

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

DETERMINACION DE DEXTRANA EN AZUCAR CRUDO. METODO MODIFICADO DE LA TURBIEDAD CON ALCOHOL

Dextran determination in raw sugar
by a modified alcohol haze method

Descriptores: Determinación; Azúcar; Turbiedad; Alcohol;
Polímero; Glucosa.

1. Edición

Noviembre 2000

ICS: 67.180.10

REPRODUCCION PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.
Teléf.: 30-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: ncnorma@cenai.inf.cu

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido preparada por el **NC/CTN 49 de Azúcares**, integrado por las siguientes instituciones:
 - Ministerio del Azúcar.
 - Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.
 - Ministerio del Comercio Exterior.
 - Ministerio del Comercio Interior.
 - Ministerio de la Industria Alimenticia.
 - Ministerio de Salud Pública.

- Se corresponde con la determinación de dextrana en azúcar crudo GS1-15 que es un método catalogado como aceptado por la ICUMSA.

© NC, 2000

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de:

**Oficina Nacional de Normalización (NC).
Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.**

Impreso en Cuba

Indice

Introducción	IV
1 Alcance y esfera de aplicación	1
2 Definiciones	1
3 Fundamento del método	1
4 Reactivos	1
5 Utensilios e instrumentos	2
6 Procedimiento	3
7 Expresión de los resultados	5
Tabla 1 Preparación de las soluciones de referencia de dextrana.....	6
Bibliografía	7

Introducción

La dextrana es un polímero de la glucosa que abarca un extenso intervalo de masa molecular e influye negativamente durante la refinación del azúcar crudo.

Se han desarrollado diferentes métodos para determinar este polisacárido, entre ellos el turbidimétrico que se recoge en esta norma.

DETERMINACION DE DEXTRANA EN AZUCAR CRUDO. METODO MODIFICADO DE LA TURBIEDAD CON ALCOHOL

1 Alcance y esfera de aplicación

Este método es aplicable al azúcar crudo.

2 Definiciones

La dextrana se define como un polímero predominantemente lineal de la glucosa con alta masa molecular, donde la mayoría de los enlaces glucosídicos son 1-6. Estos enlaces se forman por la acción de ciertas especies de bacterias, en especial la *Leuconostoc mesenteroides*, sobre la sacarosa durante el almacenamiento de la caña y el jugo.

3 Fundamento del método

Se basa en la poca solubilidad de la dextrana en solución hidroetanólica y la posterior medición espectrofotométrica, a 720 nm, de la turbiedad producida en el seno de dicha solución.

4 Reactivos

A LOS USUARIOS DE ESTE MÉTODO SE LES ADVIERTE QUE DEBEN CONSULTAR LA LEGISLACIÓN VIGENTE SOBRE SALUD Y SEGURIDAD LABORAL ANTES DE MANIPULAR ÁCIDO TRICLOROACÉTICO Y ÁCIDO CLORHÍDRICO CONCENTRADO.

4.1 Agua destilada o desionizada

4.2 Etanol absoluto

4.3 Tierra de infusorios tratada con ácido. Pese 50 g (5.13) de tierra de infusorios, añada aprox. 1 000 ml de agua (4.1) y 50 ml (ó 59.0 g) de ácido clorhídrico ($\rho_{20} = 1.18$ g/ml), agite 5 min, filtre mediante vacío y lave con agua hasta que el filtrado adquiera el pH del agua utilizada. Séquela en estufa a 100 °C durante 6 h y consévela en un recipiente con cierre hermético.

4.4 Solución de ácido tricloroacético (ATA), aprox. 100 mg/ml. Pese 10.0 g (5.13) de ácido tricloroacético, disuélvalo y trasváselo a un matraz aforado de 100 ml, agite hasta su total disolución, enrase y homogeneícelo. La solución puede conservarse refrigerada hasta una semana. **(El ácido tricloroacético produce quemaduras, manipúlelo con cuidado).**

4.5 Dextrana estándar. Use dextrana de 110 000 ó 500 000 de masa molecular. Determine su contenido de humedad hasta la centésima, por duplicado, mediante el secado de aproximadamente 2 g de dextrana durante 3 h dentro de una estufa regulada a 105 °C y efectúe las pesadas hasta 0.1 mg. La diferencia entre dos determinaciones debe estar dentro del 1 % respecto al contenido promedio de humedad.

