



Comunicación corta

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN MEZCLAS DE OLIGOGALACTURÓNIDOS

Short communication

Metrological characteristics in the determination of reducing sugars for quality control in oligogalacturonides mixture

Yuliem Mederos Torres[✉], Inés M. Reynaldo Escobar
y Josefa Hormaza Monte-Negro

ABSTRACT. Oligogalacturonides are lineal oligomers of D-galacturonic acid linked by α (1-4) linkage. The biological activity of the oligogalacturonides is varied that is determined by their polymerization degree and concentration. The National Institute of Agricultural Science counts on a Cuban patent for the obtaining for enzymatic manner of oligogalacturonides mixture, of distinct degrees of polymerization. The quality control of these mixtures, includes the analysis of uronic acids, neutral sugars and reducing sugars content, were the last ones are a principal factor in determination of polymerization degree average that these mixtures present. The aim of these work was carried out the analysis of the metrological characteristic of the espectrophotometric method of Nelson's for determination of content of reducing sugars in oligogalacturonides mixtures, such as linearity, precision and detection and quantification limits. As a result it was obtained that Nelson's method has a lineal character in the range of concentration of 20-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, characterized by a correlation coefficient $r = 0,999453$ and a determination coefficient $R^2 = 0,999$ which indicated good correlation between reducing sugar concentration and absorbance. The precision of the method was determined by two procedures, in which didn't surpass the established value as variability limit of 5 %. The detection limits and quantification were in the order of $2,0 \pm 0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $6 \pm 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively.

RESUMEN. Los oligogalacturónidos constituyen oligómeros lineales de ácido D-galacturónico unidos por enlaces del tipo α (1-4). La actividad biológica de los oligogalacturónidos es variada y está determinada por su grado de polimerización y concentración. El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas cuenta con una patente cubana para la obtención por vía enzimática de una mezcla de oligogalacturónidos de distintos grados de polimerización. El control de la calidad de estas mezclas, incluye el análisis del contenido de ácidos urónicos, azúcares neutros y azúcares reductores, siendo este último el factor principal en la determinación del grado de polimerización promedio de estas mezclas. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis de las características metrológicas de la técnica espectrofotométrica de Nelson, en la determinación de azúcares reductores en mezclas de oligogalacturónidos. Dentro de las características metrológicas analizadas se encontraron la linealidad, la precisión y los límites de detección y cuantificación. Como resultado se obtuvo que el método de Nelson se ajustó a un modelo lineal en el rango de concentración de 20-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para el modelo ajustado, el valor del coeficiente de correlación es $r = 0,999453$ y el coeficiente de determinación es $R^2 = 0,999$, lo cual indicó muy buena correlación entre la concentración de azúcares reductores y su absorbancia. La precisión del método fue determinado por dos procedimientos, los cuales no sobrepasaron el valor establecido como límite de variabilidad del 5 %. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en el orden de $2,0 \pm 0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y $6 \pm 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Key words: oligogalacturonides, reducing sugars, quality control

Palabras clave: oligogalacturónidos, azúcares reductores, control de la calidad

M.Sc. Yuliem Mederos Torres, Aspirante a Investigador y Dra.C. Inés M. Reynaldo Escobar, Investigador Titular del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32 700; Dra.C. Josefa Hormaza Monte-Negro, Investigador Titular del departamento de Investigaciones Analíticas, Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (ICINAZ), carretera al central "Manuel Martínez Prieto" km 2 ½ Ciudad de la Habana, Cuba

✉ yuliem@inca.edu.cu

INTRODUCCIÓN

Los oligogalacturónidos constituyen oligómeros lineales de ácido D-galacturónico unidos por enlaces del tipo α (1-4) (1), que pueden ser obtenidos por hidrólisis ácida o enzimática de los ácidos pécticos. El número de restos de D-galacturonatos que contiene el oligosacárido permite definir su grado de polimerización (2). Los oligogalacturónidos presentan una actividad biológica variada en las plantas, dentro de las cuales se encuentran la promoción de procesos morfogénicos en especies vegetales (3), y la estimulación del crecimiento vegetal (4, 5), entre otras. Dicha actividad biológica está determinada por su grado de polimerización, la especie de la planta y la concentración a la cual son aplicados.

El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas cuenta con una tecnología patentada a nivel nacional, para la obtención de mezclas de oligogalacturónidos biológicamente activos. La amplia utilidad que presenta esta mezcla en la agricultura y la biotecnología aplicada, hace necesario su inscripción como producto bioestimulante en el Registro Central de Fertilizantes (6). La autorización mediante el registro, conlleva la evaluación de este a fin de verificar sus características y bondades, así como el establecimiento de los procedimientos que pueden ser empleados como técnicas de control de la calidad en su proceso de obtención (7).

