la *amilosa* y la *amilopectina*. El 70% de un gránulo de almidón se considera amorfo y el 30% cristalino, la amilosa se encuentra en su mayoría en la fracción amorfa, mientras la amilopectina lo hace en la cristalina. El contenido de estos dos componentes influye en propiedades del almidón tales como temperatura de gelatinización, capacidad de hinchamiento, solubilidad y viscosidad.⁸

- **Amilosa:**⁹ Es un polisacárido lineal constituido por cadenas de restos de α -D-glucosa unidos entre las posiciones 1 y 4 (figura 2), el número de unidades depende de la fuente de donde provenga el almidón y varía entre 1000 – 2000 unidades.

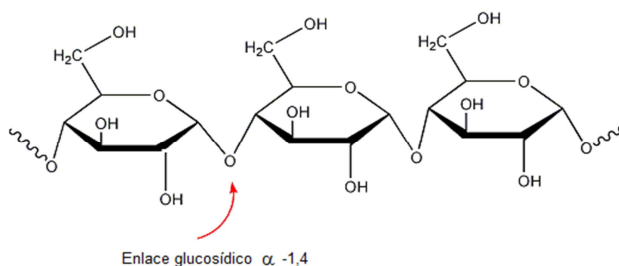
El contenido de amilosa en el almidón varía según el tipo de almidón, en la mayoría constituye entre el 20 y 25% de su peso total. Algunas variedades procedentes de maíz y arroz denominadas “céreas” o “córneas”, no contienen

⁸BELITZ, Hans-Dieter.; GROSH, Werner. Química de los Alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, 1997. p.338-344.

⁹COULTATE, T. Alimentos: Química de sus componentes. Editorial Acribia S.A., España, 1984. p.26.

amilosa, mientras que la yuca con valores entre 15 – 30%, es la especie que mayor contenido de este polímero ha presentado.

Figura 2. Estructura de la amilosa



Fuente: [En línea]: www.medicina.usac.edu.gt/quimica/biomol2/carbohidratos/amilosa.gif [Citado en Octubre de 2008]

Es útil para recubrimientos de frutas, ya que evita la adhesividad que normalmente poseen y por su capacidad de formación de geles, es la indicada para su uso en postres y salsas.

La abundancia de grupos hidroxilos que presenta la amilosa, hace que tenga afinidad por el agua, sin embargo, estos grupos se unen entre sí otorgándole a la molécula una conformación en forma de espiral, reduciendo así su afinidad por el agua, pero a la vez favorece la formación de películas fuertes. Este fenómeno de asociación intermolecular de la amilosa es comúnmente llamado *retrogradación*.

Esta conformación también favorece la formación de complejos insolubles con moléculas orgánicas, como alcoholes alifáticos, ácidos monoglicéridos o ácidos grasos lineales; también tiene afinidad por el yodo formando un complejo de color azul.¹⁰

Según los resultados obtenidos por Otey et al¹¹ la amilosa parece ser un parámetro importante en las propiedades mecánicas de películas no plastificadas

¹⁰ARISTIZÁBAL, Johanna; SÁNCHEZ Teresa. Características del almidón de yuca. En: Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. La Organización. Roma, 2007. p.33 -40.

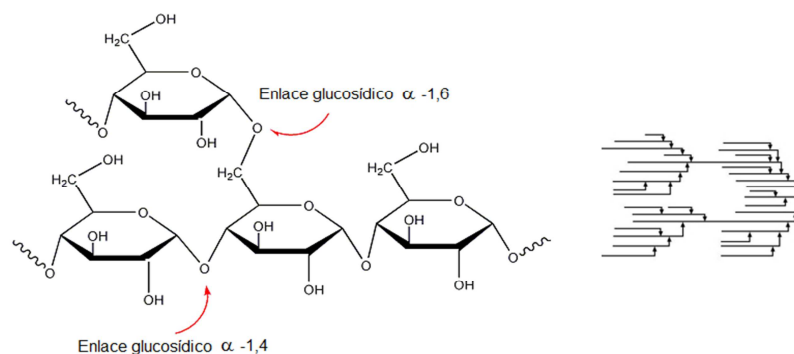
¹¹OTEY, F.H.; WESTHOFF, R.P. y DOANE, W.M. En: Eng.Chem., Prod. Res. Dev., 19. 1980. p. 592-595. Citado por: LOURDIN, Denis; DELLA VALLE Guy y COLONNA, Paul. Influence of amylose content on starch films and foams. En: Carbohydrate Polymers. No 27. 1997. p.261 – 270.

de almidón, ya que al aumentar su contenido aumentan propiedades de estos materiales como la elongación y la resistencia a la tracción, pero no sucede lo mismo en películas a las cuales se ha agregado un plastificante puesto que este enmascara la amilosa.

- **Amilopectina:**¹² Al igual que la amilosa está constituida por unidades de D-glucosa, pero además de enlaces α -D 1-4 presenta ramificaciones α -D 1-6 (figura 3), ya que éstas aparecen cada 20 o 30 glucosas, aproximadamente entre el 4 y 5% de los enlaces en una molécula de amilopectina son α -D 1-6.

Tanto las plantas como los animales contienen enzimas que degradan los almidones llamadas α y β -amilasas que atacan enlaces α 1-4 hidrolizando la amilosa hasta producir glucosa y maltosa. La α -1,6-glucosidasa específicamente hidroliza los enlaces α -1,6 presentes en la amilopectina que no logran hidrolizar las amilasas.¹³

Figura 3. Estructura de la amilopectina



Fuente: [En línea]: www.medicina.usac.edu.gt/quimica/biomol2/carbohidratos/amilopectina.gif
[Citado en Octubre de 2008]

Se usa extensamente como espesante, estabilizante y adhesivo. El tamaño de la molécula y sus ramificaciones impiden que pueda formar una cantidad significativa de enlaces de hidrógeno. Por esta razón las soluciones acuosas de amilopectina presentan mayor claridad y estabilidad que las de amilosa, no tienden a gelificarse

¹²COULTATE, T; Op Cit, p.27.

¹³ CAMPBELL, Mary y FARELL, Shawn. Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Ciencias e ingenierías. 2004. p.452.

durante el almacenamiento y no forman películas tan fuertes y flexibles como la amilosa. Su afinidad con el yodo es menor y la capacidad de formar complejos con otros compuestos es limitada, debido a que las cadenas en espiral que forma son mucho más cortas.

Puesto que el almidón está compuesto por amilosa y amilopectina al aumentar la cantidad de uno de ellos, disminuye el otro, por tanto, el contenido de amilopectina en los almidones usados en mezclas de polímeros sintéticos, produce efectos contrarios a los ya mencionados para la amilosa.

La yuca es la segunda fuente de almidón a nivel mundial después del maíz y su composición lo convierte en un importante cultivo industrial. Este almidón se usa generalmente sin modificar, pero para mejorar sus propiedades de consistencia, viscosidad, estabilidad a cambios del pH y temperatura, gelificación y dispersión entre otras, es sometido a diferentes tratamientos para modificarlo y ampliar sus aplicaciones.¹⁴

El almidón nativo o almidón dulce de yuca se emplea en el sector industrial en actividades como:^{15,16}

- Fabricación de papel
- Preparación de pegantes
- Engomado de telas de algodón (Industria textil)
- Perforación de pozos petroleros
- Industria de alimentos preparados
- Fabricación de dinamita

Una actividad en la que actualmente tiene gran demanda e importancia, es su uso como materia prima para la fabricación de materiales plásticos biodegradables. La incursión del almidón en matrices poliméricas comenzó en el año 1970, cuando lo introdujeron en la formulación de polímeros sintéticos en cantidades inferiores al 10%, manteniendo su estructura granular.¹⁷ Más tarde descubrieron que al

¹⁴ARISTIZÁBAL, Johanna. Op Cit., p.33.

¹⁵ALARCÓN, Freddy. y DUFOUR, Dominique. Almidón agrario de yuca en Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, Diciembre 1998. t 1.4 p.42-4.

¹⁶MONTALDO, Álvaro. La yuca o mandioca. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica, 1985. p.284.

¹⁷GRIFFIN, G.J.L..Patente No. 4.021.388. Estados Unidos. 1977. Citado por: LOURDIN, Denis; DELLA VALLE Guy; COLONNA, Paul. Influence of amylose content on starch films and foams. En: Carbohydrate Polymers. No 27. 1997. p.261 – 270.

aumentar la fracción de almidón en la mezcla, disminuían las propiedades mecánicas del material resultante tales como elongación y resistencia a la tracción. A partir de entonces, iniciaron estudios con el fin de examinar las propiedades mecánicas del almidón, encontrando que dependen de su composición en amilosa y amilopectina, en la cual influye a su vez su origen botánico. A pesar de esto se encontró que las mezclas que se habían obtenido, eran bastante útiles y recomendadas para empaques farmacéuticos, empaques herméticos, cubiertos, entre otros.¹⁸

Actualmente en algunos países se ha tomado como medida para la disminución de la contaminación, la prohibición del empleo de bolsas plásticas o el aumento en sus costos para reducir su consumo. Pero prescindir completamente de este tipo de material es algo difícil ya que se ha convertido en un material indispensable en las diferentes industrias principalmente las de alimentos, por esto en la mayoría de los países están empleando como alternativa la producción de plásticos biodegradables a partir de almidón obtenido de diferentes fuentes como papa, yuca, maíz principalmente y otros cereales y legumbres cuyo cultivo es significativo en las diferentes regiones.

Aunque no se ha logrado el reemplazo total, el material obtenido se está utilizando para fabricar productos que sustituyan otros como empaques, envases, bolsas, platos, vasos, cubiertos, etc.¹⁹ y su demanda principalmente en países desarrollados como Estados Unidos y países de Europa va en aumento.

1.4.3 Métodos de análisis del almidón

Las diferentes aplicaciones que tiene el almidón han requerido que se lleven a cabo estudios que permitan conocer y aprovechar sus propiedades en forma más específica y analítica, para lo cual se han desarrollado y aplicado diferentes métodos de análisis, entre los que se pueden mencionar:

- **Método polarimétrico.**²⁰ Es empleado para determinar la rotación óptica del almidón en solución mediante el empleo de un polarímetro, cuando el almidón

¹⁸OTEY, Op Cit.

¹⁹ VILLADA, Hector; ACOSTA, Harold y VELASCO, Reynaldo. Biopolímeros Naturales Usados en Empaques Biodegradables. En: Temas Agrarios. Vol12.No. 2. 2007. p.5 – 13.

²⁰JACKSON, D. Starch: Structure, properties and determination. En: Elsevier Science. 2003. p.5561-5567.

proviene de muestras con un alto contenido de éste, como tubérculos y cereales. La muestra se trata con etanol para remover materiales solubles ópticamente activos, se suspende en CaCl_2 se lleva a un baño maría, se remueven las proteínas con cloruro de estaño y ácido fosfotúngstico y la solución filtrada resultante se lleva al polarímetro. Con este método se puede determinar la cantidad de almidón en soluciones con altas concentraciones de él pero no la de cada uno de sus componentes.

- **Método termogravimétrico.**²¹ Ha sido ampliamente empleado para determinar la temperatura de fusión cristalina de varios almidones. Las muestras de almidón se calientan a una velocidad constante y se registra el flujo de calor endotérmico. Es usada notablemente para el estudio de procesos de retrodegradación y para la interacción del almidón con agentes complejantes. Este método es útil para determinar una propiedad física importante del almidón, pero no para cuantificación.

- **Método del Infrarrojo cercano.**²² Se emplea para obtener información tanto física como química de una muestra dada tales como composición, tamaño de partícula, contenido de una mezcla. Se usa para muestras en estado sólido o líquido y la medición se hace directamente en la muestra. En almidones se emplea para determinar la proporción amilosa/amilopectina, para lo cual requiere de otro método de referencia, pero con este no se puede medir la cantidad de cada uno de ellos.

- **Técnica de cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución.**^{23,24} Se usa para la identificación precisa de la fracción de masa molecular entre la amilosa y amilopectina que componen el almidón. La muestra se dispersa en agua, dimetilsulfóxido o hidróxido de sodio, luego se inyecta en el sistema cromatográfico, empleando filtración en gel o una fase estacionaria sólida. Los pesos moleculares de estos materiales se pueden determinar acoplado el sistema a un detector láser de dispersión de luz o mediante el empleo de estándares de peso molecular conocido de los polímeros de carbohidrato puro. Con este método se logran aislar los componentes del almidón pero para su

²¹Ibid.

²²FERTIG, Christiane. Feasibility study for the rapid determination of the amylose content in starch by near-infrared spectroscopy. En: European Journal of Pharmaceutical Sciences. No. 21, 2004.p.155-159.

²³STAWSKI, D. New determination method of amylose content in potato starch. En: Food Chemistry. No. 110, 2008.p.777-781.

²⁴ JACKSON, D. Op. Cit.

cuantificación se requiere de otro método lo cual implica tiempo y costos adicionales.

- **Método enzimático.**²⁵ En este método el almidón se gelatiniza por calentamiento o químicamente, se somete a digestión con enzimas de glucosa como la α -amilasa y amiloglucosidasa, finalmente la solución se trata con reactivos que pueden ser medidos colorimétrica o espectrofotométricamente. Es aplicable a una amplia gama de productos que contienen almidón. Con este método se puede conocer el contenido total de almidón, pero para sus componentes es necesario usar otras enzimas o compuestos más específicos como la concanavalina A. Ésta es una lectina usada como agente para precipitar la amilopectina dejando libre la amilosa, después de separarla se cuantifica. Debido a que este proceso se debe repetir para cada componente, éste método resulta muy costoso además de dispendioso.

- **Método de complejo con yodo.**²⁶ En éste método la muestra se solubiliza en agua en ebullición, hidróxido de sodio o potasio o en dimetilsulfóxido según su resistencia a este proceso, después la solución se neutraliza si es necesario y se trata con buffer de fosfato a pH neutro, se agrega solución de yodo y se determina la absorbancia en un espectrofotómetro. Ésta se puede determinar a una sola longitud de onda (diferente para la amilosa y la amilopectina) o a múltiples longitudes de onda, con esta última se determina en forma simultánea el contenido de amilosa y amilopectina y los resultados son mucho más confiables que cuando se emplea una sola longitud.

Al respecto, Séne, et al²⁷ desarrollaron un método espectrofotométrico rápido para la determinación simultánea de amilosa, amilopectina y almidón total en almidón de maíz, que consiste en solubilizar el almidón y una vez solubilizado formar un complejo con yodo que luego es leído en un espectrofotómetro a seis longitudes de onda diferentes, la concentración de amilosa y amilopectina se obtiene combinando seis ecuaciones que resultan para cada componente en una sola por medio de un programa matemático. Estos autores se basaron en el método de Jarvis y Walker²⁸ que presenta el mismo principio para determinar los mismos

²⁵ Ibid

²⁶ JARVIS, C.; WALKER, J.. Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. *Journal of Cereal Science and Food Agriculture*, No 63. 1993. p.89–92.

²⁷ SÉNE, M.; THÉVANOT, C. y PRIOUL, L.. Simultaneous spectrophotometric determination of amylose amylopectin in starch from maize Kernel by multiwavelength analysis. *Journal of Cereal Science*, No 26. 1997. p.211–221.

²⁸ JARVIS, C. Op. Cit.

componentes en almidón de papa, pero debido a las diferencias en las características del almidón de papa y de maíz las longitudes de onda no son las mismas.

Métodos como la cromatografía de exclusión de tamaño, que no se adapta a un número grande de muestras, infrarrojo cercano, barrido diferencial calorimétrico son rápidos pero requieren otro método de referencia para su calibración.²⁹

En otros como los enzimáticos y el de la concanavalina A, la muestra es sometida a tratamientos cuyo fin es la formación de compuestos que permiten la determinación espectrofotométrica de los componentes. Esto convierte al método del complejo con yodo en la opción más conveniente en cuanto a costos, ya que reduce la cantidad de reactivos usados, omite el uso de enzimas que además de costosas requieren un especial manejo y reduce el tiempo de trabajo, además de ser rápido y seguro. Por tanto, éste último fue el método empleado en el desarrollo de este trabajo, puesto que es eficaz, confiable, minimiza costos, tiempo y además se cuenta con el equipo adecuado para su desarrollo.

1.5 FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA CON YODO^{30,31}

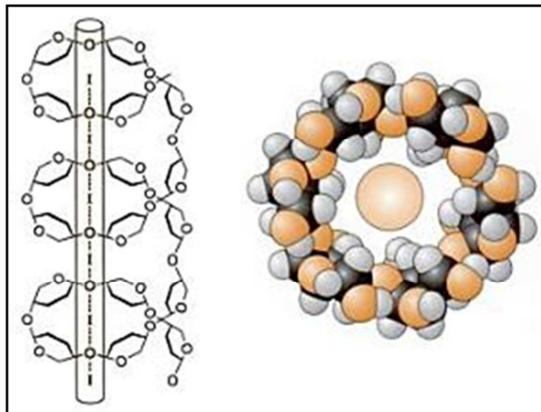
La amilosa y la amilopectina presentan en su estructura una conformación helicoidal, en cuyo centro se origina un espacio en el cual se pueden acomodar diferentes moléculas y formar complejos. Entre estas moléculas se encuentra el yodo, que forma cadenas de I₆ que logran situarse dentro de las hélices como se observa en la figura 4.

²⁹ JACKSON, D. Op. Cit.

³⁰ HARRIS, Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona, 2007. p. 356.

³¹ Biblioteca Digital de La Universidad de Chile. Sistemas de servicios de Información y Bibliotecas SISIB. [En línea]: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-6/c16a.html [Citado en Junio 11 de 2010]

Figura 4. Vista frontal y superior de la inclusión de la molécula de I₆ en la hélice de amilosa y amilopectina



Fuente: HARRIS, 2007. Cap 16. p.356.

De los dos compuestos, la amilosa presenta mayor afinidad con el yodo debido a las largas cadenas en forma de espiral que la conforman y que le permiten albergar mayor cantidad de moléculas de yodo, mientras que la amilopectina por presentar gran número de ramificaciones, forma cadenas mucho más cortas en las cuales se ubica menor cantidad de moléculas de yodo. El complejo que se forma varía de color azul a púrpura o rosado según la concentración y proporción en que se encuentren los componentes, en presencia solo de amilosa es azul oscuro mientras que con la amilopectina es de color violeta claro.

