
	Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-158
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-05-31

# Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón

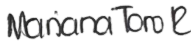

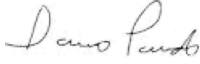
## AOXLAB S.A.S.

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> AOXLAB S.A.S	<b>Identificación:</b> PROC-TC-158
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2023-05-31

## DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-158 Procedimiento para la determinación de Amilosa/Amilopectina

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Mariana Toro Rúa	Analista de laboratorio		2023-05-31
<b>Revisó:</b>	Angela P. Patiño Pérez	Director de Calidad		2023-05-31
<b>Aprobó:</b>	Dario Pardo Pardo	Director Técnico		2023-05-31
<b>Localización del documento:</b>		<a href="http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/">http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/</a>		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2023-01-14	1	Ninguno (versión original).	MTR	APPP	DPP
Vigente	2023-05-31	2	Se actualiza el reporte de resultados que señalaban el análisis de Betaglucanos	MTR	APPP	DPP

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: <b>PROC-TC-158</b>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2023-05-31</b>

## ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	4
1.1 Objetivo.....	4
1.2 Alcance.....	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	4
2.1 Definiciones.....	4
2.2 Notaciones.....	5
3. REFERENCIAS.....	6
4. DESARROLLO.....	7
4.1 Equipos de medición.....	7
4.2 Condiciones generales.....	7
4.2.1 Revisión general.....	7
4.2.2 Estabilización.....	7
4.3 Verificación de equipos.....	8
4.4 Manejo de la muestra.....	8
4.5 Medidas de seguridad.....	8
4.6 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....	9
4.6.1 Reactivos y/o soluciones.....	9
4.6.2 Ejecución del ensayo.....	11
4.6.2.1 Pretratamiento de Almidón.....	11
4.6.2.2 Con A Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa.....	12
4.6.2.3 Determinación del almidón total.....	13
4.6.3 Cálculos.....	13
4.7 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD.....	15
4.8 Registros.....	15
5. RESPONSABILIDADES.....	16
5.1 Director técnico.....	16
5.2 Líder de Calidad.....	16
5.3 Líder de Laboratorio.....	16
5.4 Analista.....	17
6. FORMATOS RELACIONADOS.....	17
7. ANEXOS.....	17

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-158</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-05-31</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de Amilosa/Amilopectina según procedimiento K-AMYL 18/06 de Megazyme [1] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [2].

### 1.2 Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinación de Amilosa/Amilopectina	K-AMYL 18/06 de Megazyme	Espectrofotométrico

Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Almidón,
- Almidones de cereales,
- Harinas,
- Almidones puros y alimentos.

El intervalo de trabajo del método es de Amilosa 5-95% del contenido total de almidón

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

#### Calibración [4].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

#### Ensayo/prueba [3].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento

#### Procedimiento [2].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

#### Amilosa/Amilopectina [1].

<b>aoxlab</b>	Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón	Identificación: <b>PROC-TC-158</b>
	AOXLAB S.A.S	Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2023-05-31</b>

Muchas de las propiedades de los almidones de cereales que determinan su idoneidad para usos finales particulares dependen de sus relaciones amilosa / amilopectina. Estas propiedades incluyen las características de gelatinización y gelificación, la solubilidad, la formación de almidón resistente y, para el arroz, las características de cocción y textura de los granos integrales. Por lo tanto, la medición del contenido de amilosa de los almidones es un parámetro de calidad importante para el almidón.

La amilosa se determina más comúnmente en almidones de cereales mediante la medición potenciométrica, amperométrica o colorimétrica de la capacidad de unión de yodo de la amilosa con la formación resultante de complejos de inclusión de amilosa-yodo. Sin embargo, estos métodos están sujetos a incertidumbres. También se forman complejos de amilopectina-yodo, que reducen la concentración de yodo libre medida por los métodos no colorimétricos y pueden absorber en longitudes de onda similares a los complejos de amilosa-yodo en métodos colorimétricos.

El kit de prueba de amilosa/Amilopectina es adecuado para la medición y el análisis de la relación y el contenido de amilosa/amilopectina en almidones y harinas de cereales. Basado en un procedimiento de precipitación Con A.

