

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Extracción de Almidón de la Cáscara de Musa Spp y
Desarrollo de un Método para su Cuantificación.**

Proyecto de Investigación

María Fernanda Ayala Cobos

Ingeniería Química

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Química

Quito, 21 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
Colegio de Ciencias e Ingenierías

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Extracción de Almidón de la Cáscara de Musa Spp y Desarrollo de
un Método para su Cuantificación.**

María Fernanda Ayala

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Juan Diego Fonseca, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 21 de diciembre de 2016

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María Fernanda Ayala Cobos

Código: 00107411

Cédula de Identidad: 1715245989

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2016

RESUMEN

Este trabajo el desarrollo de un método de laboratorio de cuantificación de almidón extraído de la cáscara de musa spp que sea económicamente factible, efectivo y fácilmente reproducible. La extracción se trabajó dentro de distintos parámetros de pH, temperatura, tiempo y tratamiento de la materia prima, asegurando la recuperación más alta comparada con valores teóricos de cantidad de almidón en la cáscara de musa spp. La relevancia del estudio se basa en dar uso a desechos de la mayor industria agrícola del Ecuador, generando productos con valor agregado y aportando hacia la disminución del consumo local de plásticos derivados del petróleo. El almidón de extracción fue modificado para cumplir con los requerimientos para su cuantificación, el método no se ajustó a éste tipo de almidón, sin embargo, para almidones nativos si es aplicable. La recuperación en masa más eficiente se obtiene cuando se realiza un secado de las cáscaras de plátano verde, previo a la extracción.

ABSTRACT

This investigation presents the development of an economically viable, effective and easy method for the quantification of starch extracted from the peel of *Musa* spp. The extraction was controlled using different parameters such as pH, temperature, time and pretreatment of the raw material. This was done to obtain the highest yield of starch recovered. The peel of *Musa* spp is one of the biggest wastes of the agroindustry of Ecuador giving this study great importance. The goal is to obtain a product of added value from the extracted starch. Starch can be used as substitute for petroleum made plastics, which will in turn minimize their local consumption. The starch recovered from the extraction process was modified to meet the requirements for its quantification. The method of quantification worked for native starch but did not work for modified samples. The most efficient recovery process of starch was achieved from dried peels.

1. Introducción.....	7
2. Método Experimental.....	11
3. Resultados.....	17
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	31
5. Referencias Bibliográficas	34
6. Anexos.....	37

1. Introducción

1.1.Plásticos

Los plásticos tienen una amplia aplicación tanto industrial como del día a día, se han convertido en un producto de uso diario y cotidiano, de bajo costo para el consumidor. Los plásticos son materiales producidos a partir de derivados del petróleo tales como la nafta o el gas natural [1]. Entre los años 1976 y el 2012 la producción mundial de petróleo incrementó en 14%. Si bien en los últimos años se ha visto un crecimiento relativamente pequeño de aproximadamente 3% anual, la cantidad producida es de casi 300 millones de toneladas al año [2]. En el Ecuador durante el año 2014 hubo un incremento en producción del 11%, correspondiente a un total de 382 000 toneladas de plástico [3].

Con el aumento en producción y consumo de plásticos, la contaminación relacionada a estos también ha ido en aumento. Uno de los principales problemas que usan como materia prima el petróleo, el cual es un combustible fósil no renovable, y su obtención y procesamiento es altamente contaminante [4]. Las principales consecuencias negativas de la producción de plásticos, desde la extracción de su materia prima hasta su desecho, son: deforestación para creación de infraestructura de los pozos petroleros; daño al suelo, agua y atmósfera por emisiones no controladas o derrames; erosión del suelo; generación de gases invernadero, y la acumulación de desechos en suelos y agua [5]. Una vez desechados, los restos del plástico pasan por un proceso de degradación prolongado dependiendo del tipo de plástico, tarda entre 100 y 1000 años en descomponerse, generando una acumulación de desechos que no se ha podido controlar de forma eficaz [6].

Para disminuir los efectos adversos que ocasiona la industria petrolera se busca fuentes de energías alternativas que sean renovables y causen un menor impacto

medioambiental. De la misma manera, se buscan métodos alternativos de manufactura de plásticos, o la creación de materiales que tengan características similares y usen materias primas renovables [7].

1.2. Bioplásticos

La producción de bioplásticos es una prometedora alternativa a la industria de plásticos actual. Para que un material sea considerado un bioplástico debe cumplir al menos una de estas dos características: estar hechos a partir de biomasa, o ser biodegradables [8]. El término biomasa se refiere a cualquier material o fuente energética que provenga de origen orgánico [9]. Se pueden dividir a los bioplásticos en tres categorías: primero están aquellos hechos a base de biomasa que no son biodegradables o son parcialmente biodegradables; el segundo grupo es de los bioplásticos que son hechos a base de biomasa y también son biodegradables y, por último, están aquellos que son hechos a base de combustibles fósiles, pero son completamente biodegradables [10].

Es posible afirmar que todos los plásticos existentes actualmente son degradables a partir del hecho de que se pueden romper en pedazos más pequeños; incluso hasta llegan a tamaños microscópicos y, sin embargo, nunca desaparecen completamente [11]. En contraste, los plásticos biodegradables son aquellos que pueden ser degradados en un periodo corto por microorganismos que los convierte en materiales útiles para su medio: dióxido de carbono, metano, agua biomasa y algunos compuestos inorgánicos [10]. Los bioplásticos se están convirtiendo en una alternativa para obtener productos con características similares o inclusive mejores a la de los plásticos convencionales. Una de las mayores ventajas de la producción de bioplásticos frente a la producción de plásticos es la disminución de la huella de carbono del proceso, debido

a que los bioplásticos no usan combustibles fósiles como materia prima [12]. Dada la facilidad de degradación de los bioplásticos y su uso en aumento, estos permitirán que haya una menor acumulación de desechos permanentes en el medio ambiente. Su producción aumenta de manera acelerada; para el año 2012 se estima que se produjeron 300 millones de toneladas de bioplásticos mundialmente [13].

1.3.Plátano Verde

La producción de plátano verde (*Musa spp*) es una de las agroindustrias de mayor importancia dentro del Ecuador, con una producción anual de aproximadamente 560 mil toneladas. Consecuentemente la industria del plátano genera 7 millones de toneladas de desechos por año, los mismos que consisten principalmente de tallos y cáscaras, los cuáles en su mayoría contienen celulosa, lignina, almidón, hemicelulosa y pectina [14] [15]. Actualmente, estos desechos se usan como material para abono de tierra y no tienen ningún fin como producto con valor agregado que pueda servir dentro del mercado. La cáscara del plátano verde está compuesta de aproximadamente 12% en masa de almidón, que puede ser usado como materia prima para la creación de bioplásticos [16].

1.4.Métodos de extracción de almidón

La extracción de almidón de distintos vegetales y tubérculos se ha realizado desde hace muchos años y, los métodos de extracción se han ido modificando hasta lograr extracciones eficientes que puedan ser aplicadas a nivel industrial. Solamente a partir del almidón extraído de la papa, se obtienen alrededor de 3 millones de toneladas anualmente [17]. Existen varias investigaciones enfocadas en extraer almidón de la fruta del plátano verde, pero muy pocas sobre la extracción a partir la cáscara, por ejemplo, existe un estudio que se enfoca en la extracción de almidón de la pulpa del

plátano Dominico Hartón, donde realizan dos tipos de extracciones en húmedo y en seco, siguiendo procesos similares para ambas y obteniendo resultados distintos [18]. Para poder realizar la extracción en seco es importante considerar el contenido de humedad del plátano verde, que es de alrededor del 83% en masa [19].

1.5. Métodos de cuantificación de almidón

Existen distintos métodos cualitativos para poder determinar si una muestra contiene o no almidón. Esto se basa principalmente en el complejo lugol-amilosa creado cuando se agrega solución de lugol (0.5 g de yoduro de potasio y 1 g de yodo en 100 ml de agua destilada); a una muestra de almidón diluida [20]. Con el fin de contar con un método cuantitativo muchos estudios se han dedicado a usar la relación entre el yodo y el almidón como un método colorimétrico que puede ser leído en un espectrofotómetro en una longitud de onda de 620 nm, sin embargo, son estudios antiguos y poco precisos [21]. En el intento por mejorar éste tipo de método, varios investigadores han agregado al almidón componentes como hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, entre otros, antes de añadir el lugol [22]. Una vez realizada ésta mezcla, debe existir algún tipo de estándar que permita comparar los resultados de las muestras con concentraciones de almidón ya conocidas. Para poder obtener ésta relación, se debe hacer referencia a la ley de Beer, la cual describe la relación entre la capacidad de absorción de un compuesto en solución y la concentración presente del mismo. La ley de Beer permite tener una relación lineal entre ambos, lo que provee una curva de calibración estándar para los procedimientos que midan la capacidad de absorción de sus muestras [23]. Todos estos métodos han demostrado ser poco precisos y complicados para aplicar de manera estandarizada. Es por éste motivo, que en los últimos años se han creado kits enzimáticos para tener una determinación más exacta de almidón [24].

1.6.Objetivos

Ésta investigación tiene como objetivos principales el desarrollar un método de cuantificación del almidón extraído que sea de bajo costo, efectivo, y fácilmente reproducible, y maximizar la extracción de almidón de las cáscaras de Musa spp.

Para poder cumplir el primer objetivo, se deberá calibrar el método de cuantificación, blanquear el almidón de extracción, y verificar el método mediante comparación con un método estandarizado. La maximización de la extracción se logrará al preparar la muestra para asegurar una extracción sencilla y eficiente del almidón; se deberá determinar las condiciones óptimas de tipo de muestra, pH, temperatura, y tiempo para la extracción de almidón.

2. Método Experimental

2.1.Materiales, Equipos y Reactivos

Para el proceso de secado se usa una estufa marca Precisión. Los plátanos se obtienen de un mismo proveedor, procurando mantener uniformidad. Se usa una balanza Ohaus para el pesado de todos los materiales.

Para el proceso de molienda se usa un molino Thomas Scientific existente en el laboratorio de Ingeniería Química. Para la etapa de tamizado se usa el tamiz marca Automation. Como equipo de agitación se usa una manta de agitación y calentamiento de Fisher Scientific, termómetro para controlar la temperatura y papeles indicadores de pH. Para el proceso de filtración se usa una malla de nylon con poros que permiten el paso del almidón y otras partículas pequeñas. Para el secado eficiente de las muestras

de extracción se usa vidrios de reloj. En el proceso de cuantificación se utiliza el espectrofotómetro marca Spectronic 20D+ y el polarímetro Linos. Para las mediciones del kit enzimático se usó el espectrofotómetro UV Visible.

En los procesos de extracción, clarificación, y cuantificación se usan soluciones de NaOH y HCl 0.1 M para la extracción y 0.4 M para la clarificación. Para el último paso de la clarificación se usa hipoclorito de sodio al 5.35%. Para el proceso de cuantificación se utiliza una solución de Lugol que consta de 0.5g de yoduro de potasio con 1 g de yoduro, disueltos en 100mL de agua destilada.

2.2. Método de Preparación de Muestras

En la figura 1 se presenta un diagrama de bloques que ilustra el método para cada tipo de muestra, el mismo que se detalla a continuación.

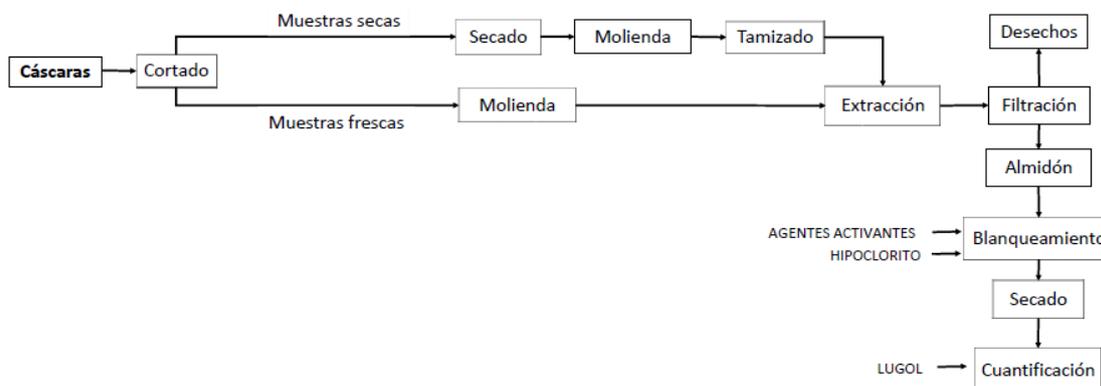


Figura 1. Método experimental

2.2.1. Muestras secas

2.2.1.1. Secado

El proceso de secado de la cáscara de plátano debe asegurar una máxima disminución de contenido de humedad sin dañar la materia prima, un consumo moderado de energía, y material final que sea fácilmente manipulable para las consiguientes partes del proceso. Para poder determinar las condiciones óptimas, se trabaja dentro de ciertos rangos con cada variable experimental. En el caso de la temperatura se usa temperaturas de 60,70 y 90°C. El tiempo de secado varía entre 6,7 y 8 horas. El tipo de corte que se realiza a las cáscaras previo al secado puede ser longitudinal, transversal, o una mezcla de ambos tipos de corte. Finalmente, se debe probar el secado con distintas cantidades de cada muestra (100, 200 y 300 gramos). En las siguientes tablas se presentan los parámetros para el secado.