Dentro de los indicadores de calidad que pueden ser empleados en la caracterización de la mezcla de oligogalacturónidos, se encuentran la determinación del contenido de ácidos urónicos, azúcares neutros y azúcares reductores. Los azúcares reductores a su vez, constituyen el factor principal en la determinación del grado de polimerización promedio en el número que los oligogalacturónidos puedan presentar. Por lo que el análisis de las características metrológicas de la técnica de determinación de azúcares reductores es un paso indispensable en el control de la calidad de estas mezclas.

La determinación de los azúcares reductores, puede ser realizada a partir de diferentes métodos (8, 9), los cuales se basan en la reducción del cobre (II), con el empleo de una solución cúprico-alcalina. Otra alternativa en la determinación de los azúcares reductores, es el empleo de 3-metil-2-benzotiazolinonehidrazona (MBTH) como cromóforo (10). De igual forma, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede ser empleada con este fin (11, 12). No obstante, el método seleccionado para efectuar el control de la calidad en la mezcla de oligogalacturónidos, fue el de Nelson (1946) (8), el cual es un método muy sencillo, rápido y sensible, características que lo hacen compatible con un sistema de control de la calidad en un laboratorio.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de algunas características metrológicas en la técnica de determinación de azúcares reductores y de esta forma contribuir a su validación posterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las mezclas de oligogalacturónidos se obtuvieron por hidrólisis enzimática (13), con el empleo de ácido poligalacturónico (SIGMA) y el preparado pectinolítico Pectinase obtenido a partir del hongo *Aspergillus aculeatus* de la corporación Novozyme A/S. La determinación del contenido de azúcares reductores se realizó de acuerdo al método propuesto por Nelson, (1946) (8), empleando como patrón ácido galacturónico en el rango de concentraciones de 20, 40, 80, 120, 160 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las lecturas se realizaron a 520 nm, en un espectrofotómetro UV visible Genesys 6 de la corporación Thermo Electron. Las características metrológicas analizadas fueron la linealidad, la precisión y los límites de detección y cuantificación del método (14, 15). La linealidad ($n=3$) se determinó por el método de los mínimos cuadrados, con la evaluación de la pendiente, el intercepto, los coeficientes de correlación y determinación, así como la existencia de falta de ajuste, el análisis del gráfico de residuos y el coeficiente de variación del factor respuesta (CVf); este último se determinó a partir de la siguiente secuencia de ecuaciones.

$$f_i = \frac{y_i}{x_i} \quad f = \frac{\sum f_i}{n}$$

$$SD_f = \sqrt{\frac{\sum (f_i - f)^2}{n-1}} \quad CVf = \frac{SD_f}{f} * 100$$

donde:

f: factor respuesta
 y_i, x_i : absorbancia y concentración del ácido galacturónico, respectivamente
 SD_f : desviación estándar del factor respuesta
 CVf: coeficiente de variación del factor respuesta
 n: número de réplicas

La precisión se determinó en términos de repetibilidad, manteniendo el mismo procedimiento de medición, el mismo operador y sistema de medición, así como iguales condiciones de operación, con igualdad de réplicas, en un corto período de tiempo (16). La precisión se expresó mediante el CV, y se determinó como el cociente entre la desviación estándar y el valor medio del factor respuesta, expresado en por ciento. La precisión se evaluó mediante dos vías, mediante la determinación del CV (a partir del análisis de tres niveles de concentración de ácido galacturónico 20, 120 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), y mediante

el análisis de seis muestras de oligogalacturónidos en condiciones de repetibilidad. Para el análisis de la mezcla de oligogalacturónidos se realizaron diluciones de estas a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en agua desionizada. Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se determinaron mediante las fórmulas de *Long and Winefordner* (1983) (17).

$$LOD...y..LOQ = \frac{K.SD_B}{m \pm t_\alpha SD_m}$$

donde:

$K=3$ para LOD y 10 para LOQ

SD_B = desviación estándar de la absorbancia del blanco

m : media de la pendiente de las curvas de calibración

t_α = distribución t student para $\alpha=0,01$

SD_m = desviación estándar de las pendientes de las curvas de calibración

Los límites se calcularon a partir del análisis de siete blancos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la linealidad en el rango de concentraciones especificado, mostró que la regresión se ajustó a un modelo lineal descrito por la ecuación de primer grado $y = 0,14 + 3,25 \cdot 10^{-3} \cdot x$, cuyos coeficientes de correlación y determinación indican un buen ajuste entre la concentración de azúcares reductores y su absorbancia (Figura 1). La pendiente y el intercepto resultaron ser significativamente diferentes de cero, por lo que este último se tuvo en cuenta al realizar los análisis, con un 95 % de nivel de confianza. La determinación del coeficiente de variación del factor respuesta (CVf) mostró un valor de 2,3 % para el rango de concentraciones analizado, el cual es inferior al valor establecido como límite de variabilidad 5 % en análisis físico-químico (18). A su vez, el gráfico de residuos (Figura 2) mostró una distribución aleatoria de los valores, lo cual corroboró que el modelo propuesto se ajustó al modelo lineal.

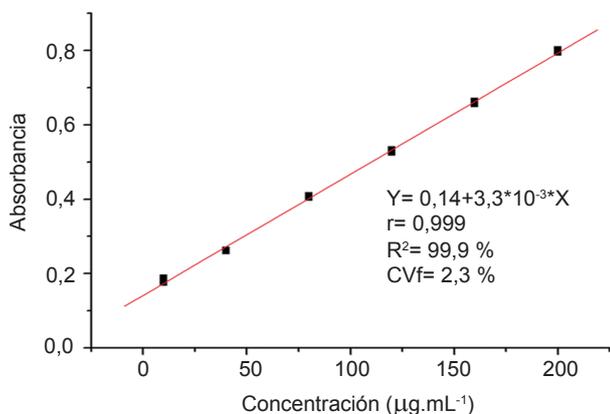


Figura 1. Curva de calibración del método de determinación del contenido de azúcares reductores por el método de Nelson (1946), empleando como patrón ácido galacturónico (se realizan tres repeticiones)

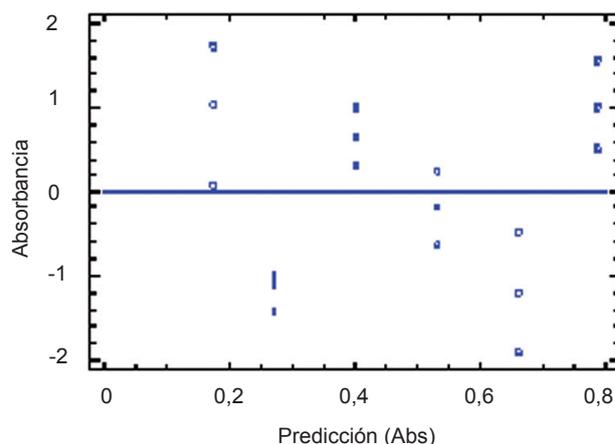


Figura 2. Gráfico de residuos, correspondiente a las curvas de calibración empleadas en la determinación de azúcares reductores

Teniendo en cuenta los resultados se puede decir que existe una correlación muy fuerte entre la concentración de azúcares reductores y su absorbancia asociada y, por tanto, la técnica de determinación de azúcares reductores de Nelson (1946) (8) cumple con la Ley de Lambert-Beer para el rango de concentraciones especificado, la cual mide la proporcionalidad que existe entre la luz absorbida por una sustancia dada y su concentración (19).

En la tabla podemos observar la evaluación de la precisión a tres niveles de concentración (inferior, medio y superior) mostró que el coeficiente de variación del método oscila entre el 1,41 y 4,62 %, mientras que este es de 2,74 %, al analizar la concentración de azúcares reductores en seis muestras de oligogalacturónidos analizadas en condiciones de repetibilidad. Estos coeficientes de variación, indican que la precisión del método es aceptable, pues están por debajo del límite de variabilidad aceptado para métodos de análisis físico-químicos que es del 5 % (18).

Los valores de límites de detección y cuantificación calculados en la tabla indicaron que el método es adecuado para la cuantificación del contenido de azúcares reductores en muestras de oligogalacturónidos, pues la concentración de estos en las muestras está en el orden de los 88, 56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dicha concentración permitirá establecer el grado de polimerización promedio en número que presentan estas mezclas. Por otro lado, el límite de detección permitió conocer que este método posee un intervalo de respuesta lineal que comprende desde 2 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estos resultados amplían el intervalo de respuesta lineal hallado por otros autores (9) al evaluar este procedimiento para la realización de determinaciones de azúcares reductores, y cuyos resultados muestran que este intervalo oscila entre 10-180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabla I. Indicadores de precisión en las curvas de calibración de ácido galacturónico empleadas en la determinación de azúcares reductores y en la concentración de azúcares reductores contenida en una disolución de 1000 µg.mL⁻¹ de la mezcla de oligogalacturónidos (n=6)