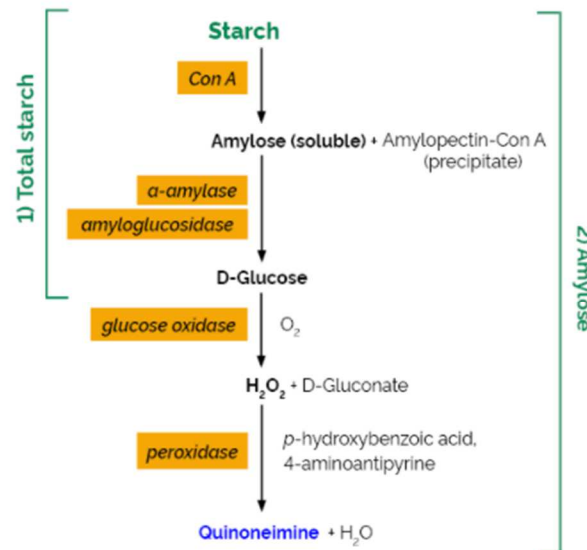



Figura 1. Procedimiento de precipitación Con A

## 2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.


“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

	<p style="text-align: center;"> <b>Procedimiento de determinación de          contenido de Amilosa y Amilopectina del          Almidón</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b> </p>	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-158</a>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <a href="#">2023-05-31</a>

“Item”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

### 3. REFERENCIAS.

- [1] Megazyme. Assay procedure for the measurement of the amylose and amylopectin contents of starch. K-AMYL 06/18.
- [2] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [4] VIM: 2012, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.

	<p align="center"> <b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b> </p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-158</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-05-31</b>

## 4. DESARROLLO

### 4.1 Equipos de medición

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

Equipos	Especificación
Balanza analítica	Resolución de 0.1 mg
Baño María	Calentamiento a 40°C
Centrífuga	Velocidad mínima de 3575 RPM
Vortex	Agitación para tubos falcón
Espectrofluorímetro	Lectura a 510 nm
Micropipetas	para dispensar 50-1000 µL

### 4.2 Condiciones generales

#### 4.2.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".


Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que se cuenta con mínimo 5 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, realizar la observación en el FOR-TC-204 "Formato para el registro de datos de Amilosa/Amilopectina", e informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

#### 4.2.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, deben verificarse los equipos, de acuerdo con lo establecido en el numeral 4.3

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-158</a>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <a href="#">2023-05-31</a>

### 4.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.

El espectrofluorímetro debe encenderse y ajustarse a los parámetros de medida, acondicionando el sistema al menos 30 minutos antes de realizar la lectura.

### 4.4 Manejo de la muestra.


Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogeneizada. Sí es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

### 4.5 Medidas de seguridad.

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-158</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-05-31</b>

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

1. El dimetilsulfóxido (DMSO) está incluido en el índice Merck (No. 3255) como irritante de la piel y, por lo tanto, debe usarse con precaución. Se absorbe a través de la piel y puede causar irritación tanto en la piel como en los ojos. Use PPE y evite salpicar el solvente. Utilizar en una campana de gases cuando sea posible.

2. La concanavalina A es nociva por inhalación, contacto con la piel e ingestión. Los efectos pueden ser irreversibles y pueden implicar teratogénesis. Use PPE apropiado cuando manipule Con A cristalino y guantes cuando manipule soluciones que contengan Con A.

3. El azida de sodio es una sustancia química tóxica y debe tratarse en consecuencia. Se agrega a los tampones únicamente como conservante. Se puede eliminar de las recetas de búfer, pero los búferes deben ser almacenado a 4 ° C.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo IX.

## 4.6 INSTRUCCIONES DE ENSAYO

### 4.6.1 Reactivos y/o soluciones:

- Ácido acético glacial 100% (CH<sub>3</sub>COOH)
- Acetato de Sodio Anhidro
- Cloruro de Sodio (NaCl<sub>2</sub>)
- Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Kit de reactivos Megazyme K-AMYL (6 botellas)
- Agua Tipo 1

#### 4.6.1.1 Botella 1

Con A. liofilizado. Estable durante > 5 años por debajo de -10 ° C.

#### 4.6.1.2 Botella 2


Amiloglucosidasa. [200 U on p-nitrophenyl β-maltodise]. (es decir, 3.300 U sobre almidón a pH 4,5 a 40°C) más amilasa fúngica (500 U en el reactivo Ceralpha reactivo a pH5,0 y 40°C). Estable durante > 5 años a 4°C.