Tabla 1. Diseño de experimentos de secado con distintas temperaturas.

Tiempo [h]	6	7	8
Temperatura [°C]	60	60	60
	70	70	70
	90	90	90

Tabla 2. Diseño de experimentos de secado con distintos tipos de corte.

Tiempo [h]	6	7	8
Corte	Longitudinal	Longitudinal	Longitudinal
	Transversal	Transversal	Transversal
	Mixto	Mixto	Mixto

Tabla 3. Diseño de experimentos de secado con distintas cantidades de muestra.

Tiempo [h]	6	7	8
Cantidad [g]	100	100	100
	200	200	200
	300	300	300

2.2.1.2. Molienda y Tamizado

Para el proceso de molienda se trabaja con un molino Thomas Scientific 3383 está equipado con tamices con aperturas de 2, 4, y 6 μm . El objetivo de la molienda es que las cáscaras ya secas puedan ser molidas hasta llegar todas a un tamaño de partícula que favorezca una extracción eficiente. Para poder determinar las condiciones óptimas se realizaron pruebas con cada tamiz e incluso sin el uso de uno. La molienda no genera un tamaño de partícula homogéneo por lo que es necesario una etapa de

tamizado. El tamizado óptimo debe asegurar que la mayor parte del material tenga un tamaño de partícula menor a 2 milímetros.

2.2.2. Método muestras frescas

Para la obtención de una pulpa a partir de las cáscaras de plátano frescas, éstas deben molerse en húmedo. La cantidad de agua en relación a la masa total aplicada en éste estudio es de aproximadamente 4:1.

2.2.3. Extracción

El procedimiento de extracción del almidón es el mismo, tanto para muestras de cáscara fresca, así como para muestras de cáscara secadas. Se realiza la extracción bajo las siguientes variables y en los siguientes rangos para optimizar al máximo el proceso: tiempo de agitación 10, 20 y 30 minutos; pH que sea en su condición inicial, neutro, ácido y básico; temperatura 15, 25 y 45°C. Al finalizar la extracción se filtra el material y el almidón precipita en el agua de filtrado. Se deja en reposo durante 24 horas para retirar el agua, y el almidón extraído pasa a un proceso de secado.

En la tabla 4 se presenta el diseño de experimentos usado para los distintos parámetros de extracción.

Tabla 4. Parámetros de extracción, con tiempo como variable de comparación.

Tiempo [min]	10	20	30	Tiempo [min]	10	20	30
Temperatura [°C]	15	15	15	pH	inicial (5)	inicial (5)	inicial (5)
	25	25	25		3	3	3

	45	45	45		7	7	7
	-	-	-		9	9	9

2.2.3.1. Análisis del contenido de almidón

Se probaron distintos métodos de cuantificación del almidón en las muestras extraídas.

1. Polarímetro

En este proceso se usó el método INEN 524 del año 1981, ver anexo 1 [25].

2. Espectrofotómetro

Para que éste método tenga un funcionamiento correcto se debe blanquear la muestra obtenida de la extracción. Indistintamente del método de blanqueamiento, se realiza una disolución de cada muestra de 1:10 o 1:20, de acuerdo a la curva de calibración utilizada. Se agregan 1 o 2 gotas de la solución de lugol e inmediatamente se realiza la lectura en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 620 nM. A continuación, se presentan los distintos métodos de blanqueamientos probados.

Blanqueamiento

- a. Agentes activantes: hipoclorito, peróxido, ácido acético, ácido fosfórico y alcohol etílico. Se usa 5 mL de cada reactivo en una cantidad aproximada de 1 g de muestra. Se deja reposar durante 24 horas y se pasa al proceso de lavado del reactivo. Finalmente, se agrega hipoclorito

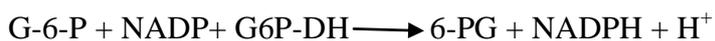
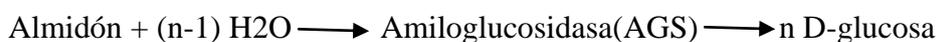
de sodio, dejando en reposo durante 2 horas. Nuevamente, se lava la muestra y se deja secar el sedimento.

- b. Modificación del pH: Se realiza una dilución en relación de 1:5 muestra en agua destilada. Se agrega NaOH 0.4M hasta llegar a un pH de 9 y posteriormente HCl 0.4M hasta llegar a pH neutro. Se agrega hipoclorito de sodio y se pasa al proceso de decantación y finalmente secado.

3. Kit enzimático

Se realizan pruebas en condiciones óptimas de extracción con el kit enzimático de la empresa alemana R-Biopharm, *ENZYTECH Starch*. El kit funciona con método UV, una longitud de onda de 340nm, y un volumen de muestra de 2.320mL.

El principio bajo el cual funciona el kit es el siguiente:



Para la preparación de muestra se usó entre 70 microgramos y 1 gramo de almidón. El kit consta de tres reactivos que ayudan al funcionamiento enzimático correcto. Ver anexo 2 para referencia del procedimiento exacto.

3. Resultados

3.1. Resultados extracción en seco

3.1.1. Secado, molienda y tamizado

La primera variable con la que se trabajó fue el tiempo de secado a 90°C, usando 100 g de muestra y corte longitudinal. La selección de éstas variables fue aleatoria. En la figura 2 se presentan los resultados de pérdida de humedad de las cáscaras después de diferentes tiempos de secado.

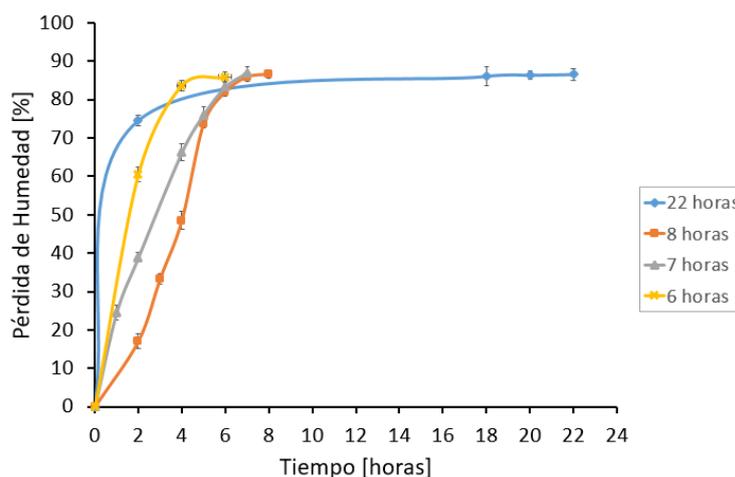


Figura 2. Efecto del tiempo en el secado de las cáscaras de Musa spp.

La figura indica que a partir las 7 horas no hay un cambio de más del 0.3% en masa de pérdida de humedad. Se trabajó hasta un tiempo de 22 horas para poder asegurar éste resultado. A partir de ésta información se determinó que el tiempo óptimo de secado que a ser usado como variable independiente es de 7 horas. Los resultados obtenidos para las demás variables se presentan a continuación. En la figura 3 se tiene la gráfica para una cantidad de 100 gramos de muestra.

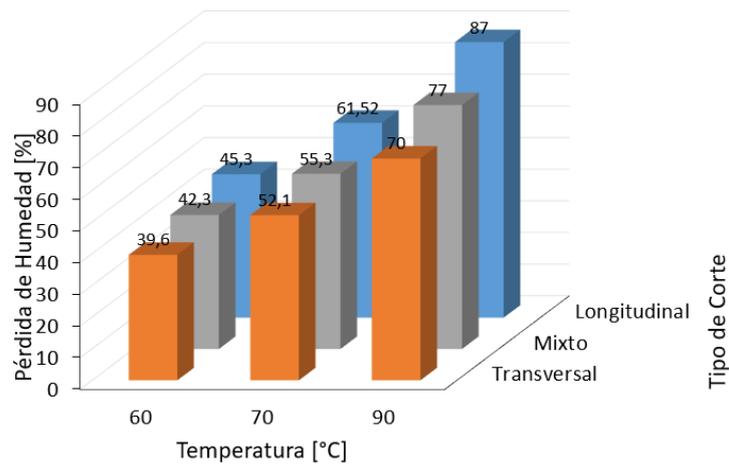


Figura 3. Efecto de las distintas variables de secado en una muestra de 100 gramos.

Para una cantidad de 200 gramos de muestra se presentan los resultados en la figura 4.

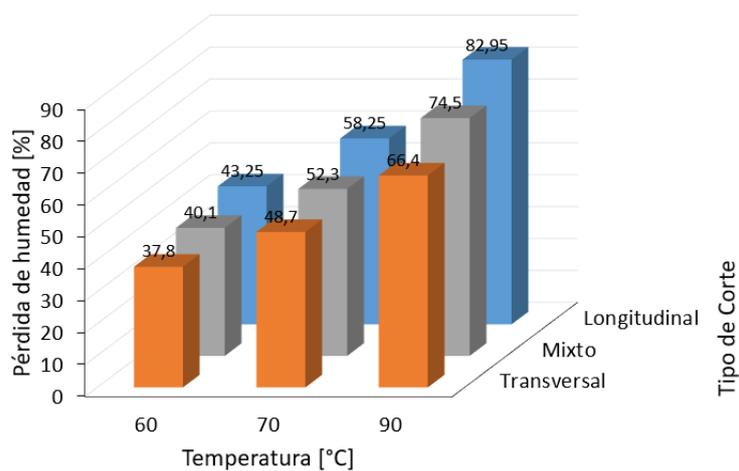


Figura 4. Efecto de las distintas variables de secado en una muestra de 200 gramos.

Como última variable de cantidad se tiene la figura 5 la cual representa los resultados para una muestra de 300 gramos.

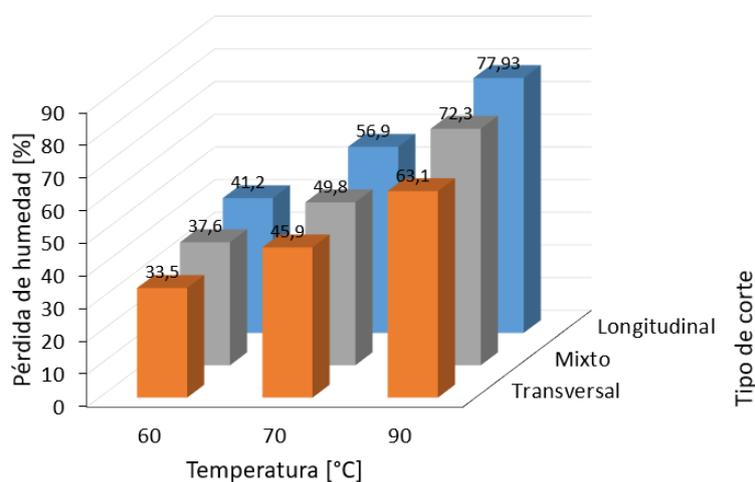


Figura 5. Efecto de las distintas variables de secado en una muestra de 300 gramos.

Finalmente, en la tabla 5 se presentan las condiciones para un secado que tenga una pérdida de humedad de alrededor del 87% en masa, que es el valor máximo que se obtuvo de pérdida en 7 horas y el valor más aproximado a contenido de humedad encontrado en la literatura.

Las gráficas muestran la tendencia a tener una menor pérdida de humedad al trabajar con una cantidad mayor de muestra. Consecuentemente, se seleccionan como condiciones óptimas un peso de muestra de 100 gramos, temperatura de secado de 90°C, corte longitudinal y un tiempo de secado de 7 horas.

