

Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores¹ a partir de sus posibilidades químicas

Gloria Helena González Blair*
Óscar Fernando Castellanos Domínguez**

Alternatives for modifying the Somogyi-Nelson method for determining reducing sugars by using their thermal possibilities

RESUMEN

En el presente artículo se plantea modificar el método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores, considerando que el arsenato de sodio, uno de sus constituyentes, es una sustancia tóxica tendiente a desaparecer del mercado. Se explican los principios químicos que utiliza el método de Somogyi - Nelson para la determinación de azúcares reductores, tomando como referencia los protocolos propuestos por Hawk *et al.* (1954), Collmer *et al.* (1988), Castellanos (1995) y el Departamento de Química de la Universidad Nacional (adaptado del protocolo de Fischer [1989]). Se evalúan por separado las reacciones propias de los reactivos de Somogyi y Nelson; se analiza la reacción entre los dos componentes y un azúcar reductor y se incluyen dos opciones de modificación: el uso de fosfatos y el de silicatos. En el primer caso se propone sustituir el arsenato de sodio por un fosfato (KH_2PO_4 previamente seco a 110 °C) y en el segundo, por un silicato (Na_2SiF_6 previamente seco a 110 °C).

PALABRAS CLAVES:

Somogyi-Nelson, azúcares reductores.

ABSTRACT

This article proposes modifying the Somogyi-Nelson method for determining reducing sugars, considering that sodium arsenate (one of its constituents) is a toxic substance which is tending to disappear from the market. The chemical principles used in the Somogyi-Nelson method for determining reducing sugars are explained, taking those protocols proposed by Hawk *et al.* (1954), Collmer *et al.* (1988), Castellanos (1995) and the Universidad Nacional's Chemistry Department (adapted from Fischer's protocol (1989)) as reference. The reactions of Somogyi and Nelson's reagents are evaluated separately. The reaction between the two components and a reducing sugar is analysed and two alternatives for modifying the method are included: the use of phosphates and that of silicates. It is proposed to substitute sodium arsenate for a phosphate (KH_2PO_4 previously dried at 110 °C) in the first case and in the second for a silicate (Na_2SiF_6 previously dried at 110 °C).

KEY WORDS:

Somogyi-Nelson, reducing sugars.

* Ingeniera química, candidata a M.Sc, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

** Ingeniero Químico. PhD. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

1. Los monosacáridos y la mayor parte de los disacáridos contienen un grupo carbonilo reactivo, fácilmente oxidable a diversos productos por tratamiento con soluciones alcalinas de iones metálicos reducibles, por ejemplo Cu^{+2} o Ag^+ . Estos carbohidratos, entre los que están la glucosa, maltosa, celobiosa y lactosa, se clasifican en ocasiones como azúcares reductores (Horton *et al.*, 1995), por reducir al licor de Fehling, que es un tartrato cupropotásico en solución alcalina, dando origen a un precipitado de hidróxido u óxido cuproso (Rakoff *et al.*, 1980).

INTRODUCCIÓN

La biotecnología moderna se ha ocupado no sólo del diseño de procesos productivos para la obtención de metabolitos de interés, o de la manipulación genética de los microorganismos, sino que también ha establecido una serie de técnicas tanto para el control de la calidad de los productos como para el estudio de los procesos biotecnológicos, cuya validación es requisito indispensable dentro de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y requiere entrenamiento del personal, mantenimiento y calibración del equipo, protocolo de métodos analíticos (PMA), patrones de referencia, criterios de aceptación de la muestra, control de las materias primas, estabilidad de las soluciones y protocolo de validación (Rosales *et al.*, 1998).

Desde esta perspectiva y teniendo en cuenta que los azúcares reductores (glucosa, maltosa, maltotriosa, maltopentosa y dextrinas, entre otros) deben cuantificarse mediante técnicas objetivas, confiables y reproducibles (Menegues *et al.*, 1991), se han utilizado, a través del tiempo, diferentes métodos: la cromatografía de papel (Maier, 1978), los volumétricos de ferricianuro (NTC 926) o de Eynon - Lane (Bernal de Ramírez, 1994), el gravimétrico de Allihn (Molinari, 1920), los espectrofotométricos de Somogyi-Nelson (Ros *et al.*, 1992), DNS y DNS - fenol (Castellanos, 1995); así como los de cromatografía HPLC (Ros *et al.*, 1992).