#### 4.6.1.3 Botella 3

Tampón reactivo GOPOD. Tampón (50 mL, pH 7,4), ácido p-hidroxibenzoico y azida de sodio (0,095% p / v). Estable para > 4 años a 4 ° C.

#### 4.6.1.4 Botella 4

Enzimas reactivas GOPOD. Glucosa oxidasa más peroxidasa y 4-aminoantipirina. Polvo liofilizado. Estable durante > 5 años por debajo de -10 ° C.

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> AOXLAB S.A.S	<b>Identificación:</b> PROC-TC-158
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2023-05-31

#### 4.6.1.5 Botella 5

Solución estándar de D-glucosa (5 ml, 1,0 mg / ml) en 0,2% (p / v) de ácido benzoico. Estable durante > 5 años a temperatura ambiente.

#### 4.6.1.6 Botella 6

Muestra de referencia de almidón (con contenido especificado de amilosa). Estable durante > 5 años a temperatura ambiente

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES / SUSPENSIONES DE REACTIVOS:

Disuelva el contenido de la botella 1 en 50 ml de disolvente Con A (Tampón 3, página 4). Dividir en alícuotas de tamaño apropiado y almacenar en tubos de polipropileno por debajo de -10 ° C entre uso y manténgalo fresco durante el uso si es posible. Estable durante > 2 años por debajo de -10 ° C.

Disuelva el contenido de la botella 2 en 20 mL de tampón de acetato de sodio (100 mM, pH 4,5). Dividir en alícuotas de tamaño adecuado y almacenar en tubos de polipropileno por debajo de -10 ° C entre uso y mantener fresco durante el uso si es posible. Estable para > 2 años por debajo de -10 ° C.


Diluya el contenido de la botella 3 (tampón de reactivo GOPOD) a 1 L con agua destilada (esta es la solución 3). Úselo inmediatamente.

Disuelva el contenido del frasco 4 con 20 ml de solución 3 y transfíralo cuantitativamente al frasco que contiene el resto de la solución 3. Cubra este frasco con papel de aluminio para proteger el reactivo adjunto de la luz. Esto es Reactivo de determinación de glucosa (reactivo GOPOD). Estable durante ~ 3 meses cuando se almacena a 2-5 ° C o > 12 meses por debajo de -10 ° C.

Utilice el contenido de las botellas 5 y 6 tal como se suministran.

#### 4.6.1.7 Tampón de Acetato de Sodio

Agregue 5.9 mL de ácido acético glacial (1.05 g / mL) a 900 mL de destilado agua. Ajuste el pH a pH 4,5 mediante la adición de solución de hidróxido de sodio 1 M (4 g / 100 ml) (se requieren aproximadamente 30 ml). Agregar 0,2 g de azida sódica y ajustar el volumen a 1 L. Estable durante > 2 años a temperatura ambiente.

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-158</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-05-31</b>

#### 4.6.1.8 Disolvente concentrado Con A (600 mM, pH 6,4 sodio tampón de acetato)

Disuelva 49,2 g de acetato de sodio anhidro (N° cat. Sigma 71183), 175,5 g de cloruro sódico (N° cat. Sigma S7653), 0,5 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma cat. N°. C5080), 0,7 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma cat. No. M2670) y 0,7 g de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Sigma cat. No. M3634) en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6,4 mediante la adición gota a gota de ácido acético glacial y luego ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Estable durante 2 semanas a 4 ° C.

**NOTA:** Al preparar esta mezcla tampón, es fundamental que el pH se ajuste con mucho cuidado. Si el pH cae significativamente por debajo de 6,4, se forma un precipitado que no se volverá a disolver con el ajuste del pH. En consecuencia, este búfer debe descartarse y lote fresco preparado.


#### 4.6.1.9 Con A Solvent (concentración de trabajo)

Diluya 30 mL de Disolvente Concentrado Con A a 100 mL con agua destilada. Utilizar el día de la preparación.