1.6 ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA – VISIBLE³²

Es la técnica más común usada para la cuantificación de compuestos químicos y se basa en su capacidad de absorción de luz. Todas las sustancias absorben algún tipo de radiación del espectro electromagnético que causa diferentes efectos sobre sus moléculas.

Cuando una molécula que inicialmente se encuentra en su estado basal o fundamental absorbe energía, pasa a un estado de mayor energía que se denomina estado excitado. La molécula o grupo funcional responsable de la absorción de luz se denomina cromóforo. Cuando esto ocurre la irradiancia (P_0)

³²HARRIS, Daniel. Op Cit. p.409 – 421.

del haz de luz (cantidad de energía por segundo por unidad de área del haz) disminuye (P) haciendo posible la cuantificación o identificación de un compuesto.

La luz absorbida por la muestra es medida por equipos en los cuales un haz de luz generado por una fuente, pasa a través de un filtro que selecciona las diferentes longitudes de onda que van a incidir sobre la muestra, luego un detector cuantifica la luz que logró atravesarla y la transforma en una señal fácil de manipular. Inicialmente los equipos reportaban la cantidad de luz no absorbida en términos de la transmitancia (T), dada por la ecuación 1, pero para mayor comodidad en el manejo de cálculos, se puede transformar fácilmente en absorbancia (A) mediante un cálculo sencillo (ecuación 2).

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$A = \text{Log}_{10} \frac{P}{P_0} = -\text{Log T} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Actualmente la mayoría de los equipos modernos vienen diseñados para reportar los datos en absorbancia.

La cantidad de luz absorbida por la sustancia es directamente proporcional a su concentración, esta relación se evidencia en la Ley de Lambert-Beer que es la base de la espectrofotometría y se representa por medio de la ecuación 3.

$$A = \epsilon C b \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde,

A = Absorbancia

ϵ = Absortividad molar

C = concentración de analito

b = Longitud del camino óptico (1cm)

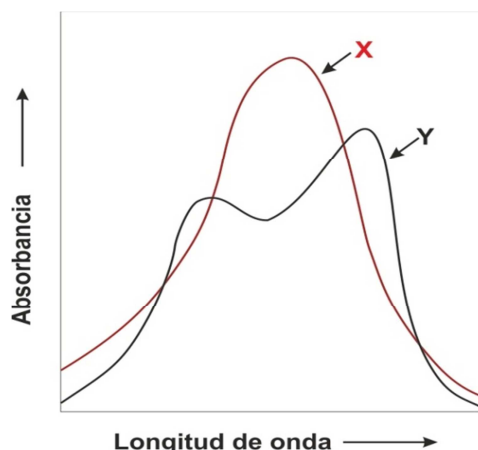
Esta ecuación, aunque es la más usada para las cuantificaciones espectrofotométricas, no siempre se cumple y se debe tener especial cuidado sobre todo cuando se trata de muestras con concentraciones muy altas de analito.

1.6.1 Cuantificación de una mezcla por espectrofotometría³³

Cuando se analizan muestras por espectrofotometría en las cuales están presentes más de un componente pueden presentarse dos posibilidades, la primera es que los compuestos absorban en una región muy estrecha y sus puntos de máxima absorbancia no se diferencien y la segunda que sus espectros se superpongan pero que se pueda ver claramente los puntos máximos de cada componente.

Para el primer caso (figura 5) la forma recomendada para llevar a cabo la cuantificación es preparar soluciones estándar de los componentes y leer su absorbancia por separado a diferentes longitudes de onda que se encuentren dentro del rango de absorbancia de los dos componentes y la mezcla.

Figura 5. Superposición de espectros Uv-Vis de dos compuestos que presentan absorbancia máxima en una misma región



Fuente: HARRIS, 2007. Cap 19. p.434.

Teniendo en cuenta la ecuación 3 de la ley de Lambert-Beer la absorbancia de una mezcla se puede ver según la ecuación 4 como la suma de las absorbancias de cada componente,

³³Ibid. p.434 – 436.

$$A_m = \epsilon_1 C_1 b + \epsilon_2 C_2 b + \epsilon_3 C_3 b + \dots \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde,

A_m = Absorbancia de la mezcla

$\epsilon_{1,2,3}$ = Absortividad molar de los compuestos 1,2 y 3 respectivamente

$C_{1,2,3}$ = concentración de los compuestos 1,2 y 3 respectivamente

b = Longitud del camino óptico (1cm)

Si se tiene dos componentes 1 y 2, al medir la absorbancia de las soluciones estándar (1s y 2s) por separado se tendría,

$$A_{1s} = \epsilon_1 C_{1s} b \quad A_{2s} = \epsilon_2 C_{2s} b \quad \text{Ecuaciones 5 y 6}$$

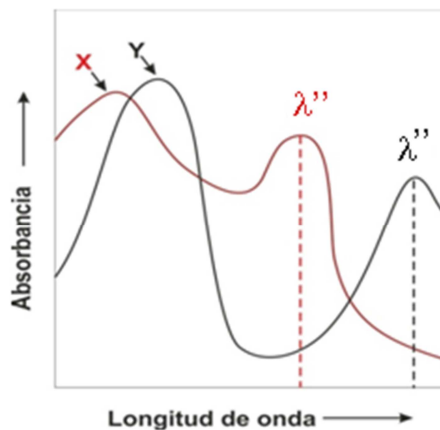
Despejando las absortibilidades molares y reemplazando en la ecuación para la mezcla se obtiene,

$$\frac{A_m}{A_{1s}} = \frac{A_{2s}}{A_{1s}} \left(\frac{C_2}{C_{2s}} \right) + \frac{C_1}{C_{1s}} \quad \text{Ecuación 7}$$

La cual tiene la forma de la ecuación de la recta $y=mx + b$, al graficar A_m/A_{1s} Vs A_{2s}/A_{1s} tomando la absorbancia a cinco o seis longitudes de onda diferentes se puede obtener la pendiente C_2/C_{2s} y el intercepto C_1/C_{1s} y como C_{1s} y C_{2s} se conocen se encuentra fácilmente las concentraciones desconocidas C_1 y C_2 .

En el segundo caso (figura 6) se emplean de igual manera estándares de los compuestos x e y para determinar las longitudes de onda de máxima absorbancia de cada uno y sus absortibilidades molares a cada longitud de onda.

Figura 6. Superposición de espectros Uv-Vis de dos compuestos que presentan máxima absorbancia en regiones diferentes



Fuente: HARRIS, 2007. Cap 19. p.434.

De esta manera se obtienen dos longitudes 1 y 2 a las cuales se va a leer la absorbancia de la mezcla A^1 y A^2 que estaría dada por,

$$A^1 = \epsilon^1_x C_x b + \epsilon^1_y C_y b \quad \text{Ecuación 8}$$

$$A^2 = \epsilon^2_x C_x b + \epsilon^2_y C_y b \quad \text{Ecuación 9}$$

Luego mediante matrices se puede encontrar la concentración de cada compuesto C_x y C_y en la mezcla de la siguiente manera,

$$C_x = \begin{vmatrix} A^1 & \epsilon^1_{yb} \\ A^2 & \epsilon^2_{yb} \\ \epsilon^1_{xb} & \epsilon^1_{yb} \\ \epsilon^2_{xb} & \epsilon^2_{yb} \end{vmatrix}$$

Ecuación 10

$$C_y = \begin{vmatrix} \epsilon^1_{xb} & A^1 \\ \epsilon^2_{xb} & A^2 \\ \epsilon^1_{xb} & \epsilon^1_{yb} \\ \epsilon^2_{xb} & \epsilon^2_{yb} \end{vmatrix}$$

Ecuación 11

Resolviendo los determinantes finalmente se puede calcular la concentración de cada compuesto en la mezcla.

$$C_x = \frac{(A1\varepsilon^2yb)-(A2\varepsilon^1yb)}{(\varepsilon^1xb\varepsilon^2yb)-(\varepsilon^2xb\varepsilon^1yb)} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$C_y = \frac{(A^2\varepsilon^1xb)- (A^1\varepsilon^2xb)}{(\varepsilon^1xb\varepsilon^2yb)-(\varepsilon^2xb\varepsilon^1yb)} \quad \text{Ecuación 13}$$

1.7 PARÁMETROS DE CONFIANZA PARA LA CUANTIFICACIÓN

La implementación o uso de un método analítico de cuantificación requiere que sea estandarizado, mediante un proceso con el cual logran evaluarse ciertos parámetros que garantizan el grado de confianza de los resultados que arroja el método en las condiciones bajo las cuales se ha desarrollado. Estos parámetros varían según la rigurosidad del método y los más usuales son descritos a continuación.

1.7.1 Linealidad³⁴

Es una medida que indica el rango de concentraciones en las cuales existe una proporción lineal entre la cantidad de analito y la respuesta generada por el equipo, también señala las concentraciones de analito que pueden ser detectadas por el método.

1.7.2 Precisión³⁵

Se define como el “grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas”. Se estima mediante tres factores que son repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, expresándose en términos de desviación estándar o coeficiente de variación.

- **Repetibilidad:** Es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas por un solo operador con el mismo método, sobre una misma muestra, en las mismas

³⁴ INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES. Protocolo Estandarización de Métodos Analíticos Bogotá, 1999. p.4-5.

³⁵Ibid

condiciones de operación (laboratorio, material, equipos) y en un intervalo corto de tiempo.

- **Precisión intermedia:** Es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas con el mismo método sobre la misma muestra, cambiando una o varias de las condiciones de operación, operador o equipo dentro del mismo laboratorio.
- **Reproducibilidad:** Es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas con el mismo método sobre la misma muestra, en un laboratorio diferente en intervalos largos de tiempo y se analiza la variación entre los resultados obtenidos durante todos los días.

1.7.3 Sensibilidad³⁶

Es la medida de la capacidad que tiene el equipo de distinguir variaciones pequeñas de concentración de analito. La sensibilidad de calibración se define como la pendiente de la curva de calibración. La sensibilidad analítica se establece en términos del límite de detección y el límite de cuantificación y se expresa en unidades de concentración.

- **Límite de Detección:** Es la concentración de analito más pequeña cuya señal es significativamente diferente a la del blanco o señal de ruido y que puede ser detectada por el equipo y no necesariamente cuantificada.
- **Límite de Cuantificación:** Es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada en una muestra por medio del método que proporcione resultados con una precisión y exactitud adecuada.

1.7.4 Exactitud³⁷

Es la aproximación que existe entre un dato obtenido experimentalmente mediante la aplicación del método y el valor real o aceptado para un patrón preparado cuya concentración se encuentra dentro del intervalo de cuantificación en el que se puede aplicar el método. Generalmente se expresa en términos de porcentaje de error o porcentaje de recuperación.

³⁶Ibid

³⁷ISO 3534-1 Statistics - Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. ISO, Ginebra, 1993. Citado por: MAROTO, Alicia; BOQUÉ, Ricard; RIU, Jordi; RIUS, Xavier. Incertidumbre y Precisión. UniversitatTovira I Virgili. España.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer la composición en amilosa y amilopectina de siete harinas y almidones nativos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un método espectrofotométrico rápido, para la determinación y cuantificación simultánea del contenido de amilosa y amilopectina en harinas y almidones de yuca.
- Determinar la composición en amilosa y amilopectina en harinas y almidones de yuca por medio de la aplicación del método desarrollado.
- Establecer los componentes mayoritarios de las harinas y los almidones estudiados mediante un análisis proximal y algunas características físicas de interés.
- Socializar la norma técnica del método de análisis estandarizado.

3. METODOLOGÍA

A continuación se describe la metodología e implementos utilizados para llevar a cabo la caracterización física y química de las harinas y almidones objeto de estudio, así como la estandarización de un método para la cuantificación de amilosa y amilopectina en las mismas.

3.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

3.1.1 Reactivos

Todos los reactivos usados fueron grado analítico. Para las medidas de densidad óptica se utilizaron reactivos grado espectrofotométrico.

- Ácido Bórico (Merck A.C.S. 99.5%)
- Ácido Clorhídrico (Merck A.C.S. 37%)
- Ácido Sulfúrico (Merck A.C.S. 95 – 97%)
- Dicromato de Potasio (Merck A.C.S. 99.5%)
- Dimetilsulfóxido (Fisher Scientific A.C.S. 99.9%)
- Éter de Petróleo (Merck A.C.S. 90%)
- Fenolftaleína (Merck A.C.S.)
- Fosfato dibásico de Sodio (Fisher Scientific A.C.S. 99.7%)
- Fosfato monobásico de Sodio (Mallinckrodt A.C.S. 99%)
- Hidróxido de Potasio (Merck A.C.S. 85%)
- Hidróxido de Sodio (Merck A.C.S. 99%)
- Patrón de Amilopectina de papa (Sigma–Aldrich)
- Patrón de Amilosa de papa (Sigma–Aldrich)
- Yodo (Merck A.C.S.)

3.1.2 Equipos

- Balanza analítica Precisa XT220A.
- Baño María 1Dies, modelo D5000.
- Campana de extracción C4, modelo C180X.
- Centrífuga Hermle, modelo Z300.
- Espectrofotómetro Genesys 6.
- Estufa Fisher Scientific, modelo 737G.
- Mufla Terrigeno, modelo F2PGA.
- pH-metro Fisher Scientific AccumentAB15.
- Plancha de calentamiento y agitación Corning, modelo PC 420.
- RotaevaporadorHeidolph, modelo Heizbad WB.

3.2 TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de estudio se recibieron en el laboratorio del grupo de investigación en Química de Productos Naturales empacadas en bolsas plásticas con un rotulo que contenía la variedad de la muestra y la cantidad. Las variedades de yuca de siete harinas y siete almidones analizados se muestran en la tabla 2. Éstas provenían del laboratorio del grupo de investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial en donde se recibieron inicialmente, se revisaron, pesaron y empacaron al vacío para ser distribuidas a los diferentes laboratorios de los Grupos de Investigación vinculados a los proyectos “producción y caracterización de empaques termoformados biodegradables a partir de harina de yuca, fibra de fique y plastificante” (ID 2254) y “producción y caracterización de películas flexibles biodegradables por extrusión de tornillo simple a partir de almidón de yuca, plastificante y PLA” (ID 2249),.ejecutados en la Universidad del Cauca y financiados por el Centro Regional de Productividad e Innovación del Cauca y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Las especies fueron escogidas teniendo en cuenta las variedades de yuca que se cultivan en el departamento del Cauca, recomendadas por el Programa de Fitomejoramiento Genético del CIAT

Tabla 2. Variedades de harina y almidón de yuca en estudio

No.	Harina	No.	Almidón
1	HCM 1	1	CM 7595 - 1
2	CM 7951 - 5	2	SM 1495 - 5
3	NATAIMA - 31	3	CUMBRE 3
4	MPER - 183	4	CM 7138 - 7
5	MBRA - 383	5	SM 707 - 17
6	CM 4574 - 7	6	MCOL 1522
7	CM 523 - 7	7	SM 1498 - 4

Las harinas se obtuvieron de la molienda de raíces de yuca semi-integrales (con parte de cáscara), provenientes de cultivos ubicados en el Resguardo Indígena de Toez, municipio de Caloto, Departamento del Cauca y fueron procesadas en la rallandería La Agustina ubicada en el sector La Agustina, Municipio de Mondomo en el mismo Departamento.

Los almidones se obtuvieron de raíces provenientes de la Vereda el Maco Municipio de Morales, Departamento del Cauca y fueron procesadas en la misma rallandería que las harinas.

3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y ORGANOLÉPTICA DE LAS HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA

Con el fin de detectar partículas y/o sustancias extrañas en las muestras, se realizó una inspección a cada una, registrando su olor, color, textura y presencia de materiales que no forman parte de ellas.

3.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA

Consistió en la determinación de la composición proximal, pH y de propiedades físicas de interés como el índice de absorción de agua, índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento.

3.4.1 Análisis proximal^{38, 39}

Se realizó aplicando los métodos de análisis de la AOAC que fueron normatizados por el Grupo de Investigación Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca.

Tabla 3. Metodología empleada en la determinación de la composición proximal de las muestras de estudio

DETERMINACIÓN	MÉTODO	NORMA AOAC
Humedad	Desecación a 70°C en horno hasta peso constante	925.09
Cenizas	Calcinación a 550°C, por 8 horas	923.03
Proteína bruta	Método Microkjeldahl	979.09
Extracto etéreo	Método Soxhlet, por 4 horas	920.85
Fibra bruta	Método Weende	920.86
Extracto no nitrogenado	Por diferencia	-

3.4.2 Determinación de pH

Se realizó siguiendo la metodología descrita por la FAO⁴⁰. Se pesó aproximadamente 0.5 g de muestra en un tubo de centrífuga, se agregó 9.5 mL de agua destilada, se agitó durante cinco minutos y se determinó el pH mediante el empleo de un pH-metro.

3.4.3 Propiedades físicas

Se determinaron mediante el método de Anderson aplicado por la FAO⁴¹. Se pesó aproximadamente 1.25 g de muestra seca en un tubo de centrífuga seco

³⁸ QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES. Norma instructiva de análisis próximo N.I.A.P 001 - 005

³⁹ AOACINTERNATIONAL. Official Methods of Analysis. [En línea]: <http://www.eoma.aoac.org> [Citado en Octubre de 2008]

⁴⁰ ARISTIZÁBAL, Johanna; Op Cit., p.89.

⁴¹ ANDERSON, R., et al.. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. En: Cereal Science Today. No.14. 1969. 4-12 p. Citado por: ARISTIZÁBAL, Johanna; SÁNCHEZ Teresa. Análisis fisicoquímico del almidón. En: Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca.

previamente pesado, se agregó 30 mL de agua a 60°C, se agitó y se llevó a baño maría a 60°C durante media hora, agitando diez minutos después de iniciar el calentamiento. Se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 4900 rpm durante media hora, se separó y midió el volumen de líquido y se pesó el tubo con el sólido. Del líquido se tomaron 10 mL y se llevaron a la estufa a 70°C durante toda la noche en un vaso de precipitados seco previamente pesado, se dejó enfriar y se pesó. Con estos datos se determinaron las propiedades físicas: índice de absorción de agua (I.A.A.), índice de solubilidad en agua (I.S.A.) y poder de hinchamiento (P.H.) mediante las ecuaciones 14-16.

$$\text{Í. A. A.} = \frac{\text{Peso del gel}}{\text{Peso muestra seca}} \quad \text{Ecuación 14}$$

$$\text{Í. S. A.} = \frac{\text{Peso solubles} \times \text{Vol} \times 10}{\text{Peso muestra seca}} \quad \text{Ecuación 15}$$

$$\text{P.H.} = \frac{\text{Peso del gel}}{\text{Peso muestra seca} - \text{Peso solubles}} \quad \text{Ecuación 16}$$

3.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA

Una vez establecido el método a utilizar, para poder iniciar la cuantificación se establecieron las longitudes de onda a las que se llevó a cabo y se realizó la estandarización del método que se aplicó luego a las muestras.