Sin embargo, independientemente del procedimiento aplicado, es deber del investigador simplificar y racionalizar el análisis con la sensibilidad, versatilidad y especificidad del instrumental moderno para repetir con exactitud los experimentos programados (Menegues *et al.*, 1991), ya que necesita conocer la técnica a profundidad para escribir un protocolo del método analítico lo suficientemente claro y exento de ambigüedades, que incluya la definición del sistema que hay que validar e identifique cada parámetro que se debe estudiar, la forma de medirlo y monitorearlo, así como los criterios de aceptación (Rosales *et al.*, 1998).

Por otra parte, el método de Somogyi-Nelson, altamente reproducible, determina azúcares reductores presentes en concentraciones muy bajas (20 - 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$), razón por la cual se buscó implementarlo en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional, donde se trabajaba fundamentalmente con una téc-

nica mil veces menos sensible, la del DNS (20 - 180 mg/ml), útil en procesos donde el contenido de azúcares reductores es alto pero inservible para la determinación de trazas. Ahora bien, emplear el procedimiento de Somogyi - Nelson implicó familiarizarse con su composición y encontrar que emplea como constituyente arsenato de sodio, una sustancia tóxica tendiente a desaparecer del mercado, la cual deberá reemplazarse si se quiere evitar que la técnica salga del portafolio de opciones. No obstante, definir el sustituto químico significa conocer los fundamentos del método, los cuales no están reportados en la literatura reciente y por consiguiente deben buscarse en la bibliografía clásica.

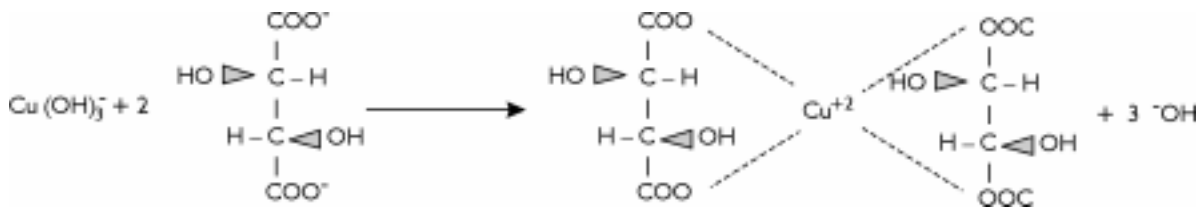
Así, en el presente artículo se estudian los principios químicos que utiliza el método de Somogyi - Nelson para la determinación de azúcares reductores y se proponen alternativas de modificación, teniendo en cuenta que el método se fundamenta en la oxidación primaria cualitativa de los azúcares reductores y que el compuesto oxidado puede llevar a obtener una concentración relativa de los productos. Esta oxidación se realiza con el reactivo de Somogyi en su medio básico (pH 9), formando un hidróxido de cobre. En estas condiciones se oxidan en su medio ácido (pH 1,2 - 2,0) el arsenato y molibdato del reactivo de Nelson, dando origen a la formación de molibdeno azul, coloración que se mantiene estable por 24-36 horas y que puede leerse mediante un espectrofotómetro (Castellanos, 1995), requiriéndose una instrucción de análisis completa y el calibrado con patrones de referencia específicos, en relación con el problema y el método (Merck, 1987).

METODOLOGÍA

Se partió de los protocolos propuestos por Hawk *et al.* (1954), Collmer *et al.* (1988), Castellanos (1995) y el Departamento de Química de la Universidad Nacional (adaptado del protocolo de Fischer [1989]), los cuales se estudiaron desde el punto de vista químico. En todos los casos el procedimiento para análisis con el reactivo de Somogyi - Nelson fue el siguiente: en un tubo de ensayo aforado, colocar 0,5 ml de reactivo de Somogyi y 0,5 ml de la solución que se va a estudiar (solución de glucosa entre 20 y 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Incubar esta mezcla du-