4.6 Sacarosa de referencia. Sólo use sacarosa pura que contenga menos de 2 mg/kg de almidón. Compruebe la turbiedad que se produce cuando 8 ml de la solución de sacarosa/ácido tricloroacético (4.4) más 4.5 ml de agua destilada se diluyen hasta 25 ml con alcohol absoluto (4.2) acorde

con el procedimiento. La absorbancia de esta solución en una cubeta de 2 cm, no excederá de 0.003 medida a 720 nm y tomando como referencia una solución compuesta por 8 ml de solución de sacarosa/ácido tricloroacético diluida hasta 25 ml con agua destilada (Use cubetas homologadas).

4.7 Solución de sacarosa/ATA. En un matraz de 500 ml disuelva 250 ± 0.1 g de sacarosa de referencia en agua destilada. Adicione 78 ml de la solución de ATA (4.4), enrase y homogeneice. Esta solución se debe preparar fresca cada vez que sea necesario.

4.8 Solución de referencia de dextrana, 0.8 mg/ml. Pese con rapidez una cantidad de dextrana no secada que contenga 0.16 g de la dextrana anhidra, o sea, pese:

$$\frac{0.16 \times 100}{100 - \% \text{ de agua en la dextrana}} \pm 0.01 \text{ g de la dextrana}$$

no secada en un vaso de precipitado de 100 ml, hasta 0.1 mg.

Disuelva la dextrana mediante la adición de 1-2 ml de agua para formar una pasta. Permita que las partículas se hidraten uniformemente durante 10 min con agitación ocasional. Después adicione pequeñas alícuotas de agua hasta que desaparezca el aspecto gelatinoso. Cuando haya añadido 25 ml de agua y el aspecto gelatinoso haya desaparecido, trasvase la suspensión a un matraz de 200 ml, utilizando alrededor de 80 ml de agua. Coloque el matraz en un baño de agua hirviente durante 30 min. enfríe a la temperatura ambiental con un baño de agua fría, enrase el matraz con agua y mezcle bien. Prepare la solución estándar de dextrana diariamente, no la conserve de un día para otro.

4.9 Solución de referencia de dextrana, 0.08 mg/ml. Pipetee 10 ml de la solución de referencia (4.6) en un matraz de 100 ml, enrase con agua destilada y mezcle bien.

4.10 α -amilasa. Utilice una variedad termoestable de esta enzima con calidad grado reactivo.

NOTA: Compruebe que la dextrana no es atacada por la enzima. Para ello digiera una solución de referencia de dextrana con una gota de la enzima a 55 ± 5 °C durante 15 min, adicione ATA, filtre y mida la turbiedad igual que si se tratase de una solución de referencia.

La absorbancia ha de estar dentro del 5 % de la lectura obtenida con la misma solución de referencia de dextrana sin el tratamiento enzimático.

5 Utensilios e instrumentos

5.1 Probeta de 50 ml

5.2 Matraces aforados de 25, 100, 200 y 500 ml

5.3 Pipetas de descarga total de 1, 2, 3, 4 y 10 ml

5.4 Pipetas graduadas de 5 y 10 ml

5.5 Erlenmeyer de 200 ml con tapa esmerilada

5.6 Vaso de precipitado de 150 ml

5.7 Embudo **Büchner**, aprox. de 7 cm de diámetro

5.8 Buretas de 25 y 50 ml que aprecie 0.1 ml

5.9 Papel de filtro cuantitativo de filtración lenta (Whatman 5 ó equivalente)

5.10 Desecadora, provista de llave, con **silica gel** e indicador de humedad

5.11 Cronómetro

5.12 Balanza que aprecie 0.1 g

5.13 Balanza que aprecie 0.1 mg

5.14 Estufa

5.15 Espectrofotómetro apropiado para medir absorbancia a 720 nm, con cubetas homólogas de 2 cm. Este equipo debe cumplir con las siguientes condiciones:

- anchura de banda espectral de 10 nm o menos.
- reproducibilidad de la longitud de onda ± 0.5 nm
- reproducibilidad de la lectura ± 0.003 unidades cuando la absorbancia es 1.0

5.16 Bomba de vacío

5.17 Baños de agua. Un baño de agua hirviente, uno entre 50-60 °C y otro que posea agua a temperatura ambiente para enfriar.

5.18 Agitador de frascos

6 Procedimiento.

6.1 Preparación de las soluciones de referencia y de la curva de referencia. En 13 matraces de 25 ml prepare las soluciones de referencia según se describe más adelante. Como el alcohol debe añadirse dentro del período de 20 min después de la adición de la solución de dextrana a la de sacarosa/ATA, y como la absorbancia ha de leerse exactamente a los 20 min de añadirle el alcohol y mezclar, se recomienda sólo preparar 4 ó 6 soluciones de referencia a la vez.