Tabla 5. Condiciones óptimas para el secado de las cáscaras de *musa spp.*

Variable	Condición óptima
Temperatura [°C]	90
Tipo de corte	Longitudinal
Cantidad de muestra [g]	100
Tiempo [h]	7

Una vez concluido el secado, se procedió al proceso de molienda. Primero se realiza sin tamiz para obtener una primera disminución de tamaño de partícula. Se molió nuevamente el material pasado con un tamiz de tamaño 2.0 um, obteniendo así la mayor reducción de tamaño. El proceso de molienda tiene un porcentaje de pérdida de masa de aproximadamente el 5,74% debido a la funcionalidad del equipo. Para el tamizado se procede a eliminar solamente el material que queda en la malla de 2 mm. Después de retirar éste material se tiene una pérdida del 18% en masa adicional a la pérdida ocasionada por el proceso de molienda. Estos valores indican que al finalizar el proceso de molienda y tamizado existe una pérdida total del 23,31% en masa en relación con la cantidad de material que se inicia después del proceso de secado.

3.1.2. Método de cuantificación Amilosa

Polarímetro

Se realizó una curva de calibración usando almidón comercial de maíz. Se usaron concentraciones desde 0.5% hasta 3%; las concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 estaban por debajo del rango de detección del polarímetro, por lo que se incluyeron en la gráfica con un valor de lectura de 0. A partir de la concentración del 3% se obtiene una medida de rotación. En la figura 6 se presentan los resultados de la curva de calibración.

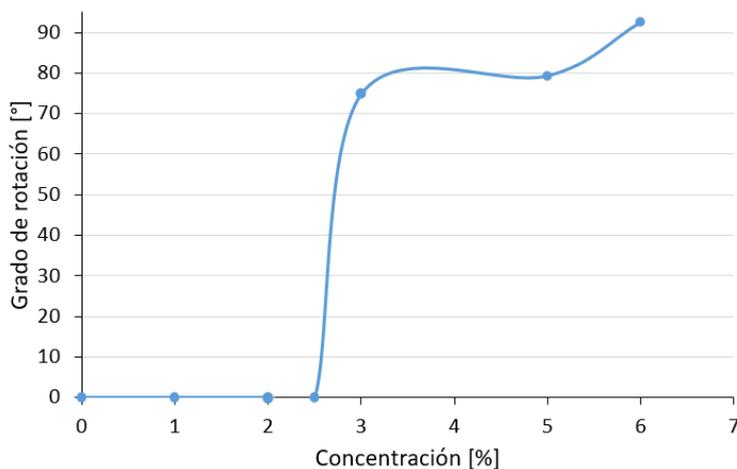


Figura 6. Curva de calibración polarímetro.

La muestra al final del proceso de extracción tiene un color oscuro por lo que el polarímetro no pudo hacer una lectura. No es posible modificar el proceso de preparación de muestra debido a que el método INEN 524 es muy específico [25]. Considerando al tipo de muestra con el que se debe trabajar, el método de cuantificación del polarímetro no es un método viable para el almidón extraído de la cáscara de plátano verde.

Espectrofotómetro

El funcionamiento del espectrofotómetro está basado en la lectura del color formado por la reacción del yodo con almidón. Más específicamente el yodo forma un complejo al entrar en contacto con la amilosa lo que resulta en una coloración azul. Para poder verificar el funcionamiento, se realizaron seis curvas de calibración: una usando almidón de maíz con dilución de 1:10, otra usando almidón de maíz con dilución de 1:20, dos más con almidón de yuca, con diluciones de 1:10 y 1:20 y dos con almidón puro con las mismas diluciones. En la figura 7 se presenta la curva de calibración con almidón de maíz en una dilución de 1:20.

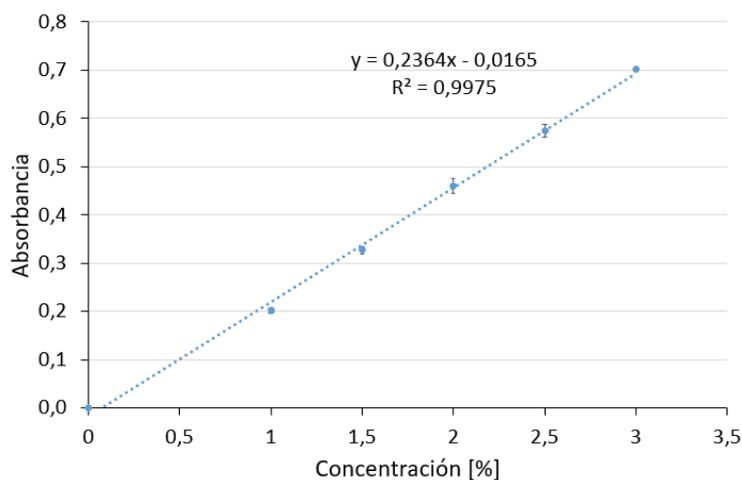


Figura 7. Curva de calibración para el espectrofotómetro usando almidón de maíz, dilución 1:20.

Ésta curva se seleccionó como guía para las lecturas de resultados debido a que tuvo el mejor ajuste con un R^2 de 0.9975.

Agentes activantes

El ácido fosfórico fue el reactivo activante que logró que las muestras fueran reactivas al agregar hipoclorito, logrando así un blanqueamiento efectivo. Los reactivos activantes restantes no lograron hacer que las muestras fueran reactivas, incluso al aumentar el tiempo de residencia.

Ácido Fosfórico

En algunas muestras el blanqueamiento fue suficiente para poder realizar la cuantificación, sin embargo, no eran resultados replicables. Algunas muestras se tornaban amarillas al finalizar el tiempo de secado posterior al blanqueamiento, lo que alteraba las lecturas de absorbancia. La adición de ácido fosfórico logró que el hipoclorito blanqueara las muestras, pero estas no mantenían el color requerido al llegar

a su estado final excluyendo a éste como un método viable de blanqueamiento para cuantificación.

Modificación del pH

La modificación de pH presentó mejores resultados como activante de las muestras en comparación al ácido fosfórico. Se usó hipoclorito al 5.25% para el blanqueamiento final. En un inicio, se lavaba el hipoclorito y filtraba la muestra, lo que ocasionaba una pérdida de masa de más del 70%, haciendo al método poco eficiente. Para mejorar el rendimiento se realizó una dilución del hipoclorito de sodio con agua y se dejó decantar la muestra durante 24 horas. Una vez separado el almidón del agua se dejó secar nuevamente.

3.1.3. Recuperación en masa de almidón extraído

La recuperación de almidón en masa se comparó con el valor teórico de contenido de almidón de las cáscaras de plátano verde encontrado en la literatura que es del 12% en masa. En base a esto se compararon los dos métodos de preparación de muestra.

Extracción en cáscaras frescas

La figura 8 representa la recuperación de almidón en masa usando distintos valores de pH durante la extracción.

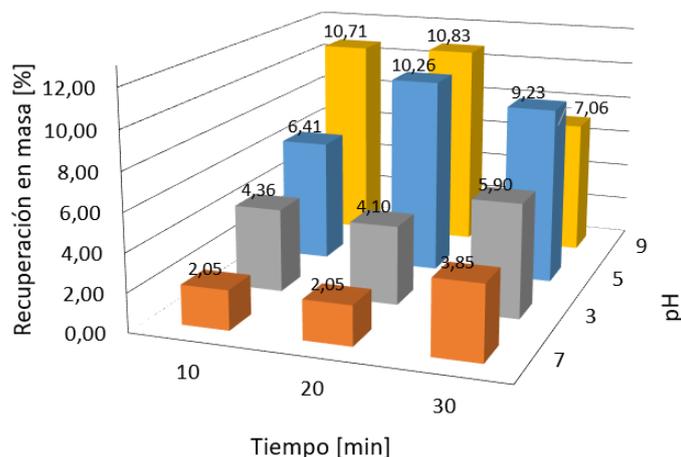


Figura 8. Eficiencia de recuperación en masa para extracciones con distintos pH.(Cáscaras frescas).

La recuperación más alta es de 10,83% en masa, en un pH de 5, que es el valor de pH que tienen las muestras sin ninguna alteración. El tiempo de agitación que permitió una mayor recuperación fue 20 minutos; esto se puede deber a que un mayor tiempo de residencia en agitación podría estar dañando a la molécula del almidón.

Para las extracciones a distintas temperaturas se obtuvieron los resultados presentados en la figura 9.

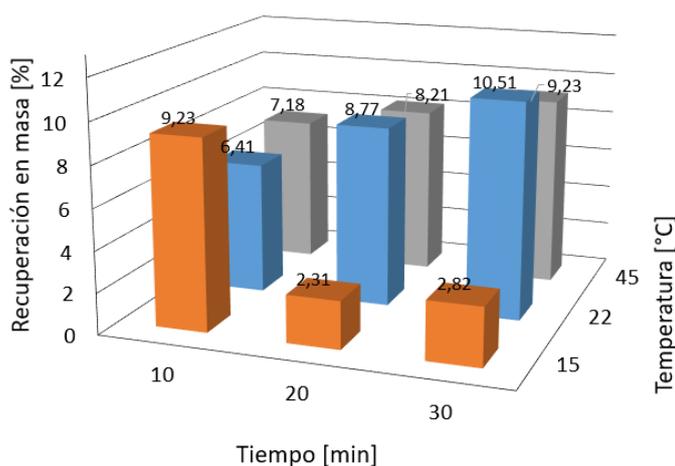


Figura 9. Eficiencia de recuperación en masa para extracciones en distintas temperaturas. (Cáscaras frescas).

La recuperación más alta se obtuvo a 22°C en un tiempo de 30 minutos, lo que difiere con los resultados obtenidos previamente. Esto se puede deber a problemas o limitaciones en el método de extracción que se mencionarán posteriormente en la sección de conclusiones y recomendaciones.

Extracción en muestras secas

En la figura 10 se presentan los resultados usando distintos valores de pH como variable principal durante la extracción.

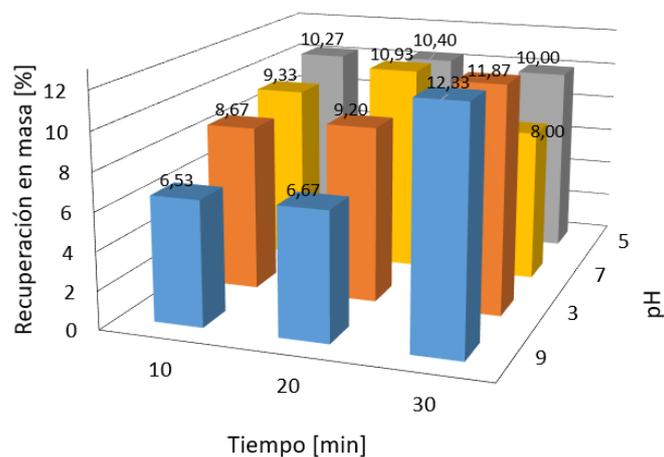


Figura 10. Eficiencia de recuperación en masa para extracciones con distintos pH.
(Cáscaras secas).

Con una recuperación de almidón del 12.33%, se tiene mejores resultados en un pH de 9 durante 20 minutos de agitación. En la figura 11 podemos ver los resultados con extracciones a distintas temperaturas.

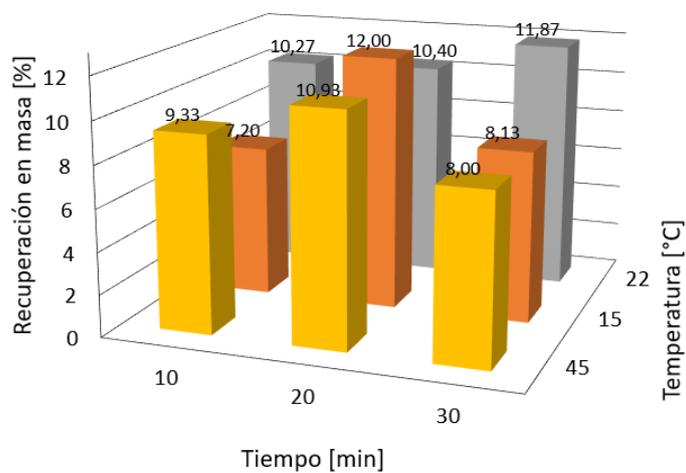


Figura 11. Eficiencia de recuperación en masa para extracciones en distintas temperaturas. (Cáscaras secas).

El mayor porcentaje de recuperación fue de 12% en masa a 20°C y durante 20 minutos de agitación con pH inicial.