Cuadro 1. Recopilación de diferentes procedimientos para la preparación de reactivos de Somogyi - Nelson

Método		PROCEDIMIENTO
Castellanos (1995)	Reactivo de Somogyi	Mezclar el componente a) con el componente b) y el volumen total se lleva a 1.000 ml. Período de conservación del reactivo: 2 - 3 meses (Castellanos, 1995).
	Componente a):	Disolver 24 g de carbonato de sodio deshidratado y 12 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada. A esta solución se le añade una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 g en 40 ml de agua) y finalmente 16 g de NaHCO_3 .
	Componente b):	Disolver 18 g de Na_2SO_4 en 500 ml de agua caliente (80 °C) y calentar hasta ebullición durante cinco minutos.
	Reactivo de Nelson	Disolver 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua destilada caliente (60°C). Enfriar la solución hasta 5 - 10 °C y añadirle 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, que a su vez contiene 3 g de arsenato de sodio. Completar la solución a 500 ml. Incubar a 40°C durante 24 - 48 horas. Si es necesario, puede filtrarse. Período de conservación del reactivo: 2 - 3 meses.
Departamento Químico UN.	R. Somogyi I:	(800 ml) Mezclar 12 g de tartrato de sodio y potasio, 24 g de carbonato de sodio deshidratado y 144 g de sulfato de sodio, llevar a volumen y guardar indefinidamente (Fisher, 1989).
	R. Somogyi II:	(200 ml) Mezclar 4 g de sulfato de cobre pentahidratado y 36 g de sulfato de sodio, llevar a volumen y guardar indefinidamente.
	R. de Nelson:	(500 ml) Mezclar 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua destilada, 21 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0,6 g de arsenato monoácido de sodio en 25 ml de agua destilada. Llevar a volumen. Incubar a 37° por 24-48 horas. Almacenar en botellas opacas protectoras de la luz.
Collmer, Ried y Mount (1988)	Reactivo de cobre:	Se prepara disolviendo 12 g de tartrato de sodio y potasio y 24 g de carbonato de sodio anhidro en 250 ml de agua. Los siguientes reactivos se adicionan mientras se agita: 1) una solución de 4,0 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua; 2) 16 g de bicarbonato de sodio; y 3) una solución de 180 g de sulfato de sodio anhidro en 500 ml de agua, hervir antes de adicionarla para sacarle el aire. Llevar la solución a 1 L con agua. Durante la primera semana se forma un precipitado y puede removerse mediante filtración o sedimentación y el sobrenadante claro se utiliza para los ensayos (Collmer <i>et al.</i> , 1988).
	R. de arseno-molibdato:	Se prepara disolviendo 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua, con adición de 21 ml de ácido sulfúrico del 96% y de una solución de 3,0 g de arsenato hidrógeno disódico heptahidratado en 25 ml de agua. La solución final se incuba a 37° por 24 h antes de utilizarla y se almacena en frasco oscuro.
Hawk, Oser y Summerson (1954)	R. de cobre	El día que se va a usar, colocar 4 ml de la solución B en un balón aforado de 100 ml, completar a 100 ml con la solución A, y mezclar (Hawk, 1954).
	Solución A:	Disolver 50 g de carbonato de sodio anhidro, 50 g de sal de Rochelle, 40 g de bicarbonato de sodio y 400 g de sulfato de sodio anhidro en aproximadamente 1600 ml de agua destilada, y diluir a 2 L. Mezclar y filtrar si la solución no queda clara. Almacenar a temperatura ambiente. Si se forman sedimentos a los pocos días, filtrar nuevamente.
	Solución B:	Disolver 150 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada y diluir a 1 L. Adicionar 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, y mezclar.
	R. de arseno-molibdato:	Disolver 100 g de molibdato de amonio en 1.800 ml de agua destilada. Adicionar 84 ml de ácido sulfúrico concentrado, con agitación. Disolver 12 g de ortoarsenato disódico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 100 ml de agua destilada, y adicionar con agitación a la solución de molibdato acidificada. Llevar la mezcla a una incubadora a 37 °C por uno o dos días. Almacenar en frasco ámbar opalizado. Esta solución es estable indefinidamente.