### 4.6.2 Ejecución del ensayo

#### 4.6.2.1 Pretratamiento de Almidón.

- a. Pese con precisión la muestra de almidón o harina (20-25 mg al 0,1 mg más cercano) en un tubo de rosca de 10 ml<sup>®</sup>. Registre el peso de la muestra al 0,1 mg más cercano.
- b. Agregue 1 mL de DMSO al tubo mientras lo agita suavemente a baja velocidad en un mezclador vórtex. Tape el tubo y caliente el contenido del tubo en un baño de agua hirviendo hasta que la muestra esté completamente dispersa (aproximadamente 1 min). Asegúrese de que no haya grumos gelatinosos.
- c. Mezcle vigorosamente el contenido del tubo sellado a alta velocidad en un mezclador de vórtice, coloque el tubo en un baño de agua hirviendo y caliéntelo durante 15 minutos, con agitación intermitente de alta velocidad en un vórtice.
- d. Guarde el tubo a temperatura ambiente durante aprox. 5 min y agregue 2 mL de etanol al 95% (v / v) con agitación continua en un mezclador vórtex.

	<p style="text-align: center;"><b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b></p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-158</a>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <a href="#">2023-05-31</a>

- e. Agregue otros 4 mL de etanol, tape el tubo e invierta para mezclar. Se formará un precipitado de almidón. Deje que el tubo repose durante 15 minutos (o durante la noche si lo desea).
- f. Transfiera 1 mL del sobrenadante a un tubo de centrifuga de 15 mL. Añadir 3 ml de tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 4,5. Esto reduce el pH a ~ 5.
- g. Mezclar el contenido, tapar ligeramente y calentar al baño maría hirviendo durante 5 min para desnaturalizar la Con A.
- h. Centrifugar los tubos a 2000 g durante 5 min, desechar el sobrenadante y escurrir los tubos en papel de seda durante 10 min. Asegúrese de que se haya drenado todo el etanol. Utilice el sedimento en las siguientes determinaciones de amilosa y almidón.
- i. Agregue 2 mL de DMSO (con agitación suave en vórtice) al sedimento de almidón. Coloque el tubo en un baño de agua hirviendo durante 15 min y mezcle de vez en cuando. Asegúrese de que no queden grumos gelatinosos.
- j. Al retirar los tubos del baño de agua hirviendo, agregue inmediatamente 4 mL de disolvente Con A, mezcle bien y luego transfiera cuantitativamente el contenido del tubo (mediante lavados repetidos con disolvente Con A) a un matraz aforado de 25 mL.
- k. Diluir al volumen con disolvente Con A (esta es la Solución A). Si es necesario, filtre esta solución a través de papel de filtro Whatman® No. 1 (este paso será necesario para las muestras de harina integral).

**NOTA: Esta solución debe analizarse dentro de las 2 h**

#### 4.6.2.2 Con A Precipitación de amilopectina y determinación de amilosa

- l. Transfiera 1.0 mL de Solución A a un Eppendorf de 2.0 mL<sup>®</sup> tubo de microcentrifuga. Agregue 0.50 mL de solución Con A (botella 1), tape el tubo y mezcle suavemente invirtiendo repetidamente. Evite la formación de espuma de la muestra.
- m. Deje reposar el tubo durante 1 h temperatura ambiente. Centrifugar a 7000 rpm durante 10 min en una centrifuga.
- n. Transfiera 1 mL del sobrenadante a un tubo de centrifuga de 15 mL. Añadir 3 ml de tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 4,5. Esto reduce el pH a ~ 5.

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-158</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-05-31</b>

- o. Mezclar el contenido, tapar ligeramente y calentar al baño maría hirviendo durante 5 min para desnaturalizar la Con A.
- p. Coloque el tubo en un baño de agua a 40 ° C y dejar que se equilibre durante 5 min. Agregue 0.1 mL de mezcla de enzima amiloglucosidasa / amilasa e incube a 40 ° C durante 30 min. Centrifugue el tubo a 4000 rpm durante 5 min.
- q. A alícuotas de 1,0 ml del sobrenadante, añada 4 ml de reactivo GOPOD Incubar a 40 ° C durante 20 min. Incubar el Blanco de reactivo y los controles de D-glucosa al mismo tiempo.
- r. Leer la absorbancia de cada muestra y los controles de D-glucosa a 510 nm contra el blanco de reactivo.