3.5.1 Selección de las longitudes de onda

Para todas las mediciones realizadas de los patrones de amilosa y amilopectina se partió de soluciones madre de 250 ppm de amilosa y 500 ppm de amilopectina preparadas de la siguiente manera:

Se pesó 25 y 50 mg de amilosa y amilopectina respectivamente, se suspendió en 1 mL de agua destilada y disolvió en KOH 5 M (4mL por cada 50 mg), se mantuvo en agitación magnética constante durante una hora, se neutralizó con HCl 4 M, se

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. La Organización. Roma, 2007. p.73.

agregó 4 mL de solución buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 (1 mL por cada 25 mL de solución) y se aforó a 100 mL con agua destilada, constituyendo ésta la solución madre inicial.

De esta solución se tomó el volumen necesario (tabla 4, pág 29) para preparar las soluciones con las concentraciones deseadas, se agregó 1 mL de solución buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, 500 µL de solución de yodo 0.2% en dimetilsulfóxido 85%, se aforó a 25 mL, se dejó en reposo durante 15 minutos y se realizó a cada solución tres barridos comprendidos entre los 200 nm y 900 nm.

Teniendo en cuenta los puntos considerados por los autores que trabajaron con almidón de papa y de maíz⁴², se realizaron barridos de soluciones patrón de amilosa de 15 y 30 ppm y de amilopectina de 70 y 85 ppm con el fin de seleccionar las longitudes de onda de cuantificación teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- Longitud de máxima absorbancia de una solución de amilosa de 15 ppm.
- Longitud de máxima absorbancia de una solución de amilopectina de 85 ppm.
- Longitud de máxima absorbancia de una solución de 15 ppm de amilosa y 85 ppm de amilopectina.
- Longitud de máxima absorbancia de una solución de 30 ppm de amilosa y 70 ppm de amilopectina.
- Longitud donde existe mayor diferencia entre los espectros de amilosa y amilopectina, en la cual la absorbancia de la amilosa es mayor que la de la amilopectina.
- Longitud donde existe mayor diferencia entre los espectros de amilosa y amilopectina, en la cual la absorbancia de la amilopectina es mayor que la de la amilosa.

La concentración de las soluciones con las que se realizó la selección de las longitudes de onda, al igual que las que se emplearon para los parámetros de estandarización se escogieron teniendo en cuenta los rangos de concentración teóricos en los que se encuentran la amilosa y la amilopectina en las muestras, y corresponde a los límites superior (30 ppm Am y 85 ppm de Ap) e inferior (15 ppm

⁴² SÉNE, M.; Op Cit.

Am y 70 ppm de Ap) de estos valores, también se hizo basándose en la metodología que siguieron Séné⁴³ y Jarvis⁴⁴.

3.5.2 Estandarización del método

Se llevó a cabo mediante la determinación de parámetros de confianza como linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), sensibilidad (límites de detección y cuantificación) y el porcentaje de recuperación de la siguiente manera.

3.5.2.1 Linealidad

Se determinó mediante curvas de calibración de patrones de amilosa y amilopectina. Se prepararon tres curvas; dos de ellas compuestas por los patrones individuales y la tercera por una mezcla de estos. Cada curva de calibración está compuesta por seis puntos de concentraciones comprendidas entre el 50 y el 150 % del rango de concentración en la que generalmente se encuentran los analitos en las muestras (15 – 30% de amilosa y 70 – 85% de amilopectina). De acuerdo a esto, las concentraciones en las curvas estaban comprendidas entre 8 – 43 ppm de amilosa, 36 – 126 ppm de amilopectina y la suma de ellas 8 + 36 ppm – 43 + 126 ppm de amilosa + amilopectina en el mismo orden, la diferencia entre las concentraciones de amilosa y amilopectina se debe a la proporción en que se encuentran en las muestras. Los volúmenes de solución madre empleados en la preparación de cada punto de las curvas se encuentran en la tabla 4, al igual que el de otras concentraciones empleadas durante todo el trabajo. Cada solución de las curvas se leyó en el espectrofotómetro por triplicado a cada una de las seis longitudes de onda establecidas.

⁴³ Ibid.

⁴⁴ JARVIS, C; Op Cit.

Tabla 4. Volumen de solución madre de cada analito empleada en la preparación de 25 mL de solución

[] de amilosa	vol agregado de solución madre 250 ppm	[] de amilopectina	vol agregado de solución madre 500 ppm
8 ppm	0.80 mL	36 ppm	1.80mL
15 ppm	1.50 mL	54 ppm	2.70 mL
22 ppm	2.20 mL	72 ppm	3.60 mL
29 ppm	2.90 mL	90 ppm	4.50 mL
36 ppm	3.60 mL	108 ppm	5.40 mL
43 ppm	4.30 mL	126 ppm	6.30mL
30 ppm	3.00 mL	70 ppm	3.50 mL
5 ppm	0.50 mL	85 ppm	4.25 mL
10 ppm	1.00mL	22 ppm	1.10 mL
		50 ppm	2.50 mL

3.5.2.2 Precisión

Se evaluó mediante la determinación de la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad como se describe a continuación.

Repetibilidad

Se preparó una solución de 30 ppm de amilosa y 70 ppm de amilopectina las cuales contenían el compuesto complejante, se leyó la absorbancia de cada solución cada diez minutos, completando cinco lecturas, a cada longitud de onda dentro del intervalo de 15 min – 1 h en el cual son estables los complejos formados.

Precisión Intermedia

Se realizaron medidas de soluciones patrón durante cinco días diferentes bajo las mismas condiciones (mismo analista, equipo y laboratorio) preparando una solución nueva cada día. Para ello se utilizaron soluciones de 30 ppm de amilosa, 70 ppm de amilopectina y 30 + 70 ppm de amilosa+amilopectina, leyendo la absorbancia de cada solución por triplicado a cada longitud de onda dentro del intervalo de 15 min – 1 h en el cual es estable la solución.

Reproducibilidad

Se realizó la lectura de soluciones patrón de las mismas concentraciones empleadas para la repetibilidad y bajo las mismas condiciones, preparando cada vez una solución nueva, las lecturas de absorbancia se efectuaron cada semana durante un mes y cada solución se leyó por triplicado a las seis longitudes de onda.

Con las absorbancias obtenidas en cada medición se calculó la concentración de amilosa y amilopectina utilizando las ecuaciones 25 y 26 respectivamente y con éstas el promedio (ecuación 17), desviación estándar (ecuación 18)⁴⁵ y coeficiente de variación (ecuación 19) de cada triplicado y del conjunto total de resultados.

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad \text{(Ecuación 17)}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad \text{(Ecuación 18)}$$

$$cv = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 19)}$$

3.5.2.3 Sensibilidad

Se evaluó mediante la determinación del límite de detección y límite de cuantificación. Para ello se empleó el dato estadístico $s_{y/x}$,⁴⁶ calculado a partir de los datos de las curvas de calibración mediante la ecuación 20. Teniendo en cuenta las definiciones los límites de detección y cuantificación se determinaron de la siguiente manera.

$$s_{y/x} = \left[\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 20}$$

Límite de Detección

⁴⁵ MILLER, JC.; Op Cit. p.20.

⁴⁶ MILLER, JC.; Op Cit. p.96 – 103.

Se estableció como la concentración de analito que genera una señal en el equipo equivalente a la señal del blanco más tres veces su desviación estándar.

$$\mathbf{LD = } y_B + 3s_B \qquad \text{Ecuación 21}$$

Límite de Cuantificación

Se estableció como la concentración de analito que genera una señal en el equipo equivalente a la señal del blanco más seis veces su desviación estándar.

$$\mathbf{LC = } y_B + 6s_B \qquad \text{Ecuación 22}$$

Donde, y_B corresponde a la señal del blanco y s_B ($s_{y/x}$) a la desviación estándar.

3.5.2.4 Exactitud

Se evaluó mediante la determinación del porcentaje de recuperación, empleando muestras (una harina y un almidón) en las cuales ya se había cuantificado la cantidad de los dos analitos presentes en ellas. Para ello se prepararon soluciones de muestra sola, muestra más la adición de una cantidad conocida de analito y soluciones de analito cuya concentración corresponde a la cantidad agregada a las muestras.

Las cantidades agregadas de analito corresponden a aproximadamente el 30, 50 y 70% de la concentración de los mismos en las muestras seleccionadas, cuyas concentraciones de analitos correspondientes se encuentran en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de analito empleadas para determinar el porcentaje de recuperación

PORCENTAJE APROXIMADO	[] AGREGADA DE AMILOSA	[] AGREGADA DE AMILOPECTINA
30 %	5 ppm	22 ppm
50 %	10 ppm	36 ppm
70 %	15 ppm	50 ppm

Cada solución se preparó tres veces y se leyeron a cada una de las seis longitudes de onda. El porcentaje de recuperación se calculó como muestra la ecuación 23.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración medida}}{\text{Conc. muestra} + \text{Conc. añadida}} \times 100 \quad \text{Ecuación 23}$$

Para los parámetros de linealidad, exactitud y precisión se leyó la absorbancia de los patrones en forma individual y en mezcla, con el fin de corroborar la aditividad de absorbancias y evaluar el comportamiento de los analitos juntos ya que así se encuentran en las muestras.

La medida de la absorbancia de las soluciones patrón de los analitos se utilizó para calcular la absorptividad molar de cada compuesto a cada una de las longitudes de onda haciendo uso de la ecuación 24 derivada de la ley de Lambert-Beer representada por la ecuación 3.

$$\epsilon = \frac{A}{Cb} \quad \text{Ecuación 24}$$

Donde,

A = Absorbancia

ϵ = Absorptividad molar

C = concentración de analito

b = Longitud del camino óptico (1cm)

3.5.3 Determinación de la concentración amilosa y amilopectina en muestras

El tratamiento de las muestras fue el mismo descrito anteriormente (sección 3.5.1 página 26) para los patrones.

De cada una de las muestras se pesó 100 mg y se preparó una solución madre de 500 ppm. Debido al contenido de fibra de las harinas y a la posibilidad de que quedaran partículas ajenas remanentes, fue necesario filtrar las soluciones antes de aforar.

A partir de la solución madre de 500 ppm de muestra se preparó una solución de 100 ppm tomando 5 mL de esta, se agregó 1 mL de solución buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, 500 µL de solución de yodo 0.2% en dimetilsulfóxido 85%, se aforó a 25 mL, se dejó en reposo durante 15 minutos y se leyó su absorbancia tres veces a cada una de las seis longitudes de onda.

Las absorbancias obtenidas para cada longitud de onda se relacionaron con las absorptividades molares (calculadas como se indicó previamente) recurriendo al método de cuantificación descrito por Harris⁴⁷ adoptado en su tiempo por Jarvis y Walker⁴⁸ y resumido por Sene⁴⁹ en las ecuaciones 25 y 26.

$$C_{Am} = \frac{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})_{\lambda i} \sum(A\varepsilon_{Ap})_{\lambda i}] - [\sum(A\varepsilon_{Am})_{\lambda i} \sum(\varepsilon_{Ap})_{\lambda i}^2]}{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})]^2 - [\sum(\varepsilon_{Ap})^2 \sum(\varepsilon_{Am})^2]} \quad (\text{Ecuación 25})$$

$$C_{Ap} = \frac{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})_{\lambda i} \sum(A\varepsilon_{Am})_{\lambda i}] - [\sum(A\varepsilon_{Ap})_{\lambda i} \sum(\varepsilon_{Am})_{\lambda i}^2]}{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})]^2 - [\sum(\varepsilon_{Ap})^2 \sum(\varepsilon_{Am})^2]} \quad (\text{Ecuación 26})$$

⁴⁷ HARRIS, Daniel. Op Cit. p.434 – 436.

⁴⁸ JARVIS, C.; Op Cit.

⁴⁹ SÈNE, M.; Op Cit.

Donde,

A = Absorbancia total

ϵ_{Am} = Absortividad molar amilosa

ϵ_{Ap} = Absortividad molar amilopectina

C_{Am} = Concentración de amilosa

C_{Ap} = Concentración de amilopectina

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Colombia la extracción de almidón comenzó aproximadamente en la década de 1950, el departamento del Cauca es el mayor productor del país ya que concentra la mayor cantidad de plantas procesadoras registradas según el censo del DANE del 2003⁵⁰ (210 rallanderías de las cuales 123 se encuentran activas y corresponden al 61.4 % del total nacional). Desde el inicio, el proceso para la obtención de este producto se ha llevado a cabo de forma artesanal y aunque en varias de estas plantas denominadas “rallanderías” se ha mecanizado algunas de las etapas y se ha implementado la producción de harina de yuca, en la actualidad el proceso aún se desarrolla de manera tradicional⁵¹.

Dentro de este contexto, fue necesario realizar la caracterización organoléptica y fisicoquímica tanto de las harinas como la de los almidones evaluados, puesto que esta forma de producción no garantiza una calidad estándar del producto final y requiere ser analizado para conocer su estado.

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y ORGANOLÉPTICA DE LAS HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA

La obtención de harina y almidón de yuca cuenta con las mismas etapas (limpieza, molienda, tamizado y secado), pero varía el orden y la forma en que se llevan a cabo. Una etapa que se diferencia en los dos procesos es la de secado, que en la obtención de la harina se encuentra al comienzo del proceso, mientras que en el almidón sólo ocurre al final y consiste en extender los trozos de yuca o el almidón húmedo respectivamente, sobre patios para que seque por efecto del calor del sol⁵². Debido a que se realiza a la intemperie, la muestra puede contaminarse fácilmente con materiales como tierra, piedras, trozos de ladrillo e incluso cabellos u otras partículas provenientes del entorno rural.

⁵⁰ DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. Encuesta Nacional Agropecuaria-Resultados 2003. La Organización. 2003. p. 209. [En línea]: http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/ENA/ENA_2003.pdf [Citado en Abril de 2011]

⁵¹ CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CAUCA. Rallandero Limpio. Sobre el Control de Contaminación y Producción Más Limpia en las Rallanderías de Almidón de Yuca en el Departamento del Cauca La Corporación. 2005. p. 8.

⁵²ALARCÓN, Op. Cit., t 1. p. 19.

Por tal razón, en este proyecto las muestras fueron caracterizadas físicamente, sometiéndolas a una revisión sensorial cuyos resultados están en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Características organolépticas de las harinas de yuca

HARINA	COLOR	OLOR	PARTÍCULAS EXTRAÑAS
HCM 1	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	Trocitos de ladrillo
CM 7951 - 5	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	ND
NATAIMA - 31	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	Piedrecillas
MPER - 183	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	ND
MBRA - 383	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	ND
CM 4574 - 7	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	Piedrecillas
CM 523 - 7	Habano	Suave aroma a fibra Sin olor extraño	ND

ND: No detectado

Según la norma del codex alimentarius⁵³ la harina de yuca apta para consumo humano deberá estar exenta de olores y sabores extraños al igual que de suciedad o impurezas que representen peligro para su consumo, respecto al color no se encontró normativa aunque la harina no integral por definición es blanca⁵⁴.

Anteriormente la harina de yuca era producida con el fin de emplearla en alimentación animal, por lo cual se procesaba la raíz con cáscara, pero en la actualidad su uso se extendió hacia la alimentación humana como sustituto parcial de la harina de trigo⁵⁵, esta harina se obtiene procesando las raíces sin cáscara.

⁵³ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Codex Alimentarius. Cereales, Legumbres, Leguminosas, Productos Derivados y Proteínas Vegetales. Harina de yuca comestible, CODEX STAN 176-1989. Vol 7. Segunda Edición. Roma, Italia. El Instituto, 1996. p. 141-144.

⁵⁴INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. Op Cit., p.16.

⁵⁵SCOTT, G., et al. Desarrollo de productos de raíces y tubérculos. Volumen II-América Latina. Memorias del taller sobre procesamiento, comercialización y utilización de raíces y tubérculos en

Conforme a esto, la harina de yuca se clasifica en harina integral (con cáscara) y harina blanca o no integral (sin cáscara)⁵⁶.

En este caso, las harinas analizadas son semi-integrales, es decir contienen parte de cáscara, que al ser café le confiere a las muestras un color un poco más oscuro, como se registra en la tabla 6.

En general, presentan olor suave y se logra captar el aroma característico de la fibra, no se percibe olores que indiquen deterioro o presencia de sustancias extrañas, sin embargo, mediante inspección visual logró identificarse partículas ajenas a ellas como trozos pequeños de piedras.

Al igual que las harinas, por ser un producto para consumo humano, el almidón cuenta con una norma⁵⁷ en la que se define⁵⁸ como un polvo fino de color blanco, debe estar exento de microorganismos, materia y olores extraños y por tratarse de un almidón nativo no debe tener olor a fermentado.

En la tabla 7, donde se relacionan las siete variedades de almidón analizados, se puede observar que todos son de color blanco, su olor es muy suave, no se percibió ningún olor anormal y en todas las variedades se encontró material ajeno a ellos, como cascarilla y fibras pequeñas remanentes de la limpieza y tamizado, además de piedras muy pequeñas, las cuales como ya se explicó, se adhieren a las muestras en la última etapa de secado.

América Latina. 8-12 abril 1991. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Villa Nueva, Guatemala. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú. p. 244-245.

56 INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. Cadena Agroindustrial Yuca. Nicaragua, 2004. p. 14-18.

57 MINISTERIO DE AGRICULTURA E INDUSTRIAS. Decreto 29 (25, Octubre, 1956) Por el cual se aprueba la norma oficial para almidón de yuca. La Gaceta. No. 251. San José, Costa Rica, 1956.