La mayor recuperación de almidón se obtuvo al realizar secado de las cáscaras previamente a la extracción. Las posibles diferencias entre los distintos métodos de extracción presentan una gran limitación en el método experimental. La relevancia estadística y diferencia entre las muestras en triplicado, que no es significativa, se muestran en el anexo 3. La extracción es realizada manualmente, lo que implica que, si bien se usa cantidades de agua ya determinadas, la presión ejercida sobre la pulpa varía entre cada experimento lo que puede cambiar los resultados obtenidos, depende del experimentador cuantas veces y de qué manera se realice el filtrado del material. Esto disminuye la reproducibilidad del método pero, aun así, hay tendencias que se pueden determinar a partir de éstos resultados.

3.1.4. Cuantificación de amilosa

Para poder determinar el contenido de almidón de acuerdo a la curva de calibración se realizó una dilución de 1:20 al almidón de extracción. La lectura salió del rango de detección del espectrofotómetro por lo que se diluyó a una concentración de 1:100. Con ésta dilución se pudo obtener lecturas de absorbancia dentro del rango del equipo. Algunas muestras dieron lecturas de absorbancia semejantes entre cada repetición, sin embargo, en la mayoría de resultados no hay tendencias. Se esperaba que todas las repeticiones tuvieran un valor de absorbancia similar, lo que significaba un contenido de amilosa determinado para un método de extracción específico.

Debido a la falta de concordancia entre los resultados de absorbancia se sometió al almidón comercial, usado para la curva de calibración, al mismo tratamiento que se usó para blanquear las muestras. Al medir la absorbancia después de agregar lugol, los resultados no concordaron con aquellos obtenidos en la curva de calibración. La lectura de absorbancia para una concentración de 1%, con una dilución de 1:100, fue de 1.7. Comparando este valor con el valor de almidón sin alterar en una dilución de 1:20 que fue de 0.2, posiblemente las alteraciones realizadas al almidón nativo afectan la metodología de cuantificación.

Se realizó una investigación literaria para entender las posibles razones por las que el método no funcionó apropiadamente con las muestras de almidón de extracción modificado. Según el estudio de propiedades del almidón modificado, por Lawal Olayide, éste presenta un contenido menor de amilosa en un 2%, comparado con el almidón nativo [26]. Ésta disminución de contenido de amilosa se puede deber al método usado para el blanqueamiento de las muestras. El cambio en pH, que es la primera modificación del almidón, rompe la molécula del almidón permitiendo que los grupos hidroxilo sean más reactivos [27]. Al agregar el hipoclorito a las muestras que son reactivas, se forman más grupos carboxilo y carbonilo, como indicado por el estudio del Dr. Tanuja Srivastava. En éste estudio se muestran resultados que indican que hay una mayor concentración de grupos carbonilo y carboxilo al oxidar las muestras con hipoclorito. Existe una relación directamente proporcional entre la concentración del hipoclorito usado y el aumento en grupos carbonilo y carboxilo [28].

Los resultados de éstas investigaciones permiten realizar una comparación con los resultados presentados en éste trabajo. Debido al uso de hipoclorito con una concentración aproximada del 5%, hay una generación de grupos carbonilo y carboxilo, por lo que el empleo del lugol como método para cuantificación no es confiable. Los

grupos carbonilo reaccionan con el yodo al ser tratados con hidróxido de sodio formando un complejo color café [29]. El lugol puede tener una reacción cruzada con los grupos carbonilo, generando un cambio en color lo que podría explicar el aumento en medida de absorbancia leído por el espectrofotómetro. La necesidad de realizar una dilución 5 veces la necesitada para la curva de calibración, indica un aumento en absorbancia muy grande por lo que no se puede explicar solamente con la reacción cruzada. Se debe considerar que, al modificar el almidón con cambio de pH, existe un rompimiento de la molécula de amilosa, dando una mayor área superficial de contacto para que el lugol genere una mayor cantidad de enlaces, resultando en un aumento aún más radical en la absorbancia de las muestras.

La tabla de todos los resultados de cuantificación se encuentra en el anexo 4.

3.1.5. Kit Enzimático

El uso del kit estaba planeado como confirmación de la precisión del método de cuantificación desarrollado. Debido a los problemas con los resultados del método la comparación no tendrá resultados positivos. Se usaron dos muestras como referencia para poder verificar si el almidón modificado es cuantificable con un kit enzimático.

La ecuación utilizada para calcular la concentración existente en las muestras es:

$$Contenido_{almidón} = \frac{c}{Peso\ muestra} \times 100 \quad [Ecuación1]$$

Donde:

$c=0.5969 \cdot \Delta A$ [g almidón/L solución de muestra]

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{muestra} - (A_2 - A_1)$$

Los resultados para el método del kit en la muestra 1, con un método de extracción a temperatura ambiente y un pH de 7, indicaron que tiene un contenido de almidón de del 98.33% \pm 0.5. Se realizaron tres repeticiones de lectura, la segunda presentó una diferencia muy grande entre las otras dos lecturas. Por ésta razón se eliminó éste valor para los cálculos finales. En la segunda muestra probada, con... se obtuvo un contenido de almidón de 88.18% \pm 0.5. Ésta recuperación es menor que la primera muestra lo que resulta en un método de extracción menos eficiente, aun así, tiene un contenido de almidón muy alto. Para ver la tabla con los cálculos y resultados individuales de cada prueba, referirse al anexo 5.

La razón por la que el kit permitió tener los resultados de lectura del contenido de almidón en la muestra es debido a que la acción enzimática se da en el enlace glucósido. Dicho enlace no se rompe ni se altera en el momento de modificación del almidón. La enzima rompe éste enlace formando monosacáridos, esto permite leer el contenido de glucosa en la muestra [29]. La figura 12 muestra el mecanismo de ruptura de un polisacárido a un monosacárido, llamado hidrólisis.

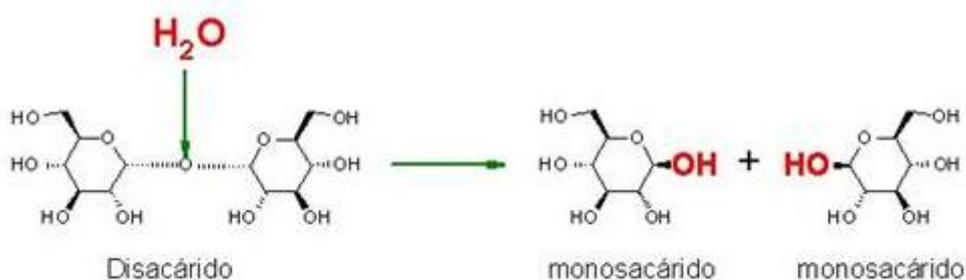


Figura 12. Hidrólisis de un polisacárido [30]

El proceso de hidrólisis consta de dos etapas, la licuefacción y la sacarificación, cada etapa necesita una enzima para poder ser llevada a cabo, la alfa amilasa y glucoamilasa respectivamente. En el kit estos dos compuestos están dentro de una misma enzima la “Amyloglucosidasa” que es un producto patentado. La enzima forma

adenosín di fosfato (ADP) y glucosa 6 fosfato que, de acuerdo a las ecuaciones presentadas en el método del kit, forman nicotinamida adenina di nucleótido fosfato (NADPH). La NADPH es una coenzima la cual, al ser leído por el espectrofotómetro, determina el contenido final de glucosa. La relación glucosa- almidón es directamente proporcional, es por esto que al romper el almidón en glucosa se puede determinar el contenido neto de almidón en la muestra.

4. Conclusiones y Recomendaciones

Éste proyecto de investigación tenía como objetivo desarrollar un método para la cuantificación del almidón extraído de la cáscara de plátano verde, una de las agroindustrias más importantes en el Ecuador. La cuantificación se realizó a muestras que fueron sometidas a distintos métodos de extracción del y de ésta manera determinar el método más eficiente basándose en los resultados de balance de masa final. La cuantificación debía incluir la masa total recuperada, la amilosa presente en la muestra y por diferencia la amilopectina. Para poder determinar si los resultados obtenidos son reales y que el método funciona, se usó un kit enzimático que permitió determinar el contenido de almidón en las muestras y de ésta manera tener datos para la comparación.

El método de cuantificación que presentó mejores resultados fue aquel basado en el complejo formado por la amilosa y una solución de lugol. Se realizaron seis curvas de calibración distintas, presentadas en el anexo 5, en las cuales hubo un ajuste con R^2 mayor a 0.9. Considerando que se usaron tres tipos distintos de almidón; puro, de maíz y de yuca, y que todas las curvas tuvieron ajustes similares se pudo continuar con el análisis de las muestras de almidón extraídas de las cáscaras de plátano verde.

Se realizó un tratamiento previo al almidón extraído, en el cual se blanquearon las muestras. Como se mencionó previamente, este blanqueamiento era necesario para poder obtener lecturas del almidón en el espectrofotómetro. El blanqueamiento más eficiente fue el que se obtuvo al realizar un cambio de pH a básico y posteriormente bajarlo a pH neutro. Esto permitió tener moléculas más reactivas, que al ser tratadas con hipoclorito fueron blanqueadas. Si bien el método modifica al almidón éste aun se puede usar en la producción de bioplásticos, objetivo final del proyecto. La modificación del almidón interfiere con el método cuantitativo, la oxidación genera grupos carbonilos que forman una reacción cruzada con el lugol. Esto da una lectura de absorbancia mucho más alta de la que debería obtenerse en realidad. Debido a esto, el método no es replicable ni eficiente específicamente en el caso del almidón modificado.

Para poder mejorar éste procedimiento se recomienda realizar el mismo tratamiento de blanqueamiento con ciertas modificaciones. La cantidad de grupos carbonilo formados depende de la concentración del hipoclorito por lo que se recomienda usar una concentración de hipoclorito menor a 1%. En el presente estudio se realizó un tratamiento a ciertas muestras con hipoclorito menos concentrado, sin embargo, estas no mostraron un blanqueamiento suficiente. Es recomendable usar el hipoclorito diluido y aumentar el tiempo de residencia de las muestras en el mismo. También es recomendable verificar los efectos del tiempo durante el cual se realiza el cambio de pH. En éste método se realizó el cambio de manera inmediata, pero se podría analizar el efecto del tiempo durante el cual se deja a la muestra en un pH ácido. Esto ayudaría a determinar el verdadero efecto de la reacción de modificación sobre las muestras.

El kit enzimático muestra resultados positivos en cuanto a la extracción. El porcentaje de contenido de almidón en la primera muestra es del 98% en masa. Esto es

un indicador de que el método de extracción es muy eficiente, sin embargo, se debe realizar una comparación entre todas las muestras extraídas con distintos métodos para poder determinar cuál es el método de mayor eficiencia. Para poder tener resultados certeros, es de alta importancia el poder mejorar el método de cuantificación y adaptarlo al tipo de almidón que se tiene después de la modificación. Una prueba que se recomienda realizar, es determinar el contenido de almidón con el kit enzimático en el almidón comercial y así comparar los resultados obtenidos con las curvas de calibración.

Los resultados de recuperación en masa total sí pudieron ser analizados. La mayor eficiencia de recuperación de almidón después de la extracción se determinó comparando con la cantidad teórica de almidón contenido en la cáscara de plátano verde. La preparación de la materia prima demostró ser un punto importante para mejorar la cantidad de almidón extraído. Existe un mayor rendimiento en masa cuando se realiza un secado a las cáscaras. El secado tiene una mayor pérdida de humedad cuando se trabaja con muestras de 100 gramos, 7 horas de secado a 90°C y con un corte longitudinal. El mayor rendimiento en masa fue de 12% y se obtuvo en un tiempo de 20 minutos de agitación a 15°C, con pH neutro. Ésta misma muestra fue medida mediante el kit enzimático, dando un contenido de almidón de casi el 100%, lo que indica que éste método de extracción es muy eficiente.

Para poder tener resultados más confiables se recomienda estandarizar más el procedimiento. Es recomendable buscar mallas específicas para permitir el paso solamente del almidón e intentar tener un proceso con mayor grado de automatización. El método actual, si bien es adecuado para un primer estudio, tiene mucho espacio para error humano. De igual manera, se recomienda un estudio que cruce todas las variables,

incluyendo temperatura y pH, para poder tener un análisis más profundo de todas las opciones posibles para la extracción.