- Con una pipeta graduada de 10 ml añada 8 ml de la solución de sacarosa/ATA (4.7) a cada uno de los 13 matraces. No pipetee con la boca, use un bulbo de seguridad (pera).
- Con una pipeta graduada de 5 ml o un juego de pipetas de descarga total, adicione, a los primeros 12 matraces, alícuotas de las soluciones de dextrana según se describe en la tabla 1. Con una pipeta graduada de 10 ml adicione a los 12 matraces alícuotas de agua destilada acorde con lo estipulado en la tabla 1 para lograr volúmenes de 12.5 ml en cada matraz.

- Enrase el matraz número 13 con agua destilada y mezcle mediante agitación. Éste constituye el blanco o referencia para leer la absorbancia..
- Adicione lentamente hasta el aforo, con una bureta de 50 ml, el alcohol absoluto (4.2) a los matraces de 25 ml mientras con suavidad agita el matraz rotándolo. La adición del alcohol debe consumirse entre 30 y 60 seg. Mezcle el contenido del matraz invirtiéndolo tres veces con suavidad. Comience a contar el tiempo tan pronto como haya mezclado la solución.

NOTA 1: El alcohol debe añadirse dentro de los 20 min después que le adicione la solución de dextrana a la de sacarosa/ATA.

NOTA 2: Como la absorbancia debe leerse a un tiempo predeterminado después de mezclar, se recomienda que el alcohol se añada a las soluciones de referencia de dextrana a intervalos uniformes (3 ó 4 min).

- Lea y anote la corrección de las cubetas a 720 nm, utilizando un par de cubetas homólogas de 2 cm y agua destilada.
- Aproximadamente a los 17-18 min de enrasar y mezclar, enjuague una cubeta tres veces con la solución de referencia (blanco) y llénela. En forma similar enjuague y llene la otra cubeta con una de las soluciones de referencia. Limpie las caras con un papel de seda y compruebe que éstas están libres de estriaduras.
- A los 20 min \pm 10 seg después de enrasar y mezclar, lea y anote la absorbancia de las soluciones de referencia, leídas tomando como referencia al blanco, hasta 0.001 a 720 nm.
- Repita los últimos dos pasos para cada solución de referencia de dextrana. No es necesario volver a llenar la cubeta con el blanco antes de cada lectura.
- Repita el procedimiento de estandarización de la dextrana utilizando otro conjunto de soluciones de referencia de dextrana recién preparadas.
- Calcule la concentración real de dextrana en cada matraz (tabla 1), utilizando la humedad de la dextrana (4.5) y la masa real pesada (4.7)

EJEMPLO:

Humedad de la dextrana	= 12.16 %
Masa de dextrana no secada equivalente a 0.16 g de dextrana seca	= 0.1821 g
Masa real de dextrana pesada	= 0.1904 g
Concentración de dextrana en el matraz 10	= 600 x 0.1904 g

	0.1821 g
	= 627 mg/ kg

Aplice la corrección de la cubeta a la absorbancia de cada solución de referencia. Lleve a un gráfico la concentración real de las soluciones de referencias (abcisas) y las absorbancias corregidas correspondientes (ordenadas) y trace la mejor curva. La curva de referencia será una curva gradual cuando la concentración de dextrana sea pequeña y se convierte casi en lineal para alta concentración de dextrana. Los puntos de la mejor curva caerán dentro del 5 % de la absorbancia para soluciones de referencia con baja concentración de dextrana y dentro del 3 % para alta concentración.