58 INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. Op Cit., p.16.

Tabla 7. Características organolépticas de los almidones de yuca

ALMIDÓN	COLOR	OLOR	PARTÍCULAS EXTRAÑAS
CM 7595 - 1	Blanco	Sin olor extraño	Piedrecillas
SM 1495 – 5	Blanco	Sin olor extraño	Fibras, piedrecillas
CUMBRE 3	Blanco	Sin olor extraño	Fibras, piedrecillas
CM 7138 - 7	Blanco	Sin olor extraño	Cascarilla, piedrecillas
SM 707 - 17	Blanco	Sin olor extraño	Fibras, piedrecillas
MCOL 1522	Blanco	Sin olor extraño	Piedrecillas
SM 1498 - 4	Blanco	Sin olor extraño	Cascarilla, piedrecillas

Las partículas extrañas, encontradas tanto en harinas como en almidones podrían alterar su composición haciendo que aumenten algunos de sus componentes y que se obtengan resultados errados en el momento de la cuantificación, por lo cual para los análisis posteriores se tomaron submuestras a las que le fueron eliminadas la mayor cantidad posible de estas partículas. Es importante que, si bien el proceso no se ha tecnificado, cada una de las etapas de obtención sea inspeccionada para eliminar o tratar de disminuir al máximo este tipo de interferentes.

4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA

Las muestras en estudio fueron caracterizadas con el fin de verificar su calidad, mediante la determinación de la composición química con un análisis proximal, medida de pH y de las propiedades físicas índice de absorción de agua, índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento.

Aunque no se van a destinar a la alimentación directamente, las muestras se van a emplear en la fabricación de empaques y recipientes para almacenar alimentos, por lo cual es importante conocer su composición, no solo por seguridad sino porque junto a las propiedades son la base del tratamiento o modificaciones que

sea necesario realizar a las muestras, así como de la formulación del producto final que se desea obtener.

4.2.1 Análisis proximal de las harinas de yuca

Los resultados se interpretaron basándose en valores reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)⁵⁹ registrados en la primera fila de la tabla 8. Estos corresponden al contenido de humedad, cenizas y fibra establecidos en la norma 176-1989 del codex alimentarius⁶⁰ para harina de yuca comestible, que aplica a harinas obtenidas a partir de raíces sin cáscara y cernidas con el fin de separar la fibra. Debido a que esta norma no presenta los valores correspondientes a proteína y grasa, estas referencias se tomaron del libro de Ospina (2002) y corresponden a valores reportados por BUITRAGO⁶¹ para harina de yuca sin cáscara.

Los resultados obtenidos de la determinación de macronutrientes en las harinas (tabla 8), muestran que todas excepto una presentan bajo contenido de humedad que no superan el 13%, igualmente por tratarse de una raíz los contenidos de grasa son mínimos, debido a que en las plantas el material graso tiende a acumularse en órganos como el fruto o la semilla. Por tanto, las muestras almacenadas adecuadamente no presentarán problemas de deterioro por causa de la humedad o las grasas. Sin embargo, al momento de realizar la cuantificación de amilosa y amilopectina, a las muestras se les debe extraer el contenido graso ya que estas forman complejo con estos componentes e impedirían que formen el complejo con el yodo y por tanto su correcta cuantificación.

El contenido de humedad no solo en harina de yuca sino en aquellas provenientes de cualquier otra fuente se recomienda que esté por debajo del 15% - 16% con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos o que se lleven a cabo otras reacciones como las de tipo enzimático, pardeamiento u oxidación lipídica aunque

⁵⁹ARISTIZÁBAL, Johanna. Op Cit., p. 73,113.

⁶⁰ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Op Cit.

⁶¹BUITRAGO, A JA. La yuca en la alimentación animal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, 1990. p. 450. En: OSPINA, Bernardo y CEBALLOS, Hernán. La yuca en el tercer milenio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Mayo 2002. Cap2. p. 28. [En línea]: <http://www.clayuca.org/contenido.htm>[Citado en Noviembre de 2008]

esta última también ocurre cuando los contenidos de grasa son altos y el porcentaje de humedad es muy bajo^{62,63}.

Como los valores de referencia se aplican a harina refinada usada en alimentación humana y la harina empleada en el proyecto es harina semi-integral (contiene parte de cascara) no refinada, producida básicamente para la alimentación de animales, se espera que presente un mayor contenido de los nutrientes que se encuentran en esta y en las fibras centrales que son principalmente fibra y minerales.

Tabla 8. Composición proximal de las harinas de yuca (g/100 g de muestra)

HARINA	HUMEDAD	CENIZAS	PROTEÍNA	GRASA	FIBRA	CHOS SOLUBLES
REFERENCIA	< 13.0*	< 3.0*	1.56**	0.88**	< 2.0*	
HCM 1	a 5.58 ± 0.21	1.94 ± 0.05	1.35 ± 0.04	0.30 ± 0.00	1.77 ± 0.06	89.06 ± 0.18
	b -	2.06 ± 0.05	1.43 ± 0.04	0.32 ± 0.00	1.88 ± 0.07	94.31 ± 0.04
CM 7951 - 5	a 4.85 ± 0.05	2.10 ± 0.01	1.20 ± 0.20	0.25 ± 0.00	2.19 ± 0.15	89.41 ± 0.37
	b -	2.21 ± 0.01	1.26 ± 0.21	0.26 ± 0.00	2.30 ± 0.16	93.97 ± 0.36
NATAIMA 31	a 4.86 ± 0.14	2.08 ± 0.03	1.42 ± 0.00	0.46 ± 0.02	1.74 ± 0.02	89.44 ± 0.10
	b -	2.19 ± 0.04	1.50 ± 0.00	0.48 ± 0.02	1.83 ± 0.02	94.00 ± 0.06
MPER 183	a 4.32 ± 0.05	1.36 ± 0.02	2.47 ± 0.00	0.48 ± 0.00	2.03 ± 0.05	89.34 ± 0.09
	b -	1.43 ± 0.02	2.58 ± 0.00	0.51 ± 0.00	2.12 ± 0.05	93.36 ± 0.05
MBRA 383	a 3.58 ± 0.20	1.41 ± 0.00	2.29 ± 0.02	0.40 ± 0.01	2.63 ± 0.01	89.69 ± 0.19
	b -	1.47 ± 0.00	2.38 ± 0.02	0.50 ± 0.01	2.73 ± 0.01	92.92 ± 0.02
CM 4574 - 7	a 3.53 ± 0.18	1.38 ± 0.00	1.81 ± 0.04	0.32 ± 0.01	2.71 ± 0.01	90.25 ± 0.20
	b -	1.43 ± 0.00	1.88 ± 0.04	0.34 ± 0.01	2.81 ± 0.01	93.54 ± 0.04
CM 523 - 7	a 9.48 ± 0.05	1.70 ± 0.03	2.19 ± 0.04	0.26 ± 0.00	2.59 ± 0.10	83.78 ± 0.20
	b -	1.88 ± 0.03	2.42 ± 0.04	0.29 ± 0.00	2.86 ± 0.11	92.55 ± 0.17

a, Base húmeda; b, base seca, CHOS = Carbohidratos.

* Fuente: FAO 2007. ** Fuente BUITRAGO, 1990. p. 450. Contenido promedio en base seca.

⁶²BELITZ, Hans-Dieter. Op Cit., p. 5.

⁶³UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ. Dirección Nacional de Servicios Académicos Virtuales. Procesamiento y conservación de frutas. [En línea]: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006228/teoria/fundam/p5.htm> [Citado en Diciembre de 2010]

El material mineral es uno de los componentes que se vería afectado por las partículas encontradas en algunas de las muestras (tabla 6), si no se hubieran retirado. En la tabla 8 se observa que el contenido mineral hallado en las harinas no sobrepasan los límites establecidos por las normas.

La fibra presente en las muestras proviene en su mayoría, de vasos duros de xilema que se encuentran ubicados en el centro de la raíz y dispersos por toda la pulpa en menores cantidades (figura 1). En rallanderías tecnificadas, la harina se clasifica haciéndola pasar por tamices de diferentes tamaños (3 mm, 177 y 100 μ m), principalmente cuando va a ser destinada al consumo humano, pero en rallanderías artesanales, como es el caso, el proceso de tamizado se realiza mediante mallas que no presentan un tamaño de poro bien definido y no se logra obtener un producto totalmente homogéneo. De esta manera, y teniendo en cuenta que la harina contiene una parte de cáscara, la fibra que no es retenida por las mallas y la que está presente en la cáscara hace que aumente la composición de este nutriente, como se observa en algunas de las muestras (tabla 8) cuyo contenido de fibra supera el valor límite permitido.

El tamaño de la fibra afecta la calidad de una harina principalmente si se usa como alimento, en este caso, las harinas se van a emplear en la fabricación de materiales plásticos termoformados, para lo cual el contenido de fibra al igual que su tamaño es importante, ya que es uno de los materiales base para su elaboración, pero para el objetivo específico de este trabajo que es la cuantificación de amilosa y amilopectina por Uv-Vis la fibra representa un interferente en el momento de realizar la lectura de la absorbancia, por esta razón, como se explica más adelante en el tratamiento de las muestras para la cuantificación, este componente se elimina mediante filtrado.

En cuanto a la presencia de proteína, la cual tiene gran importancia si va a ser utilizada con fines alimenticios, en la mayoría de las harinas analizadas se encontraron contenidos que se hallan por encima del valor promedio para harina sin cáscara reportado por BUITRAGO⁶⁴ (1.56 % en base seca), sin embargo éste también presenta la composición de la harina obtenida a partir de raíces con cáscara (tabla 1) y en ese caso el contenido promedio de proteína es 3.05 %, lo cual muestra que el exceso encontrado en las muestras analizadas proviene de la porción de cáscara que contienen.

⁶⁴BUITRAGO, A JA. Op Cit.

Por contener mayor cantidad de los demás nutrientes, en las harinas naturalmente disminuirá el contenido de carbohidratos solubles (tabla 8), en comparación con las muestras de almidones (tabla 9) y eso por supuesto afectará los análisis que dependan de esta proporción como las propiedades físicas tratadas más adelante.

En general, la composición de las muestras de harinas es semejante a las reportadas por otros autores^{65,66}.

4.2.2 Análisis proximal de los almidones de yuca

Durante la obtención del almidón, luego de rallar las raíces y realizar lavados con agua, la suspensión que se obtiene se deja sedimentar durante aproximadamente ocho horas, después de esto se tienen tres capas de las cuales la primera o la superficial contiene almidón y agua residual, la última es el almidón de mejor calidad y la del medio contiene almidón menos denso y de poca calidad mezclado con material protéico⁶⁷. Debido a esto y a que se emplean raíces sin cáscara, se espera que en el almidón el contenido de los demás nutrientes sea nulo o mínimo, ya que está compuesto principalmente por carbohidratos solubles.

El contenido de humedad de los almidones analizados que se reporta en la tabla 9 es más alto que en las harinas, pero se mantiene por debajo del valor límite, esto es importante, ya que en un almidón contenidos de humedad por encima del 13% favorecen la formación de hongos y levaduras y la susceptibilidad de que se lleven a cabo reacciones de fermentación que hacen disminuir el pH⁶⁸.

Al comparar las tablas 6 y 7 se puede notar que todos los almidones analizados contienen material extraño, mientras que no a todas las harinas les pasa lo mismo. Durante el secado el almidón está en mayor contacto con la superficie del suelo a diferencia de un trozo de yuca, por lo cual se contamina más, a pesar de haber seleccionado una porción de muestra en la cual no estuvieran presentes partículas que se pudieran identificar a simple vista, se observa un aumento en el contenido

⁶⁵ HENAO, Sergio; ARISTIZÁBAL, Johanna. Influencia de la variedad de yuca y nivel de sustitución de harinas compuestas sobre el comportamiento reológico en panificación. En: Ingeniería e Investigación. Vol. 29 No. 1, 2009. p. 39-46.

⁶⁶ BENÍTEZ, Betty; et al. Composición proximal, evaluación microbiológica y sensorial de una galleta formulada a base de harina de yuca y plasma de bovino. En: Interciencia. Vol. 33 No. 1, 2008. p. 61 – 65.

⁶⁷ ALARCÓN, Op. Cit., t 1. p. 16.

⁶⁸ ARISTIZÁBAL, Johanna. Op Cit., p. 113 -114.

mineral de tal forma que los valores obtenidos (tabla 9), están por encima del valor permitido, por esta razón también es necesario filtrar las soluciones de almidón en el momento de la cuantificación de amilosa y amilopectina.

Mediante los métodos empleados para la determinación del contenido de proteína y fibra, en los almidones analizados, no se detectó la presencia de ninguno de estos dos nutrientes, aunque son permitidos en pequeñas proporciones. La presencia de proteína es un factor que afecta la calidad en contenidos altos, cambia el olor y sabor e indica falencias en el proceso de eliminación de la segunda capa en la sedimentación y son poco favorables porque hace al almidón susceptible al ataque de microorganismos.

Tabla 9. Composición proximal de los almidones de yuca (g/100 g de muestra)

ALMIDÓN	HUMEDAD	CENIZAS	PROTEÍNA	GRASA	FIBRA	CHOS SOLUBLES
REFERENCIA*	< 13.0	< 0.12	< 0.36	< 0.5	< 0.2	92 - 98
CM 7595 - 1	a 11.59 ± 0.45	0.12 ± 0.01	ND	0.05 ± 0.00	ND	88.24 ± 0.45
	b	0.13 ± 0.01	ND	0.05 ± 0.00	ND	99.82 ± 0.00
SM 1495 - 5	a 11.30 ± 0.14	0.34 ± 0.00	ND	0.05 ± 0.00	ND	88.31 ± 0.14
	b	0.38 ± 0.00	ND	0.05 ± 0.00	ND	99.57 ± 0.00
CUMBRE 3	a 7.58 ± 0.25	0.21 ± 0.01	ND	0.06 ± 0.00	ND	92.15 ± 0.25
	b	0.23 ± 0.02	ND	0.06 ± 0.00	ND	99.71 ± 0.00
CM 7138 - 7	a 7.23 ± 0.23	0.25 ± 0.01	ND	0.07 ± 0.00	ND	92.45 ± 0.23
	b	0.27 ± 0.01	ND	0.07 ± 0.00	ND	99.66 ± 0.00
SM 707 - 17	a 7.52 ± 0.11	0.19 ± 0.00	ND	0.07 ± 0.00	ND	92.22 ± 0.11
	b	0.20 ± 0.00	ND	0.07 ± 0.00	ND	99.73 ± 0.00
MCOL 1522	a 8.33 ± 0.01	0.11 ± 0.01	ND	0.07 ± 0.00	ND	91.49 ± 0.01
	b	0.12 ± 0.01	ND	0.07 ± 0.00	ND	99.81 ± 0.00
SM 1498 - 4	a 6.77 ± 0.24	0.19 ± 0.02	ND	0.08 ± 0.01	ND	92.96 ± 0.24
	b	0.21 ± 0.02	ND	0.09 ± 0.01	ND	99.70 ± 0.02

a, Base húmeda; b, base seca. ND: No detectado

* Fuente: FAO 2007.

El contenido graso fue detectado en cantidades bastante bajas que no alcanzan el 0.1% frente al 0.5% permitido según la FAO⁶⁹. En este tipo de muestras la grasa puede ocasionar rancidez en el almacenamiento y también formar complejos con los componentes del almidón (amilosa y amilopectina) limitando la solubilización de los gránulos, su disponibilidad y dificultando su cuantificación, por lo cual este componente se elimina antes de aplicar el método desarrollado.

Como un requisito de calidad un almidón de yuca debe contener entre 92 – 98%⁷⁰ en base seca de almidón, que en este caso está representado por los carbohidratos solubles, estos y su interacción con los demás nutrientes otorgan las propiedades características de este compuesto. El hecho de no detectar proteína ni fibra en los almidones analizados y contenidos muy bajos de grasa, influye en un incremento en la proporción de almidón, de tal forma que los porcentajes de carbohidratos solubles en todas las muestras superan el 99 % en base seca.

En principio se entiende que los carbohidratos solubles están representados por almidón, por tanto su contenido debe corresponder en teoría, a la suma del contenido de amilosa y amilopectina, cuya determinación es el objeto de este trabajo.

4.2.3 Determinación de pH en las harinas y almidones de yuca

Comparando los valores de pH determinados en las muestras, con los valores de referencia para un almidón nativo según la FAO (tabla 10), se observa que se encuentran en su mayoría casi una unidad por encima, lo cual indica que posiblemente se haya generado contaminación por hongos, ya que aunque estos crecen a pH bajos provocan un aumento del mismo y tanto las muestras como las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de estos microorganismos.

El almidón agrio es el resultado de la acción de bacterias amilolíticas que se desarrollan en condiciones anaerobias, para que esto ocurra, después de la decantación del almidón éste se transfiere a tanques en los que se deposita sobre la muestra una capa que puede ser agua, o afrecho que lo aísla del ambiente, por tanto es posible que este proceso comience a ocurrir durante la etapa de sedimentación y que el pH se vea afectado si el almidón permanece en estos

⁶⁹ARISTIZÁBAL, Johanna. Op Cit

⁷⁰Ibid. p. 113.

tanques más tiempo del necesario, así que para el almidón nativo se sugiere que esta etapa sea controlada.

Como medida de la calidad en un almidón, el pH ayuda a descubrir si se han llevado a cabo procesos de fermentación ácida. Las enzimas de los microorganismos degradan el almidón liberando moléculas de glucosa susceptibles a ser convertidas por otros microorganismos en ácido láctico y otros ácidos orgánicos secundarios⁷¹, provocando un descenso en el valor del pH que puede disminuir hasta 4,0. El proceso contrario ocurre con la presencia de hongos cuyo crecimiento libera amoníaco, lo cual hace que el pH aumente. Las harinas por contener porcentajes altos de almidón, son susceptibles también a estos fenómenos, sin embargo, un factor importante es que un pH bajo puede ser indicador de la presencia de sustancias cloradas empleadas como blanqueadores.