5. Referencias Bibliográficas

- [1] Morillas Alethia, Beltrán Margarita, Espinosa María y Velasco Maribel. *El origen de los plásticos y su impacto en el ambiente*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana. [accedido. 26 de junio 2016].
- [2] Góngora Juan. *La industria del plástico en México y el mundo*. México: Banco Mex. 2014. [accedido. 20 de junio 2016].
- [3] *Plásticos*. [en línea]. Ecuador: Instituto de promoción de exportaciones e inversiones. 2015. [accedido. 20 de junio 2016]. Recuperado de: <http://www.proecuador.gob.ec/exportadores/sectores/plasticos/>
- [4] Kharaka Yousif y Dorsey Nancy. *Environmental issues of petroleum exploration and production: Introduction*. California: Environmental Geosciences. 2005. [accedido. 19 de junio 2016].
- [5] *Lifecycle of a Plastic Product*. American Chemistry Council. 2015. [accedido. 20 de junio 2016]. Recuperado de: <https://plastics.americanchemistry.com/Lifecycle-of-a-Plastic-Product/>
- [6] LeBlanc Rick. *How Long Does It Take Garbage to Decompose?* The Balance: Sustainable Business. 2016. [accedido. 27 de junio 2016]. Recuperado de: <https://www.thebalance.com/how-long-does-it-take-garbage-to-decompose-2878033>
- [7] Mosko Sarah. *Bioplastics: are they the solution?* Long Beach: Algalita Marine Research and Education. [accedido. 24 de mayo 2016]. Recuperado de: <http://www.algalita.org/bioplastics-are-they-the-solution/>
- [8] *Biopolímeros*. Murcia: Agrowaste. [accedido. 28 de febrero 2016]. Recuperado de: <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/BIOPOLIMEROS.pdf>

[9] *Centrales termoeléctricas de biomasa*. Madrid: Renovetec. 2013. [accedido. 10 de junio 2016]. Recuperado de: <http://www.plantasdebiomasa.net/que-es-la-biomasa.html>

[10] Cheng Ying. *Bioplastics and their role in achieving global sustainability*. Beijing: Research Center for Strategic Science and Technology Issues. 2014. [accedido. 5 de septiembre 2016].

[11] J. Song, R. Murphy, R. Narayan y G. Davies. *Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics*. Philosophical Transactions of the Royal Society. 2009. [accedido. 28 de Agosto 2016]. Recuperado de: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/364/1526/2127>

[12] Ballesteros Laura. *Los bioplásticos como alternativa verde y sostenible de los plásticos basados en petróleo*. Cartagena: Universidad de San Buenavenutra. [accedido. 23 de junio 2016].

[13] Morillas Alethia, Beltrán Margarita, Espinosa María y Velasco Maribel. *Bioplásticos y plásticos degradables*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana. [accedido. 16 de septiembre 2016].

[14] *Atlas Bioenergético del Ecuador*. Ecuador: ESIN Consultora. 2014.

[15] Blasco Gabriela, Gómez Francisco. *Propiedades Funcionales del Plátano Musa spp.* Veracruz: Universidad Veracruzana. 2014. [accedido. 10 de marzo 2016].

[16] Wachirasiri Phatcharaporn, Julakarangka Siripan y Wanlapa Sorada. *The effects of banana peel preparations on the properties of banana peel dietary fibre concentrate*. Bangkok: Prince of Songkla University. 2008. [accedido. 30 de mayo 2016].

[17] Ijaz Rabia, Zahid Rimsha y Iftikhar Maria. *Extraction of Starch from Waste Potatoes and its use in Different Products*. [en línea]. Faisalabad: NFC Institute of Engineering and Fertilizer Reaserch. [accedido. 25 de octubre 2016]. Recuperado: <http://publishpk.net/index.php/Technology/article/download/174/112>

[18] Mazzeo Miguel, Alzate Angela y Marín Mario. *Obtención de almidón a partir de residuos pos cosecha del plátano dominico Hartón (Musa ABB Simmonds)*. Manizalás: Universidad de Caldas. 2008. [accedido. 15 de marzo 2016].

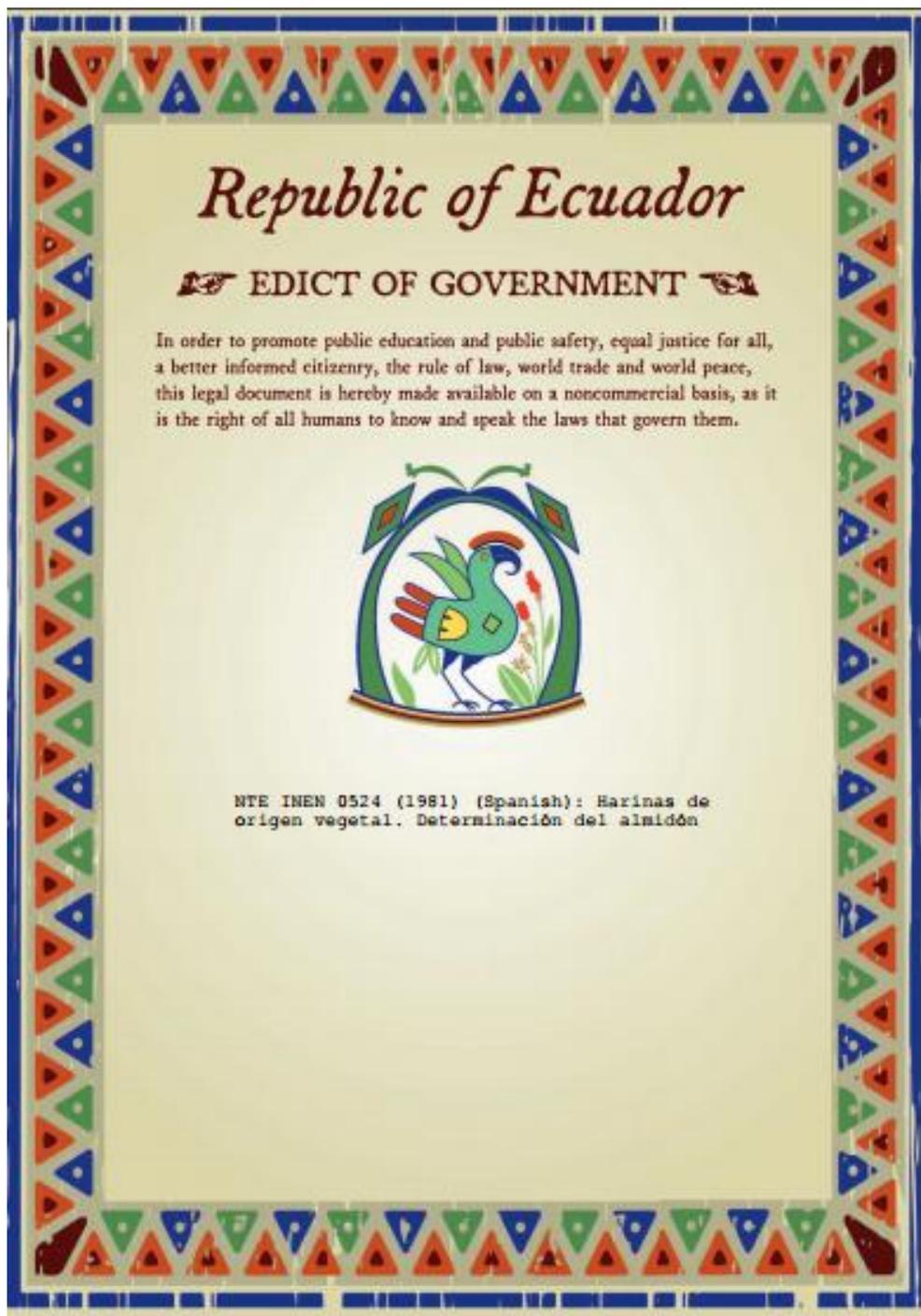
[19] Debandya Mohapatra, Sabyasachi Mishra y Sutar Namrata. *Banana and its by-product utilisation: an overview*. Gangtok: Faculty of Food Processing Technology and Bio-energy. 2010. [accedido. 2 de junio 2016].

[20] *Práctica de laboratorio: ¿Cómo se detecta el almidón en una muestra de alimento?* [en línea]. QuimiTube. 2015. [accedido. 15 de junio 2016]. Recuperado: <http://www.quimitube.com/como-se-detecta-almidon-muestra-de-alimento>

[21] Chrastil Joseph. *Improved calorimetric determination of amylose in starches or flours*. [en línea]. New Orleans: United States Department of Agriculture. 1986. [accedido. 14 de septiembre 2016]. Recuperado: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621500900132>

- [22] Ovirí Elvis. *Properties of Starch extracted from three different Plantains (Musa paradisiaca) cultivars in Nigeria*. [en línea]. Owerri: Department of Food Science and Technology, Federal University of Technology. 2014. [accedido. 7 de octubre 2016]. Recuperado: <http://internationalscholarsjournals.org/download.php?id=898062930174251529.pdf&type=application/pdf&op=1>
- [23] Parnis Mark y Oldham Keith. *Beyond the Beer-Lambert law: the dependence on absorbance on time in photochemistry*. [en línea]. Ontario: Universidad de Trent. 2013. [accedido. 22 de noviembre 2016]. Recuperado: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwIU05CWj9vQAhXKJiYKHZHOAuUQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Fscience%2Farticle%2Fpii%2FS1010603013002608&usq=AFQjCNFnWI4Zb9wImHhAHMIGqAejZPdCgQ>
- [24] McCleary B, Gibson T, Solah V y Mugford D. *Total Starch Measurement in Cereal Products: Interlaboratory Evaluation of a Rapid Enzymic Test Procedure*. American Association of Cereal Chemists. 1994. [accedido. 2 de diciembre 2016].
- [25] NTE INEN 0524: *Harinas de origen vegetal. Determinación de Almidón*. [en línea]. Quito: Gobierno de la República del Ecuador. 1981. [accedido. 10 de junio 2016]. Recuperado: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0524.1981.pdf>
- [26] Lawal, O. *Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidized, acetylated and acid-thinned new cocoyam (Xanthosoma sagittifolium) starch*. [en línea]. Nigeria: Department of Chemical Sciences, Olabisi Onabanjo. 2003. [accedido. 13 de diciembre 2016].
- [27] Peñaranda, O; Perilla, J y Algecira, N. *Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos*. [en línea]. Revista Ingeniería e Investigación. 2008. [accedido. 13 de diciembre 2016].
- [28] *Identificación de grupos funcionales*. Quiored V 1. [accedido. 15 de diciembre 2016]. Recuperado: <http://www.ugr.es/~quiored/doc/p14.pdf>
- [29] Geissman, T. *Principios de Química Orgánica*. Los Ángeles: Reverté, 1974.
- [30] *Hidrólisis de Polisacáridos*. [en línea]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2013. [accedido. 11 de diciembre 2016]

ANEXO 1: Norma INEN 0524



1. OBJ ETO

1.1 Esta norma establece el método para determinar el contenido de almidón en harinas de origen vegetal.

2. TERMINOLOGIA

2.1 **Almidón.** Polisacárido de origen vegetal, considerado como el principal constituyente energético de los alimentos.

3. RESUMEN

3.1 El contenido de almidón se extrae de una muestra de harina de origen vegetal por lavado con agua y cloruro de calcio; hacer las lecturas correspondientes usando el polarímetro o sacarímetro.

4. INSTRUMENTAL

4.1 *Mortero de porcelana.*

4.2 *Tamiz 149 μm (ver INEN 154).*

4.3 *Tubos de centrifuga, de 50 cm³, de fondo redondo y borde en la boca.*

4.4 *Centrifuga.*

4.5 *Probeta graduada, de 250 cm³.*

4.6 *Matraz Erlenmeyer, de 250 cm³.*

4.7 *Plancha de calentamiento, con regulador de temperatura.*

4.8 *Tela metálica con asbesto.*

4.9 *Matraz aforado, de 100 cm³.*

4.10 *Embudo acanalado con papel filtro, wathman No. 12 o filtro de vidrio poroso o embudo tipo Hirsch.*

4.11 *Tubos de polarización, de 100 o de 200 mm de longitud.*

4.12 *Polarímetro o sacarímetro.*

4.13 *Fuente de luz monocromática o filtro para obtener luz monocromática.*

5. REACTIVOS

5.1 *Solución al 33% de cloruro de calcio.* Disolver dos partes de cloruro de calcio exahidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en una parte de agua destilada y ajustar a una densidad de 1,30 a 20°C. Alcalinizar muy ligeramente mediante la adición de una solución 0,1 N de hidróxido de sodio, en presencia del indicador de fenolftaleína.

5.2 *Solución al 0,8% de ácido acético.*

5.3 *Alcohol etílico al 65% d = 0,88 a 20°C.*

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 Las muestras para el ensayo deben estar acondicionadas en recipientes herméticos, limpios, secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable), completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.