Muestra	Concentración (µg.mL ⁻¹)	Absorbancia media	DE	CV (%)	LOD	LOQ
Ácido galacturónico	20	0,176	0,0081	4,62	2,0 ± 0,6 µg.mL ⁻¹	6 ± 2 µg.mL ⁻¹
	120	0,540	0,0076	1,41		
	200	0,822	0,0327	3,98		
Mezcla de oligogalacturónidos	Concentración (µg.mL ⁻¹)					
	1000	88,56	2,43	2,74		

DE: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

Esta respuesta lineal, abre la posibilidad de efectuar la cuantificación de azúcares reductores en sistemas en los cuales estos se encuentren en menor concentración.

De manera general y a modo de conclusión, teniendo en cuenta todas las características metrológicas analizadas anteriormente, se puede decir que la técnica de determinación de azúcares reductores de acuerdo al método propuesto por Nelson (1946) (8), puede ser empleado como técnica de control de la calidad en mezclas de oligogalacturónidos, ya que cumple con el criterio de linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación adecuados para este fin.

REFERENCIAS

1. Mederos, Y.; Hormaza, J.; Reynaldo, I. *et al.*. Caracterización de mezclas de oligogalacturónidos bioactivos. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 2011, vol. 42, no. 2-3, 5 p.
2. Barton, C.; Tailford, L.; Welchman, H. *et al.*. Enzymatic fingerprinting of *Arabidopsis pectic* polysaccharides using polysaccharide analysis by carbohydrate gel electrophoresis (PACE). *Planta*, 2006, vol. 224, no. 1, p. 11. ISSN: 0032-0935.
3. Hernández, M.; Suárez, L. y Valcárcel, M. Empleo del Pectimorf en la micropropagación de *Spathiphyllum* sp. *Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 3, p. 56-58.
4. Alvarez, I.; Reynaldo, I.; Cartaya, O. *et al.*. Efectos de una mezcla de oligogalacturónidos en la morfología de hortalizas de importancia económica. *Cultivos Tropicales*, 2011, vol. 32, no. 3, p. 69-74.
5. Izquierdo, H.; González, M.; Núñez, M. *et al.*. Influencia de un oligogalacturónido en la aclimatación de vitroplantas de Banano (*Musa* spp) del clon FHIA-18 (AAAB). *Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 1, p. 37-42.
6. I.d.S. Lista oficial de fertilizantes autorizados. Ciudad de La Habana: Registro Central de Fertilizantes. 2010. 130 p. ISBN 978-959-246-116-1.
7. CETMED. Directrices sobre buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos. Regulación No. 16:2006. Ciudad de la Habana, Cuba: 2006. 54 p.
8. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
9. González, G. y Castellanos, O. Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. *Revista Ingeniería e Investigación*, 2003, vol. 52, p. 5-17.
10. Anthon, G. y Barrett, D. Determination of Reducing Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 2002, vol. 305, no.2, p. 287-289.
11. Guan, Y.; Yu, P.; Yu, S. *et al.*. Simultaneous analysis of reducing sugars and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde at a low concentration by high performance anion exchange chromatography with electrochemical detector, compared with HPLC with refractive index detector. *Journal of Dairy Science*, 2012, vol. 95, no. 11, p. 6379-6383.
12. Wahlström, R.; Rovio, S. y Suurnäkki, A. Analysis of mono- and oligosaccharides in ionic liquid containing matrices. *Carbohydrate Research*, 2013, vol. 373, no. 9, p. 42-51.
13. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. Cabrera, J.; Iglesias, R.; Hormaza, J. *et al.*. Cuba, Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Patente de invención 22859. 2003.
14. Ortega, M.; Rodríguez, C. y Zhurbenko III, R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 2010, vol. 48, no. 2, p. 162-176.
15. Perdomo, R.; Otero, M. y González, M. Validación del método del sulfato de brucina para la determinación de nitrógeno forma de nitrato en aguas superficiales. *Revista Cubana de Química*, 2012, vol. 24, no. 2, p.155-165.
16. ISOI. International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms ISO/IEC 99:2007. Geneva, Switzerland: ISO/IEC. 2007. 92 p.
17. Long, G. y Winefordner, J. Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 1983, vol. 55, no. 7, p. 712-724.
18. ININ. Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos. NC TS 368: 2010. Ciudad de La Habana: NC/TS. 2010. 48 p.
19. Owen, T. Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy. Germany: Agilent Technologies. 2000. 136 p. Publication number 5980-1397E.

Recibido: 8 de noviembre de 2011

Aceptado: 15 de julio de 2013