Tabla 10. pH de las harinas y almidones de yuca

ALMIDÓN	pH	HARINA	pH
REFERENCIA	6.0 – 6.5*	REFERENCIA	6.0 - 6.3**
CM 7595 - 1	7.45 ± 0.03	HCM 1	5.66 ± 0.01
SM 1495 – 5	7.48 ± 0.01	CM 7951 - 5	5.89 ± 0.03
CUMBRE 3	5.97 ± 0.02	NATAIMA - 31	5.64 ± 0.01
CM 7138 - 7	7.15 ± 0.03	MPER - 183	6.02 ± 0.02
SM 707 - 17	7.48 ± 0.02	MBRA - 383	5.97 ± 0.03
MCOL 1522	5.30 ± 0.02	CM 4574 - 7	6.95 ± 0.01
SM 1498 - 4	5.28 ± 0.03	CM 523 - 7	5.38 ± 0.05

*Fuente: FAO 2007.

**pH de harinas de cereales. Fuente www.food-info.net/es/qa/qa-fp65.htm

Los valores de pH de las harinas (tabla 10) están ligeramente por debajo de los valores límite sin gran diferencia. Sin embargo, por estar compuestos en gran parte por almidón, las harinas también están expuestas a las mismas reacciones que lo afectan y el pH encontrado puede indicar el inicio de un proceso de fermentación o de sus fases iniciales.

⁷¹ CADENA, Marly, et al. Evaluación de la agroindustria del almidón agrio de yuca (*Manihotesculenta*Crantz) en Córdoba y Sucre. *En: Temas Agrarios*. Vol 11. No. 1. 2006. p. 43 – 53.

En la norma existente para harina de yuca no se especifica el valor de pH que debe presentar, sin embargo, existen normas para harinas obtenidas a partir de otras fuentes cuyas especificaciones o requerimientos no varían mucho de una a otra, por lo cual se tomó como referencia el pH correspondiente a harinas de cereales que se debe encontrar en el rango de 6.0 – 6.5. Adicionalmente, se encontró un reporte en Colombia de una harina de yuca que presenta un pH de 6.1⁷², el cual se encuentra dentro de este rango.

Debido a que este tipo de muestras (harinas y almidones) tienden a absorber humedad del ambiente con mucha facilidad, es conveniente que sean almacenadas tratando de controlar este aspecto para evitar deterioros que se desencadenan por esta causa. y que hacen que una muestra no se encuentre en condiciones aptas para ser analizada.

En este caso aunque no se comprobó que haya ocurrido una fermentación, o la existencia de hongos, las variaciones de pH encontradas en las muestras no son grandes y no impiden el análisis de ellas, no obstante son útiles para justificar resultados incoherentes que se puedan presentar.

4.2.4 Propiedades físicas de harinas y almidones de yuca

Las propiedades físicas son un indicador de la calidad de una harina o un almidón de yuca y se establecen por medio del índice de absorción de agua (I.A.A.), índice de solubilidad en agua (I.S.A.) y poder de hinchamiento (P.H.), que como sus nombres lo indican son una medida de la solubilidad y capacidad de absorción de agua de las muestras.

Al comparar los valores obtenidos de estas propiedades para los almidones con los valores de referencia para almidones de yuca⁷³ que se encuentran en la primera fila de la tabla 11, se nota que la mayoría de ellos a excepción de una o dos muestra sobrepasan el límite superior en cuanto a I.A.A. y P.H., y presentan valores muy bajos de I.S.A., no obstante, entre mayores sean el I.A.A. y P.H. y menor el I.S.A. en un almidón, mayor va a ser su calidad, de lo contrario, afectaría

⁷² ALVARADO, Gabriela y CORNEJO, Fabiola. Obtención de harina de yuca para el desarrollo de productos dulces destinados para la alimentación de celíacos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 2009. [En línea]: www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/6391 [Citado en Julio de 2010]

⁷³ ARISTIZÁBAL, Johanna. Op Cit., p. 73 -74

fenómenos como la gelificación y retrogradación mencionados anteriormente (sección 1.4.1, pág 5).

Para las harinas no se encontraron normas que limiten las propiedades físicas, pero es posible realizar un comparativo con los lineamientos dados para almidones, puesto que su composición es en gran proporción almidón.

Cuando se obtienen valores contrarios a estos, es decir, bajos I.A.A. y P.H. y altos I.S.A., se trata de muestras que han sido modificadas, o en el caso de las harinas, cuando las muestras presentan menor cantidad de almidón, debido a que en su composición se encuentran otros nutrientes como fibra y proteína que no están presentes en el almidón y aumenta el contenido de material mineral y grasa, siendo este último una posible influencia en los valores obtenidos en la tabla 12, ya que las grasas forman complejos principalmente con la amilosa impidiendo que los gránulos se solubilizan.

Tabla 11. Propiedades físicas de los almidones de yuca

ALMIDÓN	I.A.A (g gel/g m)	I.S.A (g sol/g m)	P.H. g. gel/(g m-g sol)
REFERENCIA*	0.82 – 15.52	0.27 – 12.32	0.79 – 15.45
CM 7595 - 1	22.32 ± 0.23	0.24 ± 0.00	23.07 ± 0.47
SM 1495 – 5	19.28 ± 0.24	0.04 ± 0.00	19.45 ± 0.24
CUMBRE 3	15.08 ± 0.04	0.36 ± 0.00	15.36 ± 0.04
CM 7138 - 7	19.64 ± 0.11	0.21 ± 0.00	20.06 ± 0.11
SM 707 - 17	16.25 ± 0.11	0.54 ± 0.00	16.55 ± 0.11
MCOL 1522	17.54 ± 0.29	0.43 ± 0.02	18.34 ± 0.32
SM 1498 - 4	14.92 ± 3.09	0.60 ± 0.25	16.72 ± 0.46

*Fuente: FAO 2007.

Los almidones por contener mayor cantidad de amilopectina que de amilosa en principio, no son solubles en agua a temperatura ambiente, por lo tanto presentan bajos índices de solubilidad, si no han sido modificados y el gránulo se encuentra intacto tienen la capacidad de absorber una cantidad importante de agua, lo cual determina o corresponde directamente a su poder de hinchamiento.

Tabla 12. Propiedades físicas de las harinas de yuca

HARINA	I.A.A (g gel/g m)	I.S.A (g sol/g m)	P.H. g. gel/(g m-g sol)
HCM 1	7.03 ± 0.02	8.36 ± 0.01	7.29 ± 0.03
CM 7951 - 5	3.35 ± 0.10	8.33 ± 0.00	3.46 ± 0.11
NATAIMA - 31	7.18 ± 0.78	2.01 ± 0.86	7.56 ± 0.82
MPER - 183	4.63 ± 0.01	3.12 ± 0.45	4.93 ± 0.04
MBRA - 383	6.36 ± 0.03	2.83 ± 0.03	6.74 ± 0.04
CM 4574 - 7	5.86 ± 0.05	2.65 ± 0.03	6.19 ± 0.05
CM 523 - 7	6.44 ± 0.04	7.79 ± 0.42	6.66 ± 0.05

Estos análisis, además de proporcionar información acerca del contenido nutricional y de su calidad, sirve de base para la siguiente etapa de desarrollo del trabajo, ayudan deducir las causas de posibles inconvenientes que se presenten y cómo se pueden eliminar o solucionar, como es el caso de las partículas extrañas la fibra y el contenido graso que deben ser eliminados para que no afecten las mediciones en el momento de la cuantificación.

Según esto y los resultados obtenidos hasta este punto, las muestras presentan las características debidas y se puede continuar con su análisis, esperando que la cantidad de amilosa y amilopectina presentes en ellas correspondan a los valores encontrados en teoría.

4.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA

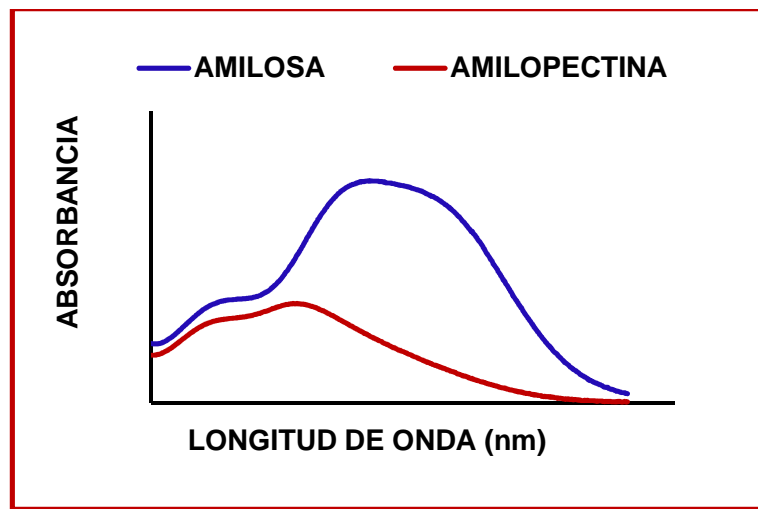
El método empleado en este trabajo para la cuantificación de amilosa y amilopectina inicialmente fue utilizado por JARVIS, C. y WALKER, J⁷⁴ para determinar el contenido de estos componentes en almidón de papa. Consiste en acomplejar la amilosa y amilopectina con yodo obteniendo un compuesto coloreado cuya absorbancia puede ser medida en la región visible del espectro electromagnético.

Debido a que estos dos complejos absorben en toda la región visible (aunque sus absorbancias máximas no se encuentran en el mismo punto), no es posible

⁷⁴JARVIS, C.; Op Cit.

cuantificar a una sola longitud de onda ya que sus espectros se superponen como se observa en la figura 7 y la absorbancia obtenida a cualquier longitud es la suma de los dos. Por esto fue necesario emplear múltiples longitudes de onda para la cuantificación y relacionar todas las ecuaciones de Lambert-Beer resultantes, lo cual proporciona mayor exactitud que si se realiza solo con dos como se describe en el marco teórico (sección 1.6.1 página 16).

Figura 7. Superposición de espectros de los complejos de I₆-amilosa y I₆-amilopectina



Fuente: Autor

Para ello, siguiendo las pautas tenidas en cuenta por los autores Jarvis⁷⁵ y Sene⁷⁶ et al, se escogieron seis longitudes de onda como se describe a continuación.

4.3.1 Selección de las seis longitudes de onda de trabajo

De acuerdo con el tratamiento descrito en la sección 3.5.1 (pág 26) se prepararon soluciones patrón de amilosa (Am) y amilopectina (Ap) acomplejadas con yodo a las concentraciones que se especifican en la tabla 13. Se realizaron tres barridos entre los 200 y 900 nm a cada solución para determinar directamente las longitudes de onda a las que se llevaría a cabo la cuantificación. Estas longitudes

⁷⁵JARVIS, C. Op. Cit.

⁷⁶SÉNE, M.Op. Cit.

constituyen los puntos en los que se registró la máxima absorbancia de los complejos según lo observado en los espectros de la figura 8, que se usaron para definir cuatro de las seis longitudes de onda (tabla 13).

Tabla 13. Longitudes de onda seleccionadas a partir de soluciones patrón de amilosa y amilopectina para su cuantificación en almidones y harinas de yuca

REQUERIMIENTO	SOLUCIÓN MEDIDA	LONGITUD DE ONDA (nm)		
		Barrido 1	Barrido 2	Barrido 3
Máxima abs para Am	15 ppm (Am)	629	629	629
Máxima abs para Ap	85 ppm (Ap)	555	555	555
Máxabs para 15 ppm Am + 85 ppm de Ap	15 ppm (Am) + 85 ppm de (Ap)	598	598	598
Máxabs para 30 ppm Am + 70 ppm de Ap	30 ppm (Am) + 70 ppm (Ap)	613	613	613

Las otras dos longitudes de onda se establecieron mediante una resta de los espectros de las soluciones de 15 ppm de Am y 85 ppm de Ap, obteniéndose que la longitud de onda en que existe mayor diferencia entre los espectros de amilosa y amilopectina, donde la absorbancia de la amilosa es mayor que la de la amilopectina es 705 nm y donde la absorbancia de la amilopectina es mayor que la de la amilosa es 533 nm.

Comparando las longitudes de onda obtenidas con las de quienes trabajaron con almidones de papa y maíz (tabla 14), existe cercanía entre estos a pesar de que no se esperaba coincidencia total ya que los patrones son de diferente procedencia y las propiedades de estos compuestos varían según la fuente incluso dentro de una misma especie de planta.

Tabla 14. Longitudes de onda seleccionadas para cuantificación de Am Ap en almidones de papa y maíz

	LONGITUD DE ONDA					
	Máx Am	Máx Ap	Máx 15ppm Am + 85 ppm Ap	Máx 30 ppm Am + 70 ppm Ap	Mayor ≠; Ap > Am	Mayor ≠; Am > Ap
PAPA	630	548	580*	800**	504	700
MAÍZ	630	545	560	600	530	680
AUTOR	629	555	598	613	533	705

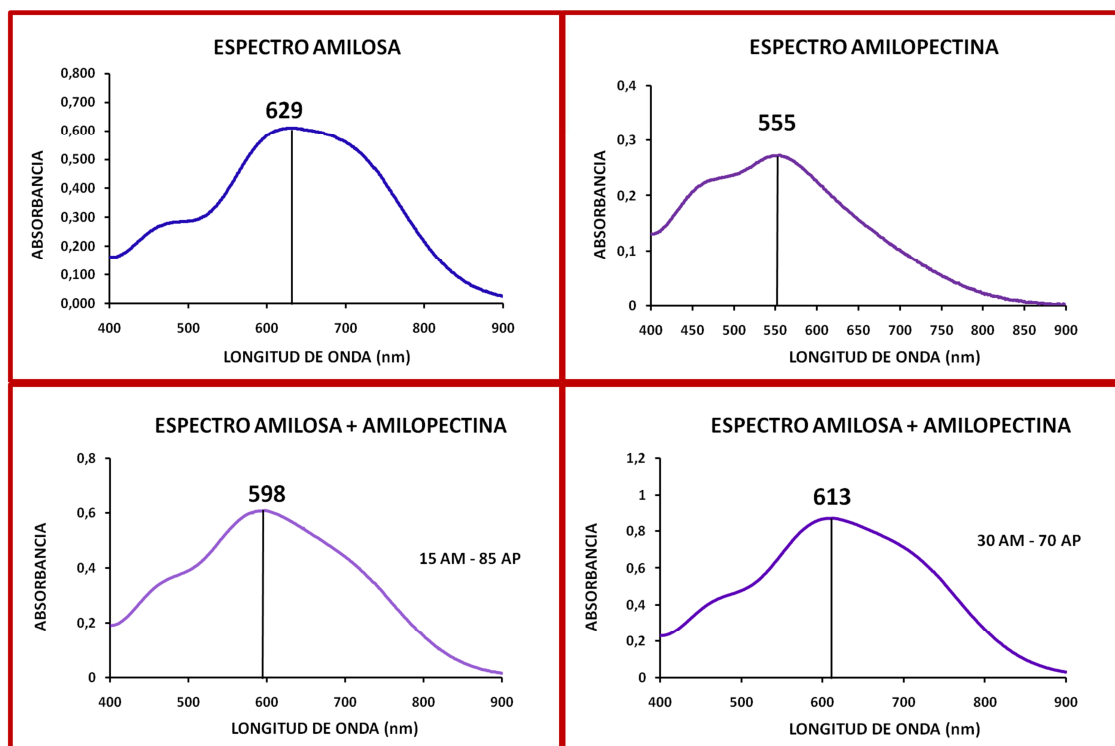
*Máxima absorbancia de una solución de 20 ppm de Am + 80 ppm de Ap.

**Longitud de mayor absorbancia de la amilosa donde la absorbancia de la amilopectina tiende a cero.

Fuente: Sene 1996 y Jarvis 1993.

En la figura 8 se puede apreciar que aunque los espectros de los complejos de amilosa y amilopectina son muy semejantes y presentan un pico en común alrededor de los 450 nm, sus máximos de absorbancia se encuentran distantes.

Figura 8. Espectros de las soluciones patrón de los complejos de I₆-amilosa y I₆-amilopectina empleadas para seleccionar las longitudes de onda



Después de fijar las longitudes de onda se usaron los mismos patrones para realizar la estandarización del método de cuantificación teniendo en cuenta los parámetros descritos a continuación.

4.3.2 Estandarización del método

4.3.2.1 Linealidad

Para establecer la linealidad del método se realizó la medida de curvas de calibración de cada patrón por separado y en mezcla. El rango de concentraciones de cada curva se estableció como aquel comprendido entre el 50% y 150% de la concentración promedio de estos analitos en la muestra, (15 – 30 ppm de amilosa y 70 – 85 ppm de amilopectina). De esta manera los puntos de las curvas fueron 8, 15, 22, 29, 36 y 43 ppm de amilosa y 36, 54, 72, 90, 108 y 126 ppm de amilopectina. Para evaluar el comportamiento de los patrones en mezcla y verificar la aditividad de absorbancias se preparó una curva conformada por las concentraciones de los patrones por separado, es decir, 8 + 36, 15 + 54, 22 + 72, 29 + 90, 36 + 108 y 43 + 126 ppm de amilosa + amilopectina respectivamente. Para esto se emplearon soluciones madre de amilosa y amilopectina preparadas siguiendo el tratamiento descrito en la sección 3.5.1 (pág 26).

En la figura 9 se encuentran representadas las curvas mediante un gráfico de absorbancia Vs concentración para cada patrón a cada una de las seis longitudes de onda establecidas, en el anexo 1 se encuentran los gráficos individuales de las curvas de cada patrón para cada longitud de onda. Los coeficientes de correlación momento-producto (r) y de determinación (r^2) obtenidos para las curvas a cada una de las longitudes de onda se relacionan en la tabla 15, al igual que las ecuaciones de las rectas y las desviaciones asociadas a las pendientes (S_b) e interceptos (S_a).