6.2 La cantidad de muestra de la harina de origen vegetal extraída dentro de un lote determinado debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.

6.3 Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que la contiene.

7.6 Colocar
de calentamiento
a 17 minutos
partículas

7. PROCEDIMIENTO

7.1 La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

7.7 Enfriar
y transferir

7.2 La muestra de harina de origen vegetal, pulverizada finamente, es pasada a través de un tamiz de abertura correspondiente a 149 μm .

7.8 Lavar
da en una

7.3 Pesar, con aproximación al 0,1 mg, 2 g a 2,5 g de muestra y transferir al tubo de la centrifuga de 50 cm^3 ; añadir 10 cm^3 de éter para remover la grasa, luego 10 cm^3 de alcohol de 65% y agitar cuidadosamente con una varilla de vidrio.

7.9 Agitar
chando los

7.4 Colocar el tubo y su contenido en la centrifuga y centrifugar por dos minutos (si no se dispone de centrifuga, lavar la muestra de harina colocándola sobre un papel filtro, usando un cono de platino y ligera succión). Decantar el solvente y, si es necesario, repetir el lavado hasta que se hayan usado 60 cm^3 del líquido lavador, agitando cada vez que sea posible.

7.10 Llenar
metro y tor

7.5 Agitar el residuo con 10 cm^3 de agua destilada y transferir al matraz Erlenmeyer de 250 cm^3 . Se termina esta transferencia usando para el lavado un total de 60 cm^3 de la solución de cloruro de calcio que contenga 2 cm^3 de ácido acético al 0,8%; colocar la varilla de vidrio en el matraz Erlenmeyer.

Anexo 2: Método kit enzimático, ENZYTEC Starch

ENZYTEC™ Starch

Update: 31.01.2011

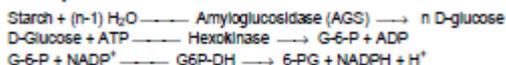
Code N° E1268

Page 1 / 2

UV method for approx. 32 assays

For in vitro use only
Store between +2 and +8°C

The method is contained in the Dutch, German, Swiss food laws. Recommended e. g. by AUN, MEBAK. Standardized by DIN, NEN.

PrincipleRef.: Beutler, H.-O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 2-10; Verlag Chemie Weinheim, Deerfield / Florida, Basel.**Assay performance**

Wavelength: 340 nm (NADPH), $\epsilon = 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Light path: 1.00 cm (glass or plastic cuvettes)
 Temperature: +55 to +60°C (incubation)
 +20 to +25°C (measurement)
 Assay volume: 2.320 ml
 Measurement: against air or against water
 Sample solution: 1.2 to 70 µg starch in 0.100 to 1.000 ml sample solution, resp. 0.100 to 0.200 ml when analyzing DMSO containing solutions.

Reagents

AGS: Lyophilizate with citrate buffer, pH approx. 4.6, approx. 98 U amyloglucosidase (for stability see pack label). Dissolve contents of bottle # AGS with 7 ml redist. water. The solution is stable for 6 weeks at +2 to +8°C, resp. for 3 months at -15 to -25°C.

1: Powder mixture with triethanolamine buffer, pH approx. 7.6, approx. 80 mg NADP, approx. 190 mg ATP, magnesium sulfate (for stability

ENZYTEC™ Starch

Update: 31.01.2011

Code N° E1268

Page 2 / 2

Calculation

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{sample, resp. standard assay}} - (A_2 - A_1)_{\text{blank assay}}$$

$$C = (V \times MW \times \Delta A) / (c \times d \times v \times 1000) \text{ [g starch/l sample solution]}$$

$$c = (2.320 \times 162.1 \times \Delta A) / (6.3 \times 1.00 \times 0.100 \times 1000) = 0.5969 \times \Delta A \text{ [g starch/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, multiply the result with dilution factor F.

When analyzing samples which are weighed out for sample preparation, calculate the content from the amount weighed:

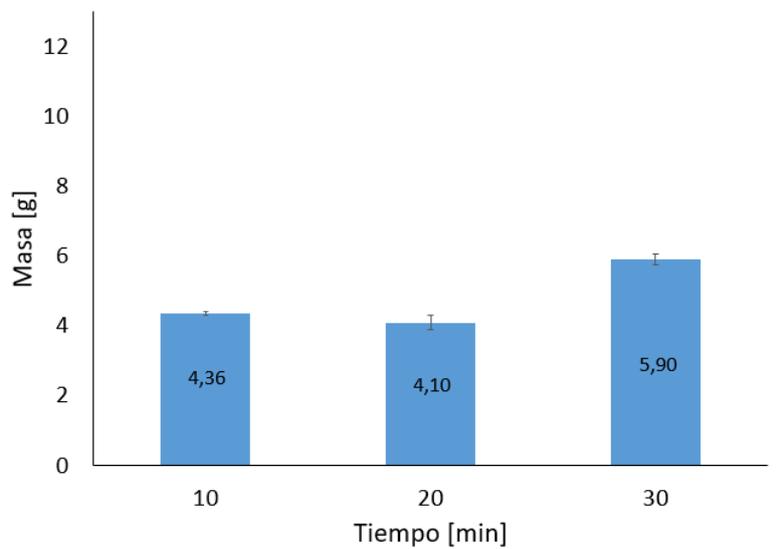
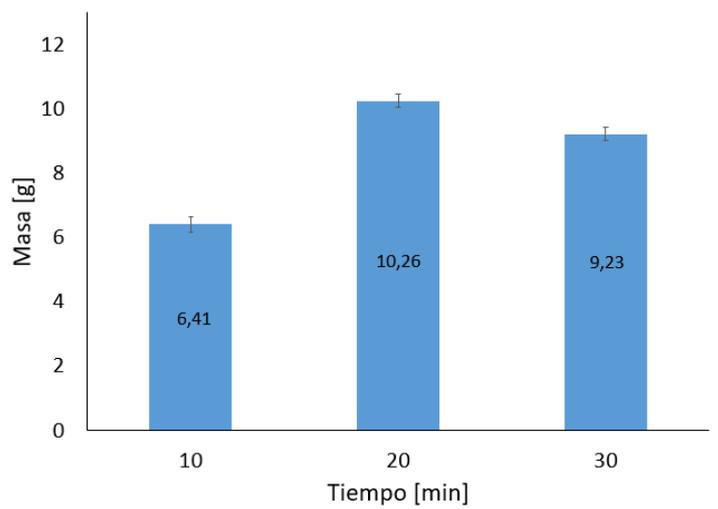
$$\text{Content}_{\text{starch}} = \frac{\text{C}_{\text{starch}} \text{ [g/l sample solution]}}{\text{weight}_{\text{sample}} \text{ [ln g/l sample solution]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Sample preparation

- Solubilize starch with DMSO and HCl: Accurately weigh 100 mg to 1 g of the homogenized sample (containing approx. 70 mg starch) into a 100 ml-Erlenmeyer flask; add 20 ml DMSO and 5 ml HCl (8 M) in the case of fat containing samples, resp. 5 ml HCl (8 M) and 20 ml DMSO in the case of fat-free samples; close the flask and incubate in a shaking water-bath at 55-60°C for 30 (normally) to 60 min (in the case of 'very hard' materials) or under heatable magnetic stirring; cool to room temperature; add approx. 50 ml redist. water; adjust pH to 4 to 5 (not higher!) by adding NaOH (5 M); transfer the material quantitatively into a 100 ml-volumetric flask (rinse with water), fill up to the mark and mix; let stand for a few minutes and take the sample solution from the top of the solution by means of a piston-type pipette.
- Solubilize starch partially with HCl: Accurately weigh 100 mg to 1 g of the homogenized sample (containing approx. 70 mg starch) into a centrifuge tube; wash 3 times with a ethanol/water mixture (e. g. 40 %; v/v); stir at room temperature for approx. 20 min; centrifuge, remove the supernatant; add 10 ml HCl (approx. 10 %; m/m), stir at +60 °C in a water bath for 60 min; transfer the material quantitatively into a 100 ml beaker, rinse the centrifuge tube with redist. water and transfer to the beaker again (100% of the sample must be transferred); adjust pH to 4 to 5 (not higher!) by adding NaOH (5 M); transfer the material quantitatively into a 100 ml-volumetric flask (rinse the beaker with water and transfer again), fill up to the mark and mix; let stand for a few minutes and take the sample solution from the top of the solution by means of a piston-type pipette.
Note: Samples containing water are treated with ethanol: add 10 ml ethanol (96 %; v/v) to approx. 1 g sample, stir and centrifuge; decant the ethanol and continue as described above.
- Determination of "glucose syrup" e. g. in fruit juices: Accurately weigh 100 mg to 1 g of the homogenized sample (containing approx. 100 mg D-glucose + "glucose syrup") into a volumetric flask; fill up to the mark with redist. water, mix and filter. Perform the analysis with sample blank assay and sample assay (incubate 30 min at +20 to +25°C).
- Determination of dextrins in beer: Use the sample directly for the assay: perform analysis with sample blank and sample assay.

Assay characteristics

- Specificity: AGS hydrolyzes α -1,4- and α -1,6-glycosidic bonds independent on the molecular weight (amylose, amylopectin, glycogen, dextrin, maltose, maltotriose, etc.). A limited differentiation is only possible during sample preparation by washing with ethanol/water mixtures. In the analysis of pure starch results of 99 % calculated on the dry mass have to be expected.
- Sensitivity: 3 mg starch/l ($\Delta A = 0.010$; $v = 0.200 \text{ ml}$; $V = 2.320 \text{ ml}$)
- Detection limit: 6 mg starch/l ($\Delta A = 0.020$; $v = 0.200 \text{ ml}$; $V = 2.320 \text{ ml}$)
- Linearity: from 1.2 µg starch/assay ($v = 0.200 \text{ ml}$; $V = 2.320 \text{ ml}$)
to 70 µg starch/assay ($v = 0.100 \text{ ml}$; $V = 2.320 \text{ ml}$)
- Precision: $\Delta A = \pm 0.010$ to 0.015 absorbance units
CV = approx. 1 to 2 %
Pork sausage: $x = 1.3 \text{ g/100 g}$ $r = 0.170 \text{ g/100 g}$ $s(r) = \pm 0.060 \text{ g/100 g}$
 $R = 0.217 \text{ g/100 g}$ $s(R) = \pm 0.077 \text{ g/100 g}$
Children's rusks: $x = 43.5 \text{ g/100 g}$ $r = 2.33 \text{ g/100 g}$ $s(r) = \pm 0.82 \text{ g/100 g}$
 $R = 8.42 \text{ g/100 g}$ $s(R) = \pm 2.97 \text{ g/100 g}$
- Technical Information:
 - D-Glucose cannot be calculated from the sample blank because it contains also D-glucose from sucrose, lactose and maltose liberated during sample preparation with DMSO and HCl. A separate sample preparation is necessary.
 - If the sample contains maltose, the sample has to be washed with ethanol/water mixtures otherwise a part of maltose will be found in the sample blank and the rest in the sample assay because maltose is only partially hydrolyzed during sample preparation with DMSO/HCl.