#### 4.6.2.3 Determinación del almidón total

- s. Mezcle 0.5 mL de Solución A con 4 mL de acetato de sodio 100 mM tampón, pH 4,5.
- t. Agregue 0.1 mL de solución de amiloglucosidasa / α-amilasa e incube la mezcla a 40 ° C durante 10 min.
- u. Transfiera alícuotas de 1.0 ml de esta solución a tubos de ensayo, agregue 4 ml de reactivo GOPOD y mezcle bien. Incubar a 40 ° C durante 20 min. Esta incubación debe realizarse al mismo tiempo que las muestras y los estándares.

#### 4.6.3 Cálculos

Para el cálculo de la Amilosa/Amilopectina presentes en la muestra, se hace uso de la plantilla de cálculo K-AMYL, suministrada por el proveedor del kit de análisis.

En caso de no tener esta plantilla, hacer uso de las siguientes fórmulas para obtener resultados satisfactorios:


$$Amilosa \% (p/p) = \frac{Absorbancia (Con A Sobrenadante)}{Absorbancia (Almidon total alicuota)} \times \frac{6.15}{9.2} \times \frac{100}{1}$$

$$Amilosa \% (p/p) = \frac{Absorbancia (Con A Sobrenadante)}{Absorbancia (Almidon total alicuota)} \times 66.8$$

Donde:

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-158</b>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2023-05-31</b>

Donde 6,15 y 9,2 son los factores de dilución para los extractos de Con A y Total. Extractos de almidón, respectivamente.

	<b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-158</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-05-31</b>

#### 4.7 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Para asegurar y controlar la validez de los resultados se preparan y ensayan los siguientes controles en cada lote de análisis:

- **Blanco:** 0.2 mL de buffer acetato de sodio pH 5.0 + 4mL de GOPOD.
- **Estándar de D-glucosa:** 0.1 mL de botella 6 + 0,9mL de buffer de acetato de sodio pH 4,5. Tomar alícuota de 0,2 mL de la solución+ 4 mL de GOPOD.
- **Control de Amilosa:** 20-25 mg de muestra.

**Nota 1:** El ensayo del Blanco y Estándar de D-glucosa se lleva a cabo realizando los pasos descritos a partir del literal ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. del numeral ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

**Nota 2:** El ensayo del control de almidón se le lleva a cabo realizando todo el proceso descrito en los numerales 4.6.2.1y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

Además de lo anterior, debe realizarse un ensayo de una muestra duplicada ensayada en cada lote de análisis y un blanco de método.

#### 4.8 Registros

Los resultados se registran de la siguiente manera:

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC-204 "Formato para el registro de datos primarios de Amilosa/Amilopectina".

Los resultados serán guardados en la carpeta y en cada carpeta guardar el archivo según se requiera, así:

- Carpeta "Cálculos MegaCalc": guardar archivo de Excel con cálculos con el siguiente nombre "ES-año-158-mes-día-LX".
- Carpeta "Datos primarios": guardar archivo generado por el espectrofluorímetro con el siguiente nombre "ES-año-158-mes-día-LX-"
- Carpeta "Reportes Gen 5": guardar archivo de las absorbancias en formato PDF con el siguiente nombre "ES-año-158-mes-día-LX"

Los resultados obtenidos serán registrados en el SOFT-TC-126 "Cuadro de mando para el ensayo de Amilosa/Amilopectina."


ES: espectrofluorímetro

Año: los dos últimos dígitos del año en curso

Mes: número del mes en que se realizó el análisis

Día: día en que se realizó el análisis

X: número de análisis realizado en el día

	<p style="text-align: center;"><b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b></p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-158</a>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <a href="#">2023-05-31</a>

## 5. RESPONSABILIDADES.

### 5.1 Director técnico.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.

Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.

Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

Aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

### 5.2 Director de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.

Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

### 5.3 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.


Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.

Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.

Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.

Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

	<p style="text-align: center;"><b>Procedimiento de determinación de contenido de Amilosa y Amilopectina del Almidón</b></p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: <a href="#">PROC-TC-158</a>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <a href="#">2023-05-31</a>

#### 5.4 Analista.

Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio

Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.

Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.

Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.

Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.

Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.

Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.

Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.

Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

#### 6. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-204 "Formato para el registro de datos primarios de Amilosa/Amilopectina"

#### 7. ANEXOS.

En la siguiente dirección web se podrá encontrar información de interés acerca de la metodología empleada, el kit de reactivos utilizado y la hoja de cálculo suministrada por el proveedor:

[Prueba del kit de ensayo de amilosa amilopectina - spanish.a.m. amilosa amilopectina | Megazyme](#)