Figura 9. Representación gráfica de las curvas de calibración de a) I₆ - amilosa, b) I₆ - amilopectina y c) su mezcla, medidas a las seis longitudes de onda

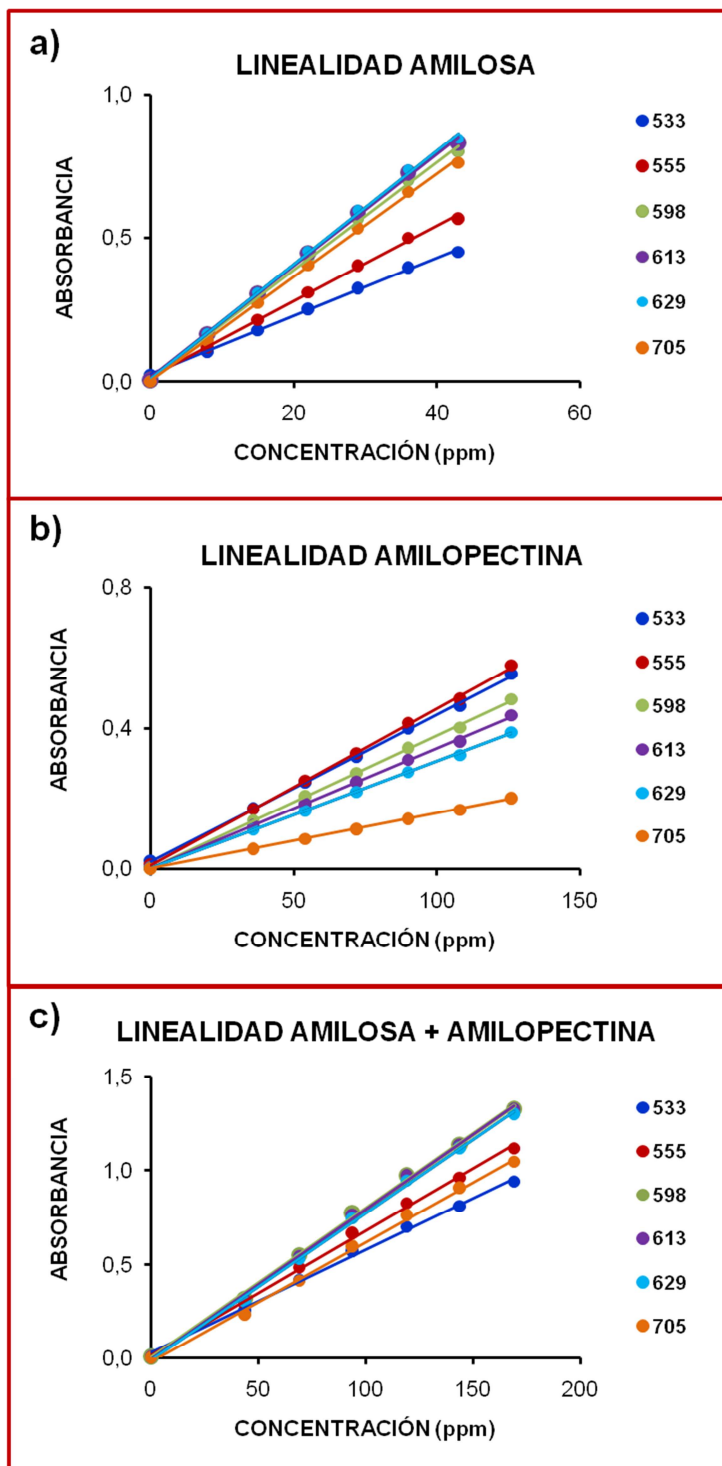


Tabla 15. Parámetros de calibración empleados para determinar la linealidad del método a partir de las curvas de amilosa, amilopectina y amilosa + amilopectina a cada longitud de onda

		LONGITUD ONDA(nm)					
		533	555	598	613	629	705
r	Am	0.9993	0.9993	0.9993	0.9993	0.9994	0.9995
	Ap	0.9996	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997
	Am + Ap	0.9988	0.9989	0.9990	0.9990	0.9990	0.9988
r ²	Am	0.9986	0.9986	0.9986	0.9987	0.9988	0.9990
	Ap	0.9993	0.9994	0.9995	0.9994	0.9995	0.9994
	Am + Ap	0.9976	0.9978	0.9980	0.9980	0.9980	0.9977
E C	Am	y = 0.0101x + 0.0251	y = 0.0132x + 0.0161	y = 0.0189x + 0.0100	y = 0.0196x + 0.0099	y = 0.0199x + 0.0088	y = 0.0180x + 0.0041
	s _b	1.71E-04	2.24E-04	3.18E-04	3.15E-04	3.13E-04	2.54E-04
	s _a	3.09E-03	4.05E-03	5.75E-03	5.69E-03	5.65E-03	4.59E-03
P E N D I E N T E S	Ap	y = 0.0042x + 0.0214	y = 0.0045x + 0.0103	y = 0.0038x + 0.0029	y = 0.0034x + 0.0023	y = 0.0030x + 0.0023	y = 0.0016x + 0.0005
	s _b	5.60E-05	6.25E-05	4.71E-05	3.78E-05	4.39E-05	2.04E-05
	s _a	3.39E-03	3.78E-03	2.85E-03	2.29E-03	2.66E-03	1.24E-03
	Am + Ap	y = 0.0055x + 0.0322	y = 0.0066x + 0.0186	y = 0.0080x + 0.0002	y = 0.0080x - 0.0033	y = 0.0078x - 0.0064	y = 0.0064x - 0.0164
	s _b	4.65E-04	5.35E-04	6.18E-04	6.11E-04	5.99E-04	5.36E-04
	s _a	8.40E-03	9.66E-03	1.12E-02	1.11E-02	1.08E-02	9.68E-03

Teniendo como criterio de linealidad $r > 0.990$ y $r^2 > 0.980^{77}$, los coeficientes encontrados indican una relación lineal entre la concentración de analito y la respuesta del equipo, sin embargo; se planteó una hipótesis nula que supone que no existe correlación entre x y y, y se realizó el cálculo de la t de student para n-2 grados de libertad al 95% de confianza empleando la ecuación 27.

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (\text{Ecuación 27})$$

⁷⁷MILLER, J. C.; MILLER J. N. Estadística para Química Analítica. Segunda Edición. Editorial Addison y Wesley Iberoamericana. Estados Unidos. 1993. p. 92.

La hipótesis se descarta si el valor de t calculado es mayor al tabulado. Al comparar los valores de t calculados para todas las curvas que se encuentran en la tabla 16 con el t tabulado que es 2.57 para el nivel de confianza escogido, se puede notar que los t calculados son mayores al tabulado, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza y se confirma la relación lineal entre la señal del equipo y las concentraciones de analito para cada curva a cada longitud de onda.

Tabla 16. Valores de t calculado para cada una de las curvas a cada longitud de onda

		LONGITUD ONDA(nm)					
		533	555	598	613	629	705
t CALCULADO	AM	59.75	59.75	59.75	61.90	64.59	70.73
	AP	84.35	91.24	99.80	91.24	99.80	91.24
	AM + AP	45.58	47.63	49.97	49.97	49.97	46.53

COEFICIENTES DE ABSORCIÓN

En adelante el cálculo de los parámetros de confianza se realiza con base en la concentración, para lo cual se necesita conocer los coeficientes de absorción denotados con la letra griega Épsilon (ϵ) en la Ley de Lambert-Beer (ecuación 3). Por esta razón, después de determinar la linealidad del método se empleó la ecuación 24 (pág 32), para calcular los coeficientes de absorción (ϵ) de los complejos de amilosa y amilopectina a partir de la absorbancia y concentración de estos en cada punto de las curvas empleadas para la linealidad y para cada longitud de onda.

Los coeficientes obtenidos que se usaron en adelante para calcular la concentración de los compuestos se encuentran en la tabla 17 con sus coeficientes de variación, los cuales se encuentran por debajo del valor aceptado de hasta 5%. Dependiendo de la longitud de onda, los coeficientes varían entre $10 - 21 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ para la amilosa y entre $1 - 5 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ para la amilopectina. Estos valores son cercanos a los obtenidos por Sene⁷⁸ et al, $16 - 26 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ para amilosa y $1 - 4 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ para amilopectina provenientes de maíz.

⁷⁸SÉNE, M. Op. Cit.

Tabla 17. Coeficientes de absorción de los complejos de I₆-amilosa y I₆-amilopectina calculados a partir de las absorbancias de las curvas de calibración a cada longitud de onda

		LONGITUD ONDA(nm)					
		533	555	598	613	629	705
COEFICIENTE DE ABSORCIÓN ((mg/mL) ⁻¹)	Am	10.21	13.42	19.23	19.98	20.24	18.15
	CV	1.85	1.77	1.75	1.65	1.62	1.55
	Ap	4.14	4.42	3.75	3.38	3.02	1.58
	CV	1.25	1.18	1.07	1.19	1.00	1.00

El cálculo de la concentración de los analitos se realizó por medio de las ecuaciones 25 y 26 (página 33) diseñada por los autores Sene⁷⁹ et al, en donde se relacionan estos coeficientes con la absorbancia registrada en la longitud de onda respectiva.

4.3.2.2 Sensibilidad

Se determinó empleando el dato estadístico Sy/x ⁸⁰ calculado a partir de los datos de las curvas de calibración mediante la ecuación 20 haciéndolo corresponder a tres veces y a seis veces para encontrar las señales correspondientes al límite de detección y de cuantificación respectivamente.

Las señales obtenidas se reemplazaron en las ecuaciones 25 y 26 para encontrar los valores que se registran en la tabla 18, los cuales indican las concentraciones de analito que se puede detectar y cuantificar mediante el método con un nivel de confianza dado.

Tabla 18. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación del método (LC)

	LD (ppm)	LC (ppm)
AMILOSA	0.54	3.14
AMILOPECTINA	17.08	22.63

⁷⁹ Ibid.

⁸⁰ MILLER, JC.; Op Cit. p.96 – 103.

Las pendientes de las curvas de calibración que se encuentran en las ecuaciones de la tabla 15 son valores bajos que están entre 0.0016 – 0.0199, lo cual indica que el método además, presenta una buena sensibilidad de calibrado.

4.3.2.3 Precisión

La precisión del método se estableció mediante la determinación de los parámetros repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad

Se evaluó empleando soluciones patrón de amilosa (30 ppm), amilopectina (70 ppm) y amilosa + amilopectina (30 + 70 ppm), medidas durante el mismo día, en intervalos cortos de tiempo (10 minutos), por el mismo operador, en el mismo equipo. Los resultados de las réplicas obtenidos para cada patrón se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Repetibilidad del método

	MEDIDA					PROMEDIO	DESV EST	CV	
	1	2	3	4	5				
Am (30 ppm)	29.84	29.89	29.87	29.87	29.89	29.87	0.020	0.067	
Ap (70 ppm)	70.12	70.89	69.83	69.14	68.89	69.77	0.799	1.145	
Am + Ap (30 + 70 ppm)	Am	29.40	29.34	29.31	29.35	29.32	29.34	0.035	0.119
	Ap	68.81	69.01	68.98	68.51	68.38	68.74	0.282	0.410

Las desviaciones estándar y los coeficientes de variación observados son bajos y no superan el 2%, lo cual permite afirmar que el método presenta repetibilidad.

Precisión Intermedia

Se determinó mediante la variación en la concentración de soluciones patrón de amilosa (30 ppm), amilopectina (70 ppm) y amilosa + amilopectina (30 + 70 ppm), medidas durante cinco días, por el mismo operador, en el mismo equipo, preparando cada día una solución nueva.

En las tablas 20 - 22 se muestran los resultados de las réplicas obtenidos para cada patrón durante los cinco días.

Tabla 20. Concentración de soluciones de amilosa medidas durante cinco días para calcular la precisión intermedia

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	TOTAL
PROMEDIO (ppm)	29.67	29.87	29.98	29.93	29.98	29.89
DESV EST	0.059	0.047	0.060	0.101	0.066	0.129
CV	0.199	0.157	0.200	0.337	0.220	0.432
% ERROR	1.10	0.43	0.07	0.23	0.07	0.37

Tabla 21. Concentración de soluciones de amilopectina medidas durante cinco días para calcular la precisión intermedia

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	TOTAL
PROMEDIO (ppm)	70.30	70.13	69.98	70.20	70.36	70.19
DESV EST	0.182	0.098	0.104	0.072	0.114	0.149
CV	0.259	0.140	0.149	0.103	0.162	0.212
% ERROR	0.43	0.19	0.03	0.26	0.51	0.27

Tabla 22. Concentración de soluciones de amilosa + amilopectina medidas durante cinco días para calcular la precisión intermedia

	PROMEDIO (ppm)		DESV EST		CV		% ERROR	
	Am	Ap	Am	Ap	Am	Ap	Am	Ap
Día 1	29.52	69.75	0.032	0.114	0.108	0.163	1.60	0.36
Día 2	29.61	69.83	0.030	0.121	0.101	0.173	1.30	0.24
Día 3	29.65	69.73	0.025	0.181	0.084	0.260	1.17	0.39
Día 4	29.64	69.80	0.051	0.161	0.172	0.231	1.20	0.29
Día 5	29.86	69.93	0.020	0.178	0.188	0.540	0.07	0.10
TOTAL	29.66	69.81	0.125	0.079	0.421	0.113	1.13	0.27

Considerando como criterio de confianza $CV < 5.0\%$ se observa que los valores tanto para las soluciones de patrones solos como para la mezcla de los dos, son inferiores al 1%, en cada uno de los días y al comparar el total de ellos, demostrando la precisión del método, ya que las mediciones realizadas a soluciones diferentes en días diferentes tienen concordancia.

Reproducibilidad

Se emplearon soluciones patrón de amilosa (30 ppm), amilopectina (70 ppm) y amilosa + amilopectina (30 + 70 ppm) medidas cada semana durante un mes, por el mismo operador, en el mismo equipo, preparando cada día una solución nueva. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 23 - 25.

Tabla 23. Concentración de soluciones de amilosa medidas durante cinco días para calcular la reproducibilidad del método

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	TOTAL
PROMEDIO (ppm)	29.89	30.31	30.25	30.31	30.24
DESV EST	0.046	0.032	0.032	0.056	0.203
CV	0.154	0.106	0.106	0.185	0.671
% ERROR	0.37	1.03	0.83	1.03	0.80

Tabla 24. Concentración de soluciones de amilopectina medidas durante cinco días para calcular la reproducibilidad del método

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	TOTAL
PROMEDIO (ppm)	70.29	70.23	70.26	70.05	70.21
DESV EST	0.093	0.141	0.062	0.101	0.108
CV	0.132	0.201	0.088	0.144	0.154
% ERROR	0.41	0.33	0.37	0.07	0.30

Tabla 25. Concentración de soluciones de amilosa+amilopectina medidas durante cinco días para calcular la reproducibilidad del método

	PROMEDIO (ppm)		DESV EST		CV		% ERROR	
	Am	Ap	Am	Ap	Am	Ap	Am	Ap
Semana 1	29.56	69.96	0.030	0.090	0.101	0.129	1.47	0.06
Semana 2	29.71	69.59	0.025	0.079	0.084	0.113	0.97	0.59
Semana 3	29.55	69.58	0.015	0.049	0.051	0.070	1.50	0.60
Semana 4	29.69	69.69	0.010	0.208	0.034	0.112	1.03	0.44
TOTAL	29.63	69.70	0.084	0.177	0.283	0.254	1.23	0.43

Al observar estos resultados se puede notar que existe reproducibilidad en el método, lo cual se ve reflejado en los coeficientes de variación que no superan el 2%, cuando se compara los valores de concentración obtenidos para soluciones patrón preparadas en épocas diferentes. Así mismo, los porcentajes de error calculados son inferiores al 2% y son más bajos cuando los compuestos se encuentran solos que cuando están en mezcla, sobre todo para la amilosa.

Al contrastar las concentraciones calculadas a partir de los patrones solos y en mezcla, también se puede apreciar que la concentración tanto de amilosa como de amilopectina disminuye un poco cuando se encuentran juntos que al estar separados y este comportamiento se conserva en los tres parámetros que determinan la precisión.

Además de las desviaciones estándar, coeficientes de variación y porcentajes de error, se realizaron pruebas estadísticas para la evaluación de la normalidad de los resultados, las cuales se muestran en el anexo 2. En éstas se puede observar que todos presentan una distribución normal.

4.3.2.4 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante la determinación del porcentaje de recuperación, adicionando a una solución de harina y a una de almidón de concentraciones de amilosa y amilopectina conocidas, cantidades también conocidas de una solución de 250 ppm de amilosa y de 500 ppm de amilopectina (tabla 4). Se calculó la concentración a las cantidades de patrón añadidas, a las muestras solas y a las muestras con adición de patrón. Los resultados obtenidos que se encuentran en la tabla 26 fueron reemplazados en la ecuación 23 (pág 32) para calcular los porcentajes de recuperación.

Los valores encontrados (tabla 26) empleando la muestra de harina fueron 96,98% y 98.21% para la amilosa y la amilopectina respectivamente y son semejantes a los obtenidos con el almidón que fueron 97.21% y 97.63% en el mismo orden. Con estos valores se encuentra que el porcentaje de recuperación promedio para la amilosa es de 97.10% y de 97.42% para la amilopectina lo cual representa porcentajes de error de 2.90% y 2.58% respectivamente.

Tabla 26. Porcentaje de recuperación promedio tomando como referencia una de las harinas y uno de los almidones analizados

		[] muestra (ppm)	[] añadida (ppm)	[] medida (ppm)	% RECUPERACIÓN	PROMEDIO	DESV EST	CV
H A R I N A	Am	8.13	4.97	12.61	96.26	96.98	0.662	0.683
			9.91	17.60	97.56			
			14.88	22.35	97.13			
	Ap	29.76	22.75	51.03	97.18	98.21	0.938	0.955
			37.30	66.02	98.45			
			51.85	80.80	99.01			
A L M I D Ó N	Am	12.50	4.97	16.93	96.91	97.21	0.346	0.356
			9.91	21.77	97.14			
			14.88	26.72	97.59			
	Ap	24.78	22.75	46.25	97.31	97.63	0.306	0.313
			37.30	60.63	97.66			
			51.85	75.04	97.92			

Además de las desviaciones y coeficientes de variación bajos que se pueden observar en la tabla 26, los porcentajes de error obtenidos permiten determinar que el método presenta buena exactitud.

4.3.3 Determinación de la concentración de amilosa y amilopectina en muestras.

Para la determinación del contenido de amilosa y amilopectina en las siete variedades de harinas y almidones se realizó el mismo tratamiento empleado para los patrones como se describe en la sección 3.5.3 (pág 33), los resultados obtenidos para las muestras que se analizaron se muestran en las tablas 27 y 28.