Anexo 3: Gráficas recuperación en masa de extracción con desviación estándar**Figura 13.** Recuperación a pH 3 en muestras frescas**Figura 14.** Recuperación a pH 5 en muestras frescas

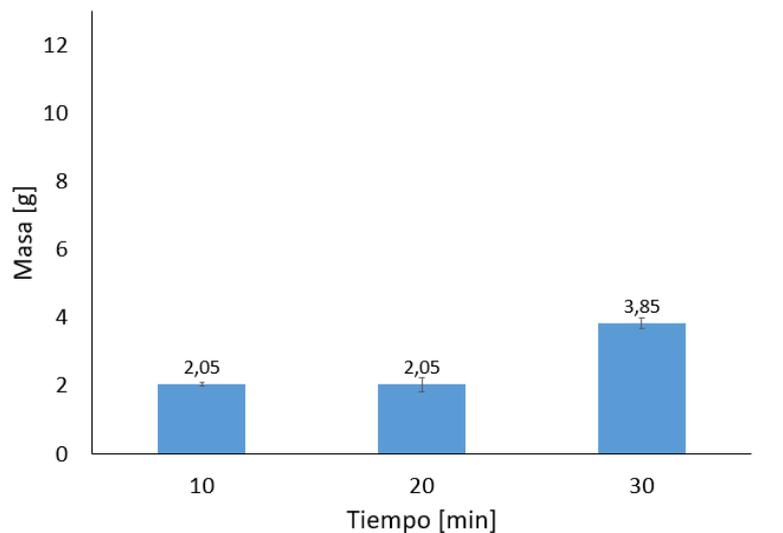


Figura 15. Recuperación a pH 7 en muestras frescas

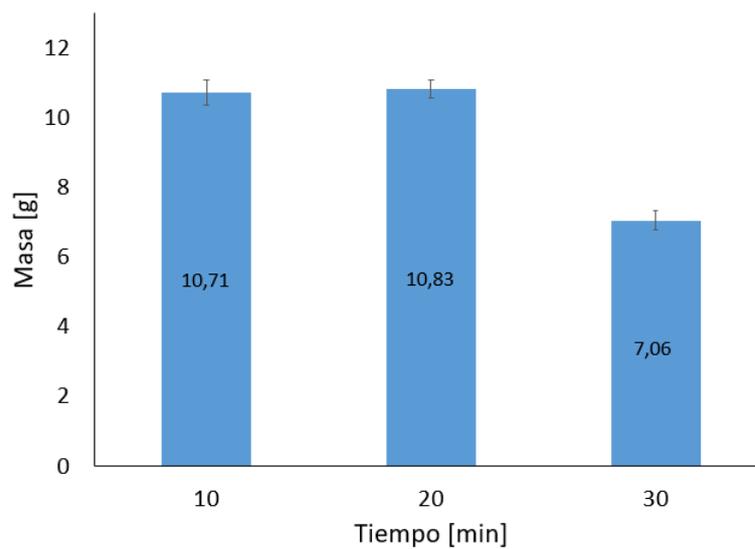


Figura 16. Recuperación a pH 9 en muestras frescas

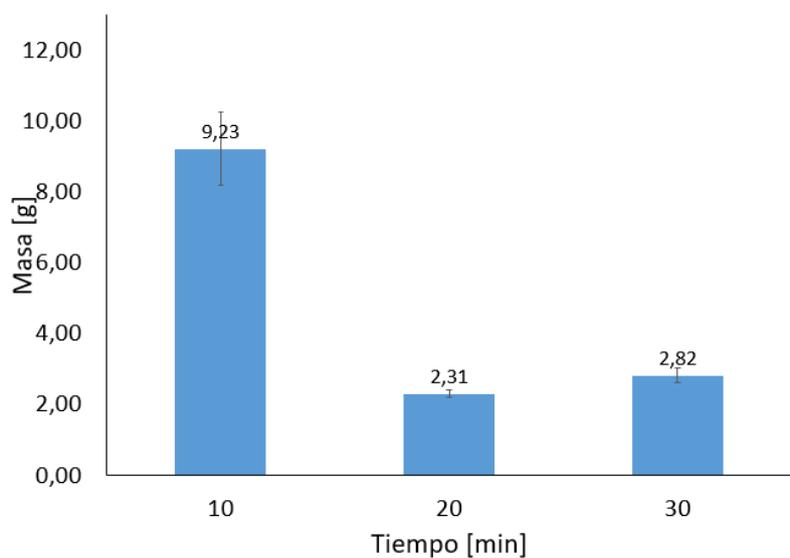


Figura 17. Recuperación a temperatura de extracción de 15°C en muestras frescas

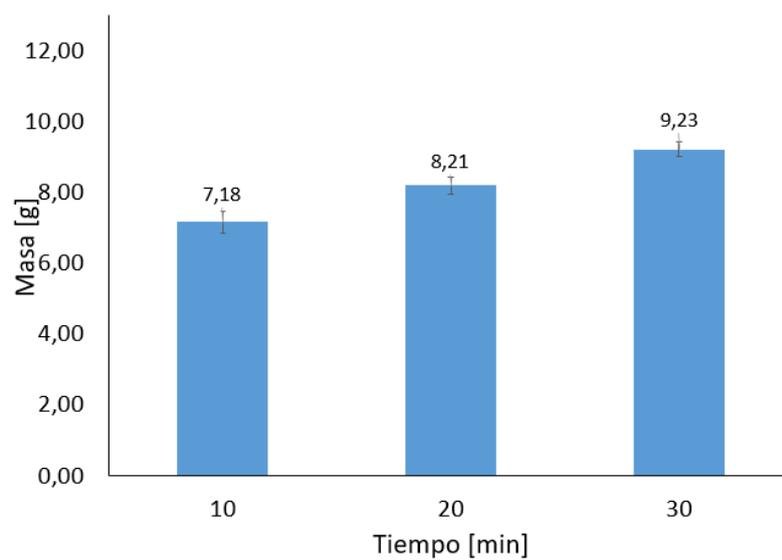


Figura 18. Recuperación a temperatura de extracción de 15°C en muestras frescas

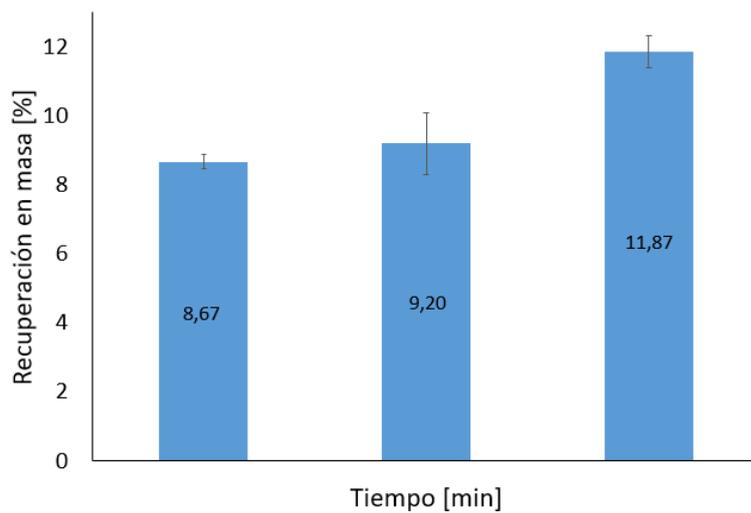


Figura 19. Recuperación a pH 3 en muestras secas

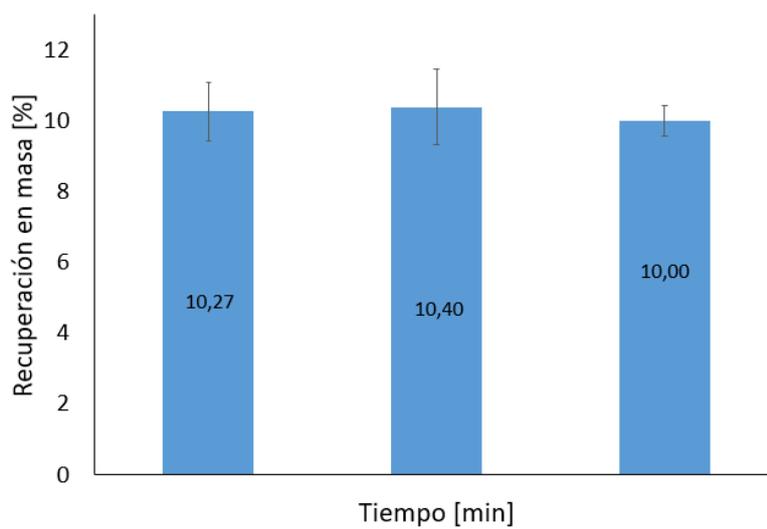


Figura 20. Recuperación a pH 5 en muestras secas

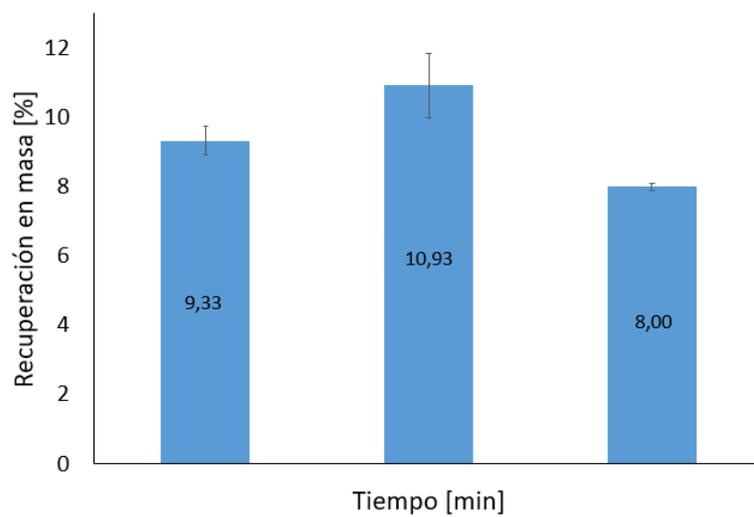


Figura 21. Recuperación a pH 7 en muestras secas

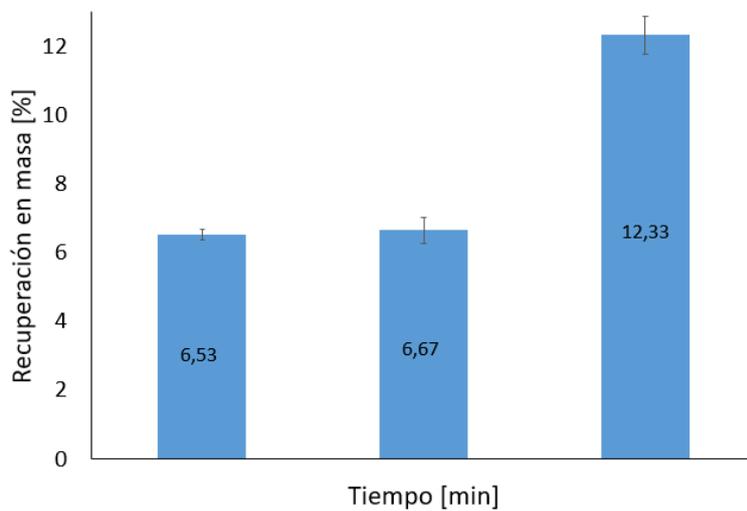


Figura 22. Recuperación a pH 9 en muestras secas

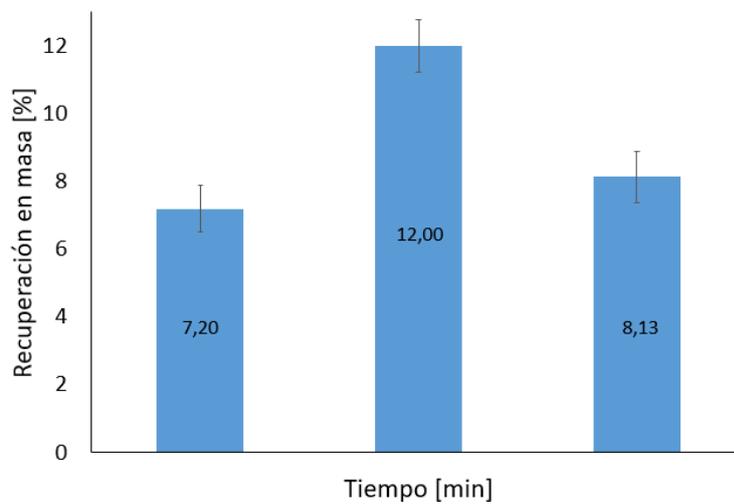


Figura 23. Recuperación a temperatura de extracción de 15°C en muestras secas

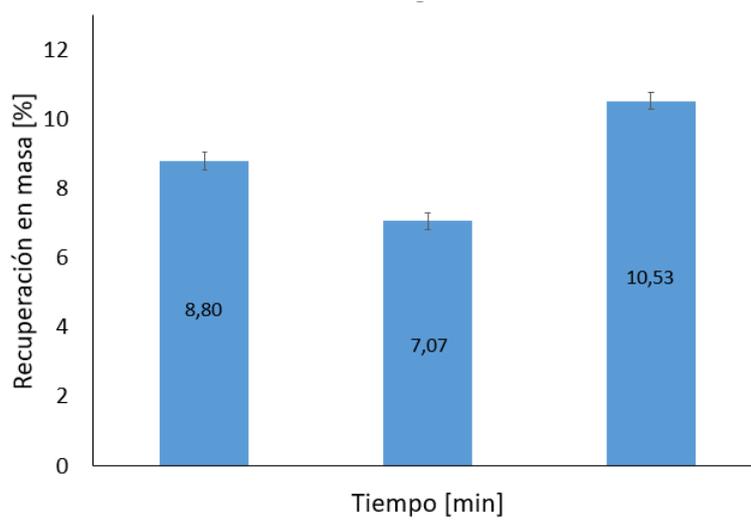


Figura 24. Recuperación a temperatura de extracción de 15°C en muestras secas

Anexo 4: Tablas de resultados de cuantificación
Muestras frescas

Tabla 6. Resultados de cuantificación de la extracción con distintos pH en cáscaras frescas.