6.2 Determinación de dextrana en azúcares crudos.

- Pese 32.0 ± 0.1 g de azúcar crudo, trasváselos a un Erlenmeyer de 200 ml, adicione 50 ml de agua destilada, tápelo y disuelva.
- Adicione 0.1 ml de la enzima para eliminar al almidón. Mezcle bien el contenido, tape el frasco y colóquelo dentro del baño de agua, regulado a 55 ± 5 °C, con agitación, durante 15 ± 2 min. Enfríe el frasco a temperatura ambiental en un baño de agua fría.
- Trasvase la mezcla con un embudo a un matraz de 100 ml. Lave bien el frasco con agua destilada y trasvase las aguas de lavado al matraz a través del embudo. Con una bureta adicione 10.0 ± 0.1 ml de solución de ATA (5.4), enrase, tape y mezcle bien.
- Deposite la solución en un vaso de precipitado de 150 ml, adicione dos cucharaditas de té colmadas (alrededor de 6-8 g) de tierra de infusorios lavado con ácido (4.3) y mezcle bien. Filtre la mezcla a través de un embudo Büchner de 5.5 cm (use papel de filtro Whatman No. 5), utilizando vacío. Emplee los primeros 10-15 ml del filtrado para enjuagar el embudo y el colector.
- Con una bureta de 25 ml añada 12.5 ml del filtrado a cada uno de los dos matraces de 25 ml, limpios y secos.
- Adicione lentamente, con una bureta de 50 ml, el alcohol absoluto a uno de los matraces hasta el aforo, mientras lo hace agite el matraz mediante rotación suave. El tiempo consumido para añadir el alcohol oscilará entre 30 y 60 seg. Después de enrasar mezcle el contenido del matraz, invirtiendo éste con suavidad tres veces. Comience a medir el tiempo tan pronto haya terminado de mezclar.

NOTA 1: Adicione el alcohol dentro de los 20 min después de añadir la solución de ATA.

NOTA 2: Evite la agitación vigorosa del matraz, ya que esta puede provocar la coagulación de la dextrana.

Al otro matraz adiciónale agua destilada hasta el enrase y mezcle. Esta constituye la solución de referencia o blanco para la muestra.

Aproximadamente a los 17-18 min después de enrasar y mezclar enjuague la cubeta de referencia tres veces con la solución de referencia (blanco) y llénela. De forma similar proceda con la otra cubeta utilizando la solución de ensayo. Limpie las caras ópticas de las cubetas con papel de seda y compruebe la ausencia de estrías.

A los $20 \text{ min} \pm 10 \text{ seg}$ después de enrasar y mezclar lea la absorbancia de la solución de ensayo (muestra) tomando como referencia la del blanco. Haga la lectura a 720 nm y anote los resultados hasta 0.001. Inmediatamente después de leer inspeccione visualmente la cubeta de la muestra y si la turbiedad ha floculado repita el análisis.

- Si la turbiedad originada por la dextrana es más alta que la correspondiente al límite superior de la curva, repita la determinación diluyendo la muestra con sacarosa de referencia por ej. 16.0 ± 0.1 g de la muestra con 16.0 ± 0.1 g de la sacarosa estándar.

7 Expresión de los resultados

7.1 Cálculos. Aplique la corrección de la cubeta a los valores de la absorbancia de la solución de azúcar crudo. Obtenga la concentración de dextrana en el azúcar crudo directamente de la curva de referencia acorde con la absorbancia de la solución de ensayo. Si la muestra fue mezclada con sacarosa de referencia, multiplique el resultado por el factor de dilución. Expresé los resultados, en mg/kg, hasta la unidad.

7.2 Precisión. La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad no debe superar los 40 mg/kg. La diferencia absoluta entre dos resultados que cumplan las condiciones de reproducibilidad no debe exceder los 80 mg/kg.

Tabla 1 — Preparación de las soluciones de referencia de dextrana.

Matraz No.	Solución de sacarosa/ATA ml	Solución de referencia de dextrana 0.08 mg/ml	Solución de referencia de dextrana 0.8 mg/ml	Agua destilada ml	Concentración de dextrana en el azúcar, mg/kg
1	8.0	0.0	-	4.5	0
2	8.0	1.0	-	3.5	20
3	8.0	2.0	-	2.5	40
4	8.0	3.0	-	1.5	60
5	8.0	4.0	-	0.5	80
6	8.0	-	1.0	3.5	200
7	8.0	-	1.5	3.0	300
8	8.0	-	2.0	2.5	400
9	8.0	-	2.5	2.0	500
10	8.0	-	3.0	1.5	600
11	8.0	-	3.5	1.0	700
12	8.0	-	4.0	0.5	800
13	8.0	-	-	17.0	Blanco

Bibliografía

Manual de Técnicas Analíticas de Azúcares y Mielés Finales de América Latina y el Caribe (1984)

Manual Analítico de Control Unificado para la Producción de Azúcar Crudo (1982): DNMCC-MINAZ, La Habana, Cuba, 254.

Manual de Métodos Analíticos para el Control Unificado. Azúcar Crudo (1996):MINAZ, La Habana; Cuba, 199-204.

ICUMSA Methods Book (1994): Method GS1-15