Considerando los resultados de la composición proximal que se encuentran en las tablas 8 y 9 (pág 40 y 43) se esperaba que la suma del contenido encontrado de amilosa y amilopectina coincidieran o fueran muy semejantes a los valores correspondientes a carbohidratos solubles en estos dos tipos de muestras, es decir, entre 92 y 95 % para harinas y por encima del 99% para almidones, ambos en base seca, sin embargo al realizar la sumatoria de los resultados estos valores se encuentran entre 87 y 93 % en almidones y 87 Y 91 % en harinas, observándose un mayor acercamiento en harinas que en almidones, contrario a lo

que se esperaba, de igual manera, se puede notar que aunque en almidones los valores totales son un poco más altos, no existe mucha diferencia entre ellos.

Tabla 27. Contenido de amilosa y amilopectina en los almidones de yuca (g/100 g de muestra seca)

MUESTRA	AMILOSA			AMILOPECTINA		
	PROMEDIO (%)	DESV EST	CV	PROMEDIO (%)	DESV EST	CV
CM 7595 - 1	20.99	0.093	0.443	66.96	0.690	1.030
SM 1495 - 5	20.27	0.072	0.355	67.74	0.392	0.579
CUMBRE 3	19.96	0.176	0.882	71.89	0.886	1.270
CM 7138 - 7	22.37	0.115	0.514	69.78	0.711	1.019
SM 707 - 17	20.90	0.227	1.086	71.02	0.869	1.224
MCOL 1522	22.38	0.172	0.768	68.81	0.587	0.853
SM 1498 - 4	21.95	0.195	0.888	70.67	0.888	1.256

Tabla 28. Contenido de amilosa y amilopectina en las harinas de yuca (g/100 g de muestra seca)

MUESTRA	AMILOSA			AMILOPECTINA		
	PROMEDIO (%)	DESV EST	CV	PROMEDIO (%)	DESV EST	CV
HCM 1	16.50	0.188	1.139	72.14	0.988	1.370
CM 7951 - 5	17.31	0.170	0.982	71.83	0.517	0.720
NATAIMA - 31	15.55	0.159	1.022	73.29	0.734	1.001
MPER - 183	16.66	0.156	0.936	72.46	0.581	0.802
MBRA - 383	17.94	0.113	0.630	71.27	0.862	1.209
CM 4574 - 7	17.87	0.086	0.481	73.07	0.533	0.730
CM 523 - 7	15.41	0.185	1.200	72.14	0.863	1.196

En cuanto a los resultados de los componentes por separado, las harinas presentan valores más altos de amilopectina que los almidones y ocurre lo contrario con el contenido de amilosa. Sin entrar a considerar el porcentaje de error que presenta el método, este comportamiento se puede deber al hecho de que posiblemente, en especial los almidones, (ya que son más susceptibles a ello) hayan alcanzado a sufrir procesos de hidrólisis durante su obtención, lo cual ya se había mencionado anteriormente al realizar el análisis de los valores de pH que se registraron (Tabla 10, pág 45).

Lo anterior sugiere que los almidones serán más apropiados para productos en los cuales se requiera propiedades como formación de complejos insolubles y de películas fuertes con mayor resistencia a la elongación y a la tracción, entre otras, las cuales las confiere la amilosa, mientras que las harinas lo serán para aquellas que requieren estos efectos no tan marcados propios de la amilopectina.

En cuanto al contenido de estos dos compuestos en almidones de yuca, que se encuentran entre 15 – 30 % para amilosa y 70 – 85 % para amilopectina, la amilosa se mantiene dentro de este rango tanto en harinas como en almidones, pero el contenido de amilopectina en algunos almidones no alcanza este intervalo, aunque como ya se explicó, los contenidos de estos dos compuestos y por ende sus propiedades pueden llegar a tener muchas diferencias de una variedad de yuca a otra.

Durante todo el desarrollo del método se trabajó con los patrones por separado y en mezcla con el fin de verificar la ley de aditividad de absorbancias de Beer, y en efecto aunque la adición no es exacta las diferencias coinciden aproximadamente con los porcentajes de error del método, lo cual se puede ver reflejado en las concentraciones, ya que se aprecia un comportamiento frecuente y es que al medir los patrones juntos disminuye un poco la concentración en comparación a la calculada para cada uno por separado, y al considerar este error hace que aumente un poco más el contenido real de los dos compuestos en las muestras.

Finalmente, en las muestras se observaron coeficientes de variación un poco más altos que en los patrones, pero nuevamente no llegan a superar el 2 %, confirmando así la precisión del método.

5. CONCLUSIONES

La composición proximal, el pH y las propiedades físicas determinadas para establecer el estado de las muestras, indican que en general, las muestras presentaron la composición y características propias que permiten establecer que a pesar de que su proceso de obtención no se encuentra totalmente tecnificado, son de buena calidad y aptos para su análisis.

Se consiguió estandarizar un método para la determinación de multicomponentes mediante la técnica espectrofotométrica de ultravioleta-visible que permitió cuantificar de forma simultánea amilosa y amilopectina empleando varias longitudes de onda, con parámetros de confianza que demuestran que existe una relación proporcional entre la concentración y la respuesta del equipo, con límites de detección y cuantificación aceptables, si se consideran las concentraciones que presentan el tipo de muestras para las cuales fue diseñado. Además, presentan distribución normal, niveles bajos de variación que no superan el 2% y porcentajes de error inferiores al 5%, que confirman que el método es preciso, exacto y apto para su aplicación en muestras.

Mediante la aplicación del método de análisis de multicomponentes estandarizado, fue posible cuantificar la amilosa y amilopectina presentes en harinas y almidones de yuca de forma fácil y rápida, con resultados confiables sin recurrir a métodos de verificación dispendiosos, costosos e inciertos, que incurren en un error al cuantificar uno de los dos componentes y asumir el otro como complemento del 100%.

Los porcentajes de amilosa y amilopectina encontrados en las muestras coinciden con los valores teóricos reportados para almidones de yuca y confirman que son aptas para los productos que se desean obtener a partir de ellas.

BIBLIOGRAFÍA

ALVIS, Armando. et al. Análisis fisicoquímico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de pastas. En: Información Tecnológica. No. 1. Vol. 19. 2008. p. 19 – 28.

ARYEE, F.N.A.; et al. The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. En: Food Control. No. 17. 2006. p. 916 – 922.

BEERRY, Kyle; LADISCH, Michael. Chemistry and properties of starch based desiccants. En: Enzyme and Microbial Technology. No. 28. 2001 p. 573 – 581.

BELLO PÉREZ, L. A.; et al. Amylopectin properties and fine structure. En: Food Chemistry. No. 2. Vol 56. 1996. p. 171 – 176.

BOLEY, N. y BURN, M.. The Determination of Starch in Composite Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography. En: Food Chemistry, No, 36, 1990. p. 45 – 51.

CABALLO, A. y LUQUE, M.. Fast microwave-assisted free sugars washing and hydrolysis pre-treatment for the flow injection determination of starch in food. En: Talanta, No. 59. 2003. p. 837 – 843.

CHANG, Peter; et al. Preparation and properties of glycerol plasticized-starch (GPS)/cellulose nanoparticle (CN) composites. En: Carbohydrate Polymers. No. 79. 2010. p. 301 – 305.

CHANG, Y.; ABD KARIM, A.; SEOW, C. Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. En: Food Hydrocolloids No. 20. 2006. p. 1 – 8.

CHAROENKUL, Nongnuch., et al. Simultaneous determination of amylose content and unit chain distribution of amylopectins of cassava starches by fluorescent labelling/HPSEC. En: Carbohydrate Polymers, No 65, 2006. p. 102 – 108.

CHEN, Ming-hsuan y BERGMAN, Christine. Method for determining the amylase content, molecular weights and weight- and molar-based distributions of degree of

polymerization of amylase and fine-structure of amylopectin.En: Carbohydrate Polymers. No 69, 2007. p. 562 – 578.

CHUNG, Yi-Lin; LAI, His-Mei.Preparation and properties of biodegradable starch-layered double hydroxide nanocomposites.En: Carbohydrate Polymers, No. 80. 2010. p. 525 – 532.

EBELL, L..Specific total starch determinations in conifer tissues with glucose oxidase.En: Phytochemistryvol 8, 1969. p.25 – 36.

FLORES, Silvia; et al. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. En: MaterialsScience and Engineering C. No. 30. 2010. p. 196 – 202.

GARCÍA, A.; et al. Caracterización fisicoquímica y funcional de las harinas de arracacha (*Arracaciaxanthorriza*) para sopas instantánea.En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. No. 5. Vol. 5. 2007. p. 384 – 393.

GÉRARD, C., et al. Amylose determination in genetically modified starches.En: Carbohydrate Polymers, No 44, 2001. p. 19 – 27.

GODBILLOT, L.; et al. Analysis of water binding in star plasticized films.En: Food Chemistry. No. 96. 2006. p. 380 – 386.

HERRERO, José; SCHOENMAKERS, Peter.yKOK, Wim.Determination of the amylase-amylopectin ratio of starches by iodine-affinity capillary electrophoresis.En: Journal of Chromatography, No. 1053, 2004. p.227 – 234.

HOOVER, H. Composition, molecular structure, and physicochemical properties tuber an root starches: a review. En: CarbohydratePolymers. No. 45. 2001. p. 253 – 267.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. NTC 1486, Documentación.Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación.Bogotá D.C.: El Instituto, 2008.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. NTC 4490, Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. Bogotá D.C.: El Instituto, 2008.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. NTC 5613, Referencias bibliográficas. Contenido, forma y estructura. Bogotá D.C.: El Instituto, 2008.

KICHICHIAN, Viviane; et al. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. En: LWT-Food Science and Technology. No. 43. 2010. p. 1088 – 1094.

McCLEARY, B.; SOLAH, V. y GIBSON, T.. Quantitative measurement of total starch in cereal flours and products. En: Journal of Cereal Science, No. 20, 1994. p. 51 – 58.

MOATES, G.; et al. Dynamic mechanical and dielectric characterization of amylose-glycerol films. En: Carbohydrate Polymers. No. 44. 2001. p. 247 – 253.

MOHAMMADKHANI, A.; SODDARD, F. y MARSHALL, D.. Survey of amylase content in *Secale cereale*, *triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T. tauschii*. En: Journal of Cereal Science, No 28, 1998. p. 273 – 280.

OSBORNE, D. y VOOGT, P.. Métodos de análisis de los nutrientes de los alimentos. Acribia S.A., España 1986. p 145 – 149.

OUIHIB, Rachid; et al. Biodegradable amylose-g-PLA glycopolymers from renewable resources. En: Carbohydrate Polymers. No. 77. 2009. p. 32 – 40.

PONGSAWATMANIT, Rungnaphar; THEERANAN, Tamsiripong; SUWONSICHON, Thongchai. Thermal and rheological properties of tapioca starch and xyloglucan mixtures in the presence of sucrose. En: Food Research International. No. 40. 2007. p. 239 – 248.

RENDLEMAN, Jacob. The reaction of starch with iodine vapor. Determination of iodide-ion content of starch-iodine complexes. En: Carbohydrate Polymers, No. 51, 2003. p. 191 – 202.

RODRÍGUEZ, Diana, et al. Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). En: Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. No. 34. Vol 2. 2005. p. 140 – 146.

ROMÁN, Alma; CASTILLO, Claudia. Evaluación de la calidad de harinas de diferentes variedades de cebada (*Hordeumsativum*Jess) cultivadas en los estados de Hidalgo y Tlaxcala. En: VII congreso nacional de ciencia de los alimentos y III foro de ciencia y tecnología de alimentos. (Guanajuato, México)

RUSSO, Melissa; et al. The anaerobic degradability of thermoplastic starch: Polyvinyl alcohol blend: Potential biodegradable food packaging material. En: Bioresorce Technology. No. 100. 2009. p. 1705 – 1710.

SALGADO, Pablo; et al. Biodegradable foams base don cassava starch, sunflower proteins and cellulose fibers obtained by a baking process.En: Journal of FoddEnginnering. No. 85. 2008. p. 435 – 443.

SZEPES, Anikó; et al. Microwave processing of natural biopolymers-studies on the properties of different starches.En: International Journal of Pharmaceutics. No. 302. 2005. p. 166 – 171.

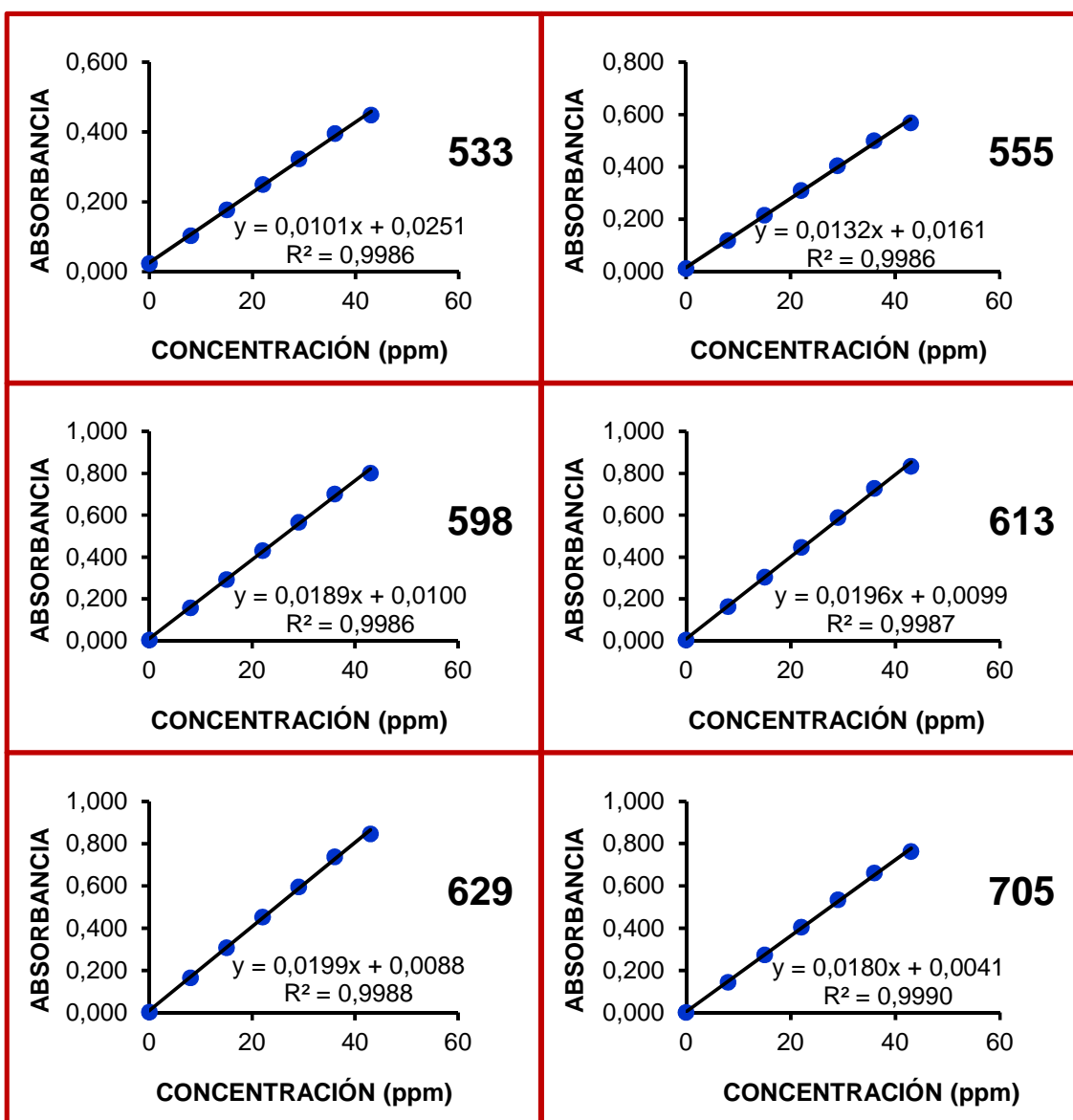
VILLADA, Héctor S.; ACOSTA, Harold A. y VELASCO, Reinaldo J. Investigación de almidones termoplásticos, precursores de productos biodegradables. En: Información Tecnológica, vol 19, No. 2, 2008. p.3 – 14.

WONG, Dominic. Química de los alimentos: mecanismos y teoría. Acribia S.A., España 1989. p.138 - 143.