	Masa	Blanqueamiento	Pérdida	Absorbancia	Recuperación masa	Blanqueamiento	Pérdida	Absorbancia	Masa	Blanqueamiento	Pérdida	Absorbancia
Tiempo [min]/ph	10	10	10	10	20	20	20	20	30	30	30	30
3	0,50	0,30	0,20	0,47	0,30	0,00	0,30	0,00	0,60	0,30	0,30	1,90
	0,60	0,40	0,20	1,93	0,60	0,30	0,30	1,32	0,90	0,60	0,30	1,52
	0,60	0,30	0,30	0,00	0,70	0,00	0,70	0,00	0,80	0,70	0,10	0,00
Promedio	4,36	0,33	0,23	0,80	4,10	0,10	0,43	0,00	5,90	0,53	0,23	0,00
Desv.0Estándar	0,06	0,06	0,06	1,01	0,21	0,17	0,23	0,00	0,15	0,21	0,12	0,00
5 (inicial)	0,80	0,20	0,60	0,25	1,50	1,00	0,50	1,09	1,40	0,00	1,40	0,00
	1,10	0,90	0,20	1,83	1,10	0,40	0,12	1,61	1,20	0,00	1,20	0,00
	0,60	0,40	0,20	0,00	1,40	1,20	0,20	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Promedio	6,41	0,50	0,33	0,70	10,26	0,87	0,27	0,90	9,23	0,00	1,20	0,00
Desv.Estándar	0,25	0,36	0,23	0,00	0,21	0,42	0,20	0,82	0,20	0,00	0,20	0,00
7	0,20	0,20	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,30	0,30	0,00	0,00
	0,20	0,20	0,00	0,00	0,40	0,20	0,20	1,92	0,70	0,50	0,20	1,58
	0,40	0,30	0,10	0,00	0,30	0,20	0,10	0,00	0,50	0,40	0,10	0,00
Promedio	2,05	0,23	0,03	0,00	2,05	0,17	0,10	0,64	3,85	0,40	0,10	0,00
Desv.Estándar	0,12	0,06	0,06	0,00	0,15	0,06	0,10	1,11	0,20	0,10	0,10	0,00
9	1,10	0,80	0,30	1,27	2,00	1,10	0,90	0,25	0,90	0,70	0,20	1,29
	1,80	1,10	0,70	0,96	1,70	1,20	0,50	1,66	1,40	0,60	0,80	1,11
	1,60	0,00	1,60	0,00	1,50	0,00	1,50	0,00	1,30	0,00	1,30	0,00
Promedio	10,71	0,63	0,87	0,74	10,83	0,77	0,97	0,64	7,06	0,43	0,77	0,80
Desv.Estándar	0,36	0,57	0,67	0,66	0,25	0,67	0,50	0,90	0,26	0,38	0,55	0,70

Tabla 7. Resultados de cuantificación de la extracción con distintas temperaturas en cáscaras frescas.

T[°C]	Masa	anqueamien	Pérdida	Absorbancia	Amilosa	Masa	anqueamien	Pérdida	Absorbancia	Amilosa	Masa	anqueamien	Pérdida	Absorbancia	Amilosa
Tiempo0[min]/	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	30	30	30	30	30
15	0,60	0,60	0,00	0,43	0,00	0,30	0,20	0,10	1,93	0,00	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00
0	0,60	0,60	0,00	1,47	0,00	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00	0,30	0,20	0,10	0,44	0,00
0	2,40	2,10	0,30	1,01	0,00	0,40	0,20	0,20	1,52	0,00	0,60	0,40	0,20	0,76	0,00
Promedio	9,23	1,10	0,10	0,97	0,00	2,31	0,20	0,10	1,15	0,00	2,82	0,27	0,10	0,40	0,00
Desv.0Estándar	1,04	0,87	0,17	0,52	0,00	0,10	0,00	0,10	1,02	0,00	0,21	0,12	0,10	0,38	0,00
25	0,80	0,20	0,60	0,25	0,00	1,50	1,00	0,50	1,09	0,00	1,90	0,00	1,90	0,00	0,00
0	1,10	0,90	0,20	1,83	0,00	0,52	0,40	0,12	1,61	0,00	1,20	0,00	1,20	0,00	0,00
0	0,60	0,40	0,20	0,00	0,00	1,40	1,20	0,20	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00
Promedio	6,41	0,50	0,33	0,70	0,00	8,77	0,87	0,27	0,90	0,00	10,51	0,00	1,37	0,00	0,00
Desv.0Estándar	0,25	0,36	0,23	0,99	0,00	0,54	0,42	0,20	0,82	0,00	0,47	0,00	0,47	0,00	0,00
45	1,20	0,60	0,60		0,00	0,80	0,30	0,50	0,00	0,00	1,00	0,70	0,30	1,05	0,00
0	1,00	0,70	0,30	0,80	0,00	1,10	1,90	-0,80	0,00	0,00	1,20	0,60	0,60	0,91	0,00
0	0,60	0,60	0,00	1,05	0,00	1,30	0,40	0,90	0,41	0,00	1,40	0,90	0,50	0,73	0,00
Promedio	7,18	0,63	0,30	0,62	0,00	8,21	0,87	0,20	0,14	0,00	9,23	0,73	0,47	0,90	0,00
Desv.0Estándar	0,31	0,06	0,30	0,55	0,00	0,25	0,90	0,89	0,24	0,00	0,20	0,15	0,15	0,16	0,00

Tabla 8. Resultados de cuantificación de la extracción con distintos pH en cáscaras secas.

pH	Masa	Blanqueamiento	Pérdida	Absorbancia	Amilosa	Recup masa	Blanqueamiento	Pérdida	Absorbancia	Amilosa	Masa	Blanqueamiento	Pérdida	Absorbancia	Amilopectina
Tiempo [min]/ph	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	30	30	30	30	30
3	2,00	1,40	0,60	0,80	0,00	3,30	2,00	1,30	0,86	0,00	2,50	1,40	1,10	0,00	0,00
	2,40	0,00	2,40	0,00	0,00	1,60	1,30	0,30	1,20	0,00	3,40	0,90	2,50	0,21	0,00
	2,10	0,00	2,10	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	0,00
Promedio	8,67	0,00	8,67	0,00	0,00	9,20	1,10	1,20	0,00	0,00	11,87	0,77	2,20	0,00	0,00
Desv. Estándar	0,21	0,81	0,96	0,00	0,00	0,89	1,01	0,85	0,00	0,00	0,45	0,71	0,98	0,00	0,00
5 (inicial)	2,20	1,70	0,50	1,52	0,00	3,80	3,50	0,30	1,31	0,00	2,30	1,90	0,40	0,00	0,00
	3,50	1,90	1,60	0,54	0,00	2,30	1,70	0,60	0,83	0,00	2,20	0,80	1,40	0,82	0,00
	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	1,70	1,20	0,50	0,14	0,00	3,00	2,80	0,20	1,32	0,00
Promedio	10,27	1,20	1,37	0,00	0,00	10,40	2,13	0,47	0,76	0,00	10,00	1,83	0,67	0,00	0,00
Desv. Estándar	0,81	1,04	0,78	0,00	0,00	1,08	1,21	0,15	0,59	0,00	0,44	1,00	0,64	0,00	0,00
7	2,70	2,00	0,70	1,34	0,00	3,80	2,50	1,30	1,26	0,00	1,90	0,00	1,90	0,00	0,00
	1,90	1,30	0,60	1,14	0,00	2,10	1,60	0,50	1,13	0,00	2,10	0,00	2,10	0,00	0,00
	2,40	1,90	0,50	0,00	0,00	2,30	0,00	2,30	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00
Promedio	9,33	1,73	0,60	0,00	0,00	10,93	1,37	1,37	0,80	0,00	8,00	0,00	2,00	0,00	0,00
Desv. Estándar	0,40	0,38	0,10	0,00	0,00	0,93	1,27	0,90	0,69	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00
9	1,80	1,20	0,60	0,00	0,00	1,50	1,10	0,40	0,37	0,00	3,60	3,30	0,30	1,23	0,00
	1,50	0,00	1,50	0,00	0,00	2,10	1,50	0,60	1,72	0,00	3,15	2,50	0,65	0,00	0,00
	1,60	0,00	1,60	0,00	0,00	1,40	0,00	1,40	0,00	0,00	2,50	0,00	2,50	0,00	0,00
Promedio	6,53	0,40	1,23	0,00	0,00	6,67	0,87	0,80	0,70	0,00	12,33	1,93	1,15	0,41	0,00
Desv. Estándar	0,15	0,69	0,55	0,00	0,00	0,38	0,78	0,53	0,90	0,00	0,55	1,72	1,18	0,71	0,00

Tabla 9. Resultados de cuantificación de la extracción con distintas temperaturas en cáscaras frescas

T[°C]	Masa	anqueamien	Pérdida	Absorbancia	Amilosa	Masa	anqueamien	Pérdida	Absorbancia	Amilosa	Masa	anqueamien	Pérdida	Absorbancia	Amilosa
Tiempo	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	30	30	30	30	30
0	2,60	0,00	2,60	0,00	0,00	3,90	0,53	3,37	0,48	0,00	2,90	2,20	0,70	0,00	0,00
15	1,30	0,70	0,60	0,00	0,00	2,60	0,00	2,60	0,00	0,00	1,70	0,00	1,70	1,88	0,00
0	1,50	0,00	1,50	0,00	0,00	2,50	0,00	2,50	0,00	0,00	1,50	0,00	1,50	0,00	0,00
Promedio	7,20	0,23	1,57	0,00	0,00	12,00	0,18	2,82	0,16	0,00	8,13	0,73	1,30	0,94	0,00
Desv. Estándar	0,70	0,40	1,00	0,00	0,00	0,78	0,31	0,48	0,28	0,00	0,76	1,27	0,53	1,33	0,00
25	2,20	1,70	0,50	1,52	0,00	4,10	3,30	0,80	0,00	0,00	2,30	0,00	2,30	0,00	0,00
0	3,50	1,90	1,60	0,54	0,00	2,30	1,70	0,60	0,00	0,00	2,20	0,00	2,20	0,00	0,00
0	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00	1,70	0,00	1,70	0,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	0,00
Promedio	2,77	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	1,67	1,03	0,00	0,00	2,50	0,00	2,50	0,00	0,00
Desv. Estándar	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	1,65	0,59	0,00	0,00	0,44	0,00	0,44	0,00	0,00
45	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,97	1,03	1,85	0,00	2,90	2,30	0,60	0,90	0,00
0	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00	1,50	0,00	0,00	2,40	0,00	2,40	0,00	0,00
0	2,10	0,00	0,00	0,00	0,00	1,80	0,00	1,80	0,00	0,00	2,60	0,00	2,60	0,00	0,00
Promedio	8,80	0,00	0,00	0,00	0,00	7,07	0,32	1,44	0,62	0,00	10,53	0,77	1,87	0,30	0,00
Desv. Estándar	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,56	0,39	1,07	0,00	0,25	1,33	1,10	0,52	0,00

Anexo 5: Resultados Kit Enzimático

Tabla 10. Cálculos y contenido de almidón usando el kit enzimático muestra 1.

Muestra 1: 15°C, 20 min, pH neutro				
Prueba	1	3	Promedio	Desv. Estándar
Blanco 1	0,188	0,189	0,189	0,001
Muestra 1	0,194	0,198	0,196	0,003
Blanco 2	0,313	0,304	0,309	0,006
Muestra 2	1,708	1,714	1,711	0,004
deltaA	1,389	1,401	1,395	0,008
c	0,829	0,836	0,833	0,005
Contenido Almidón	97,909	98,755	98,332	0,598

Tabla 11. Cálculos y contenido de almidón usando el kit enzimático muestra 2

Muestra 2: 25°C, 30 min, pH 9				
Prueba	1	3	Promedio	Desv. Estándar
Blanco 1	0,188	0,189	0,189	0,001
Muestra 1	0,194	0,198	0,196	0,003
Blanco 2	0,313	0,304	0,309	0,006
Muestra 2	1,708	1,714	1,711	0,004
deltaA	1,389	1,401	1,395	0,008
c	0,829	0,836	0,833	0,005
Contenido Almidón	87,809	88,568	98,332	0,536