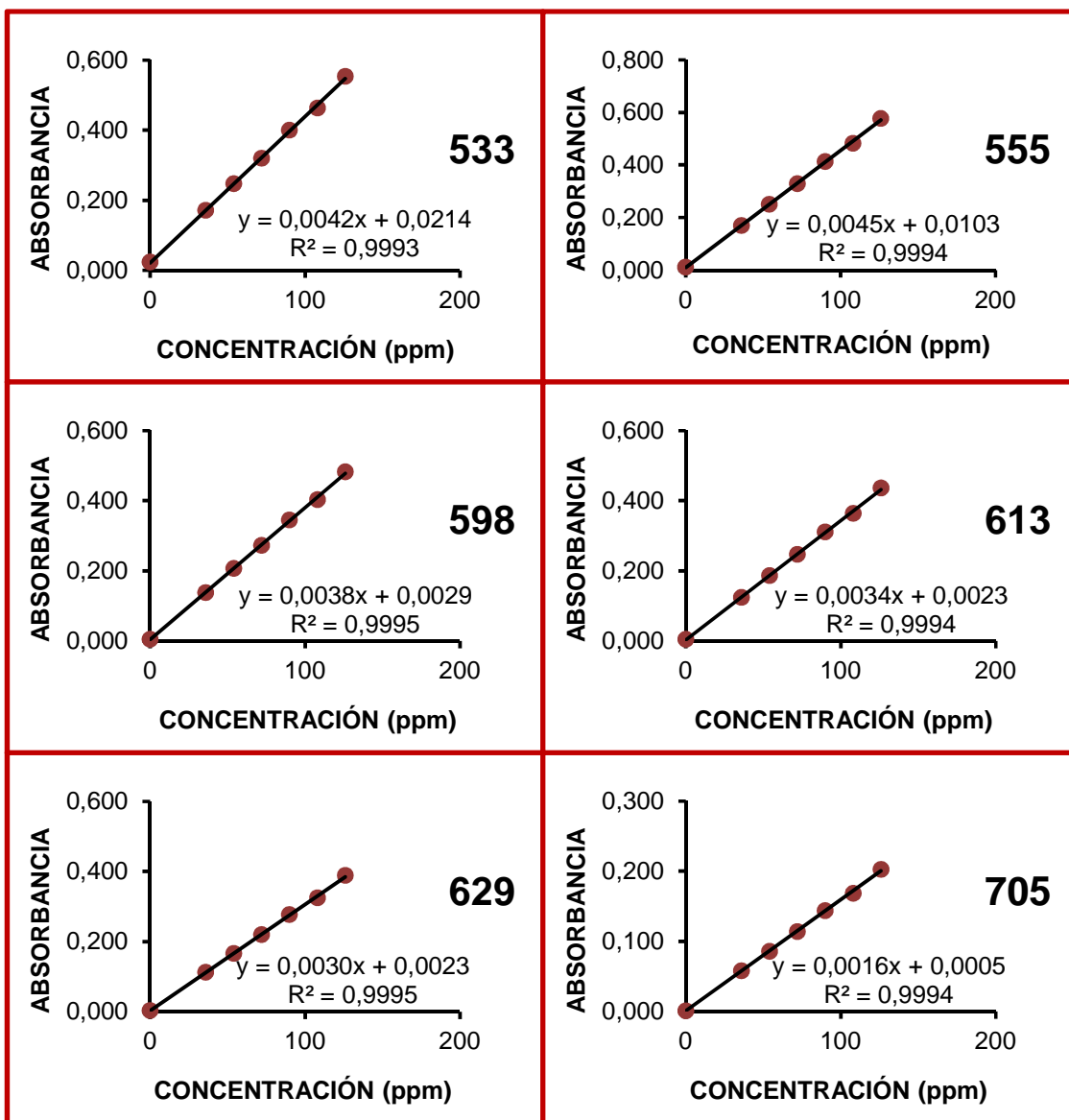
ANEXOS

1. CURVAS PARA LINEALIDAD

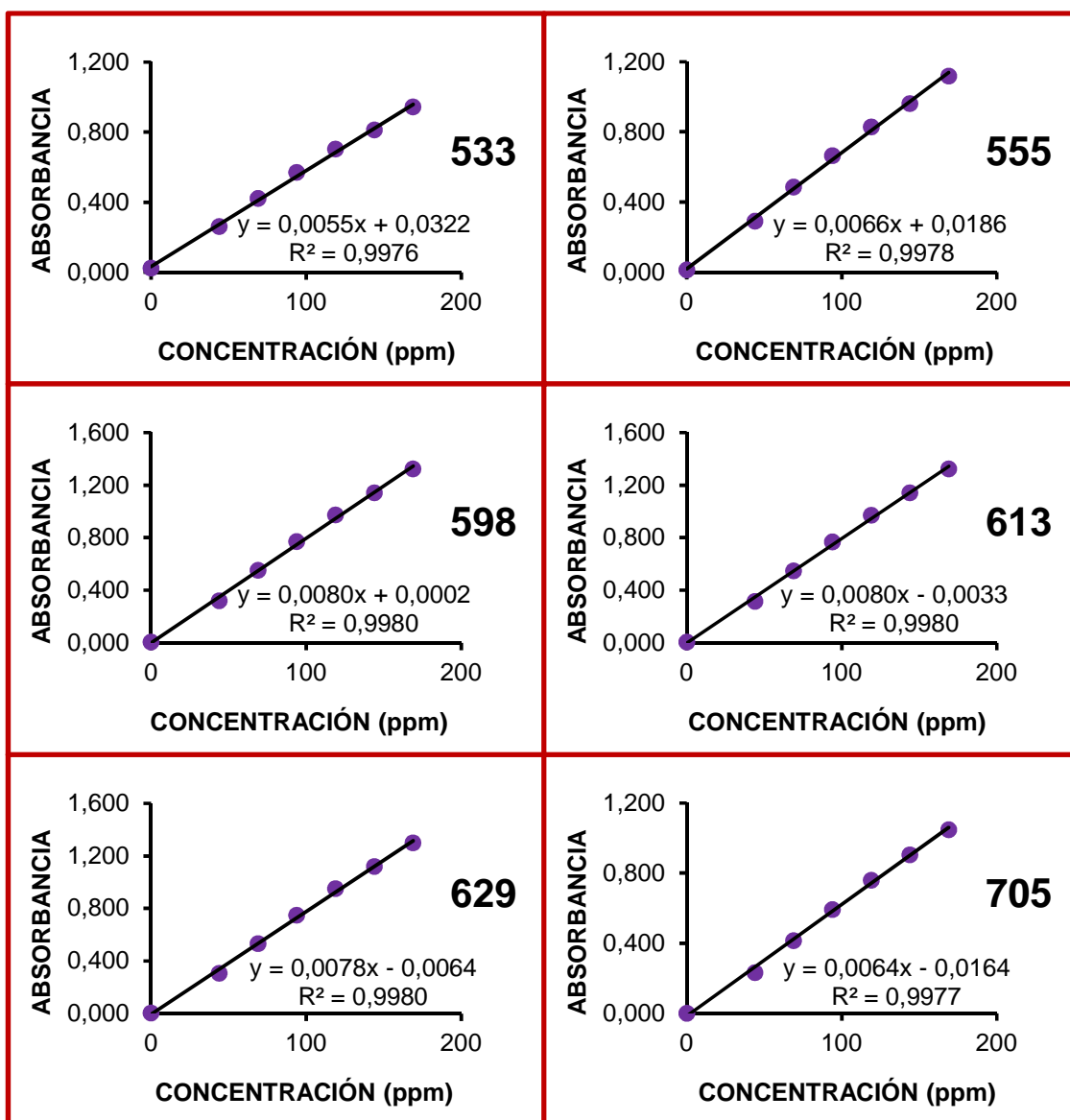
1.1 CURVAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR LA LINEALIDAD DEL COMPLEJO I_6 – AMILOSA A CADA LONGITUD DE ONDA



1.2 CURVAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR LA LINEALIDAD DEL COMPLEJO I₆ – AMILOPECTINA A CADA LONGITUD DE ONDA



1.3 CURVAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR LA LINEALIDAD DEL COMPLEJO I₆ – AMILOSA + AMILOPECTINA A CADA LONGITUD DE ONDA



2. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LOS DATOS DE PRECISIÓN

2.1 PRUEBA DE NORMALIDAD REALIZADA A LOS DATOS CON LOS QUE SE DETERMINÓ LA PRECISIÓN INTERMEDIA

Precisión Intermedia para compuestos separados	Día	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Amilosa 30 ppm	1	0,881	3	0,328
	2	0,907	3	0,407
	3	1,000	3	1,000
	4	0,971	3	0,672
	5	0,812	3	0,144
Amilopectina 70 ppm	1	0,818	3	0,157
	2	0,930	3	0,490
	3	0,923	3	0,463
	4	0,942	3	0,537
	5	0,855	3	0,253


Precisión Intermedia para mezcla	Día	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Amilosa 30 ppm	1	0,871	3	0,298
	2	0,964	3	0,637
	3	0,987	3	0,780
	4	0,949	3	0,567
	5	1,000	3	1,000
Amilopectina 70 ppm	1	0,855	3	0,253
	2	0,980	3	0,726
	3	0,878	3	0,317
	4	0,871	3	0,298
	5	0,915	3	0,433

2.2 PRUEBA DE NORMALIDAD REALIZADA A LOS DATOS CON LOS QUE SE DETERMINÓ LA REPRODUCIBILIDAD

Reproducibilidad para compuestos separados	Semana	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Amilosa 30 ppm	1	0,932	3	0,497
	2	0,871	3	0,298
	3	0,871	3	0,298
	4	0,976	3	0,702
Amilopectina 70 ppm	1	0,837	3	0,206
	2	0,989	3	0,797
	3	0,923	3	0,463
	4	0,971	3	0,672

Reproducibilidad para mezcla	Semana	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Amilosa 30 ppm	1	1,000	3	1,000
	2	0,987	3	0,780
	3	0,964	3	0,637
	4	1,000	3	1,000
Amilopectina 70 ppm	1	0,996	3	0,878
	2	0,893	3	0,363
	3	0,832	3	0,194
	4	0,932	3	0,497

3. NORMA INSTRUCTIVA PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DEL CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.

	NORMA INSTRUCTIVA LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Q.P.N. BICAMSA ASUBAGROIN	CODIGO
	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMILOSA Y AMILOPECTINA EN HARINAS Y ALMIDONES DE YUCA POR UV-VIS	EDICIÓN 1 Página 1 - 6

1. OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer los pasos a seguir para cuantificar de forma simultánea la amilosa y amilopeptina presentes en harinas y/o almidones de yuca mediante un método espectrofotométrico de cuantificación de multicomponentes que se basa en la formación de complejos con yodo.

2. ALCANCE

Esta norma aplica para harinas de yuca y almidones nativos y agrios de yuca recepcionadas en los laboratorios de los grupos de investigación Q.P.N., BICAMSA y ASUBAGROIN.

3. ASPECTOS GENERALES

La amilosa y la amilopeptina son los dos polisacáridos que componen el almidón, cuyas proporciones le confieren las características y propiedades que lo hacen útil para las diferentes aplicaciones que presenta-

Para el análisis y cuantificación de estos componentes existen diferentes métodos de los cuales, el más apropiado y que se aplica en la presente norma es el método espectrofotométrico del complejo con yodo.

La conformación en forma de elipse que presentan estos compuestos permite que en su interior se introduzcan moléculas de yodo, generando un complejo coloreado que se puede

cuantificar determinando la cantidad de luz que absorben, lo cual se realiza a sesí longitudes de onda diferentes, de tal forma que se obtienen resultados más confiables. Para cada longitud de onda se obtiene una ecuación que corresponde a la suma de los productos de los coeficientes de absorción molar y la concentración de cada compuesto, los cuales luego se relacionan mediante las ecuaciones 1 y 2 para obtener la concentración de cada compuesto en una muestra determinanda.

4. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO

Se parte de harinas y/o almidones de yuca homogéneos, previamente secos y desengrasados.

Condiciones de almacenamiento: Las muestras se deben almacenar en envase hermético y en un lugar seco para evitar su deterioro, en caso de que esto suceda las muestras deben desecharse.

5. CONTENIDO

5.1 Equipos

- Balanza analítica (0,0001g precisión)
- Balón aforado de 25 y 200 mL
- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro uv-vis.
- Espátula
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Frasco lavador
- Magneto
- Micropipeta 100- 1000 μ L
- pH-metro
- Pipeta aforada 5 mL
- Plancha de agitación
- Vaso de precipitados de 100 mL

5.2 Reactivos

- Acido clorhídrico concentrado (grado analítico 37 %, d = 1.19 g/mL)
- Dimetilsulfóxido (grado analítico 99.5%)
- Fosfato diácido de sodio (grado analítico)
- Fosfato dibásico de sodio (grado analítico)

- Hidróxido de Potasio (grado analítico 85 %)
- Patrón de amilopectina de papa
- Patrón de amilosa de papa
- Yodo (grado analítico resublimado)

5.3 Procedimiento

- *solución de KOH 5M:* Pesar 33 g de KOH al 85% de pureza y disolver con aproximadamente 50 mL agua destilada, cuando esté a temperatura ambiente llevar la solución a un balón aforado de 100 mL y completar el volumen con agua destilada.
- *Solución de HCl 4M:* Medir 33.1 mL de HCl al 37% de pureza y agregar aproximadamente 50 mL de agua destilada, cuando esté a temperatura ambiente llevar la solución a un balón aforado de 100 mL y completar el volumen con agua destilada.
- *Solución Buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0:* Pesar 0.69 g de fosfato diácido de sodio (NaH_2PO_4), disolver en aproximadamente 50 mL agua destilada y medir el pH con un pH-metro, en un recipiente aparte disolver aproximadamente 3 g de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) en 10 mL de agua destilada y agregar poco a poco esta solución sobre la anterior hasta que el pH de la solución sea 7.0, luego llevarla a un balón aforado de 100 mL y completar el volumen con agua destilada
- *Solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) 85%:* Medir 85.4 mL de DMSO al 99.5% de pureza y agregar aproximadamente 10 mL agua destilada, cuando esté a temperatura ambiente llevar la solución a un balón aforado de 100 mL y completar el volumen con agua destilada.
- *Tratamiento de las muestras para la cuantificación.*
 - Pesar 50 mg de muestra seca y desengrasada, agregar 1 mL de agua destilada y agitar constantemente.
 - Agregar lentamente y con agitación fuerte 4 mL de KOH 5M.
 - Mantener en agitación moderada durante 1 hora.
 - Neutralizar la solución con HCl
 - Filtrar al vacío realizando varios lavados que no sobrepasen los 200 mL.
 - Agregar 8 mL de solución buffer fosfato de sodio 0.1M pH 7.0 y aforar a 200 mL con agua destilada
 - Tomar una alícuota de 5 mL y agregar 1 mL de solución buffer fosfato de sodio 0.1M pH 7.0.

- Agregar 500 μL de solución de Yodo 0.2 % en DMSO 85% y aforar a 25 mL con agua destilada.
- Agitar y esperar 15 min.
- Leer la absorbancia simultáneamente a 533, 555, 598, 613, 629 y 705 nm antes de que 1 hora después de haber agregado la solución de yodo.
- Este procedimiento debe realizarse por triplicado a cada muestra.

- *Curva de calibración de Amilosa y Amilopectina*

- Teniendo en cuenta el tratamiento descrito para las muestras, se preparan soluciones patrón de 250 ppm de Amilosa y 500 ppm de Amilopectina, a partir de las cuales se toman los volúmenes necesarios para preparar una curva de calibración con concentraciones de 8,15, 22, 29, 36 y 43 ppm de Amilosa y de 36, 54, 72, 90, 108 y 122 ppm de Amilopectina y una compuesta por la suma de las concentraciones de los dos patrones. Cada punto de las tres curvas se lee por triplicado a cada longitud de onda, estas absorbancias se promedian y se grafican versus la concentración de cada patrón.

5.4 Cálculos

Las absorbancias de las soluciones se introducen en la hoja de cálculos de Excel anexa, diseñada para realizar el cálculo de la concentración de amilosa y amilopectina en la solución, en ella se han introducido los cálculos correspondientes a las ecuaciones 1 y 2

$$C_{Am} = \frac{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})_{\lambda i} \sum(A\varepsilon_{Ap})_{\lambda i}] - [\sum(A\varepsilon_{Am})_{\lambda i} \sum(\varepsilon_{Ap})_{\lambda i}^2]}{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})]^2 - [\sum(\varepsilon_{Ap})^2 \sum(\varepsilon_{Am})^2]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$C_{Ap} = \frac{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})_{\lambda i} \sum(A\varepsilon_{Am})_{\lambda i}] - [\sum(A\varepsilon_{Ap})_{\lambda i} \sum(\varepsilon_{Am})_{\lambda i}^2]}{[\sum(\varepsilon_{Am}\varepsilon_{Ap})]^2 - [\sum(\varepsilon_{Ap})^2 \sum(\varepsilon_{Am})^2]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde

- A: Absorbancia de la muestra a la longitud de onda λ_i .
- C_{Am} : Concentración de amilosa.
- C_{Ap} : Concentración de amilopectina.
- ε_{Am} : Absortividad molar de la amilosa.

ϵ_{Ap} : Absortividad molar de la amilopectina.

Los coeficientes de absorción para los complejos de amilosa y amilopectina a cada longitud de onda son:

		LONGITUD ONDA(nm)					
		533	555	598	613	629	705
COEFICIENTE DE ABSORCIÓN ((mg/mL) ⁻¹)	Am	10.21	13.42	19.23	19.98	20.24	18.15
	Ap	4.14	4.42	3.75	3.38	3.02	1.58

6. BIBLIOGRAFÍA

Esta norma está basada en:

JARVIS, C.; WALKER, J..Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin.Journal of Cereal Science and Food Agriculture, No 63. 1993. p.89–92.

SÉNE, M.; THÉVANOT, C. y PRIOUL, L..Simultaneous spectrophotometric determination of amylose amylopectin in starch from maize Kernel by multiwavelengthanalysis.Journal of Cereal Science, No 26. 1997. p.211–221.

HARRIS, Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona, 2007. p.409 - 436.

4. HOJA DE CÁLCULO DE EXCEL PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LA RESPUESTA DEL EQUIPO EN CONCENTRACIÓN DE AMILOSA AMILOPECTINA.

	1	2	3	EAm	EAp	EAmEAp	EAm ²	EAp ²	AEm	AEp	AEmAEm	AEmAEp	AEmAEm	AEmAEm
533	0	0	0	10,21	4,15	42,32	104,24	17,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
555	0	0	0	13,42	4,42	59,34	180,10	19,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
598	0	0	0	19,23	3,75	72,13	369,79	14,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
613	0	0	0	19,98	3,38	67,49	399,20	11,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
629	0	0	0	20,24	3,02	61,21	409,66	9,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
705	0	0	0	18,15	1,58	28,68	329,42	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Σ				101,23	20,30	331,17	1792,41	73,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

	1	2	3
CAm	0,0000	0,0000	0,0000
Cap	0,0000	0,0000	0,0000

	1,2,3
PROMEDIO	AM 0,000
	AP 0,000
DESVEST	AM 0,000
	AP 0,000
CV	AM #DIV/0!
	AP #DIV/0!

Fuente: Autor

5. OTROS OBJETIVOS ALCANZADOS

PRESENTACIÓN DE POSTER

“Determinación de amilosa y amilopectina en almidones nativos del cauca”

VIII Encuentro de la Red Nodal de Semilleros de Investigación del Cauca

Popayán, Cauca. 20 y 21 Mayo/2009

“Cuantificación de amilosa y amilopectina en harinas y almidones de yuca
(*Manihot esculenta Crantz*)”

XXIX Congreso Latinoamericano de Química, XVI Congreso Colombiano de
Química y VI Congreso Colombiano de Cromatografía

Cartagena de Indias, Bolívar. 27 Septiembre a 1 Octubre/2010

PONENCIA ORAL

“Determinación de amilosa y amilopectina en almidones nativos del cauca”

XII Encuentro Nacional y VI Internacional de Semilleros de Investigación

Bogotá, Cundinamarca. 8 a 11 Octubre/2009