rante 40 minutos en un baño María con agua hirviendo. Enfriar la solución y añadir 0,5 ml de reactivo de Nelson agitando suavemente. Completar con agua hasta 5 ml. Medir la absorbancia en celda de 1 cm de ancho a la longitud de onda de 610 nm, usando agua destilada como blanco (Castellanos, 1995). Por último, se plantearon dos opciones de modificación química.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los procedimientos utilizados para preparar los reactivos de Somogyi - Nelson. En él se observa cómo las formulaciones del reactivo de Nelson presentan una preparación relativamente estándar, mientras que el reactivo de Somogyi varía mucho en composición y técnica de preparación.

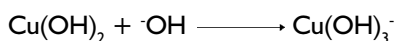
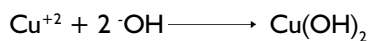
ANÁLISIS QUÍMICO

Principios químicos del componente a) de Somogyi

El carbonato de sodio es un sólido blanco, bastante soluble en agua, cuyas disoluciones tienen reacción alcalina por efecto de la gran hidrólisis que experimenta (Puig, 1934):



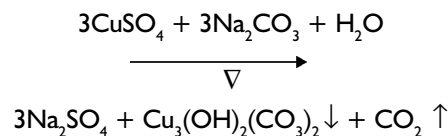
El tartrato de sodio y potasio reacciona en medio alcalino, con el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dando origen a un complejo cupro tartárico,



intensamente azul y estable, no precipitable por los álcalis.

Entonces, se dispone de un complejo que contiene Cu^{+2} en medio alcalino, capaz de oxidar los aldehídos pero no las cetonas (Martínez, 1972).

Además, en solución acuosa, el CuSO_4 puede reaccionar en frío con el carbonato de sodio para producir el hidrocarbonato azurita, insoluble en agua (Puig, 1934).



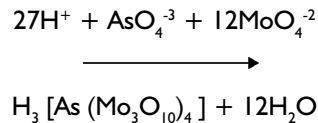
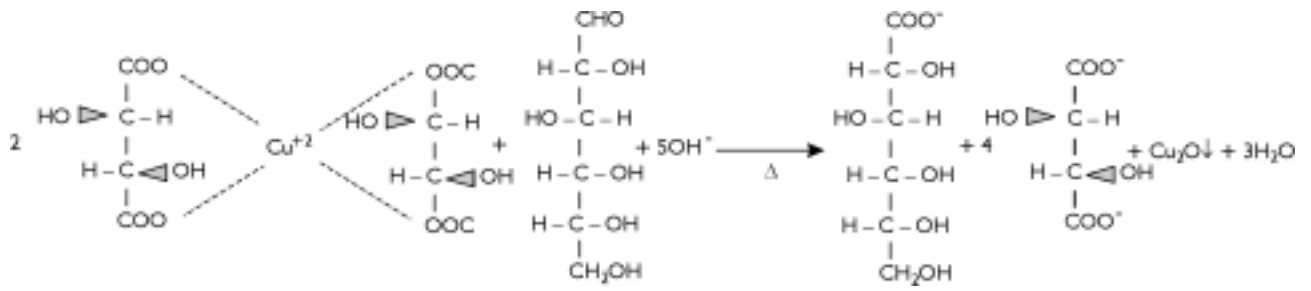
Por último, el bicarbonato de sodio, sólido blanco, poco soluble en agua, cuya solución presenta reacción débilmente alcalina (Puig, 1934), se une con el carbonato de sodio para dar origen a una solución *buffer* que impide el cambio en la concentración de iones hidrógeno (Getman *et al.*, 1950) cuando se producen pequeñas cantidades de ácidos o bases en el medio, asegurando él mismo un pH alcalino.

Principios químicos del componente b) de Somogyi

El sulfato de sodio es un cuerpo sólido e incoloro, cuya máxima solubilidad se presenta a los 33 °C, y sus disoluciones saturadas en caliente ofrecen en frío el fenómeno de la sobresaturación: en este estado, cuando por agitación u otra causa cristalizan, lo hacen con siete moléculas de agua (Puig, 1934).

Principios químicos del reactivo de Nelson

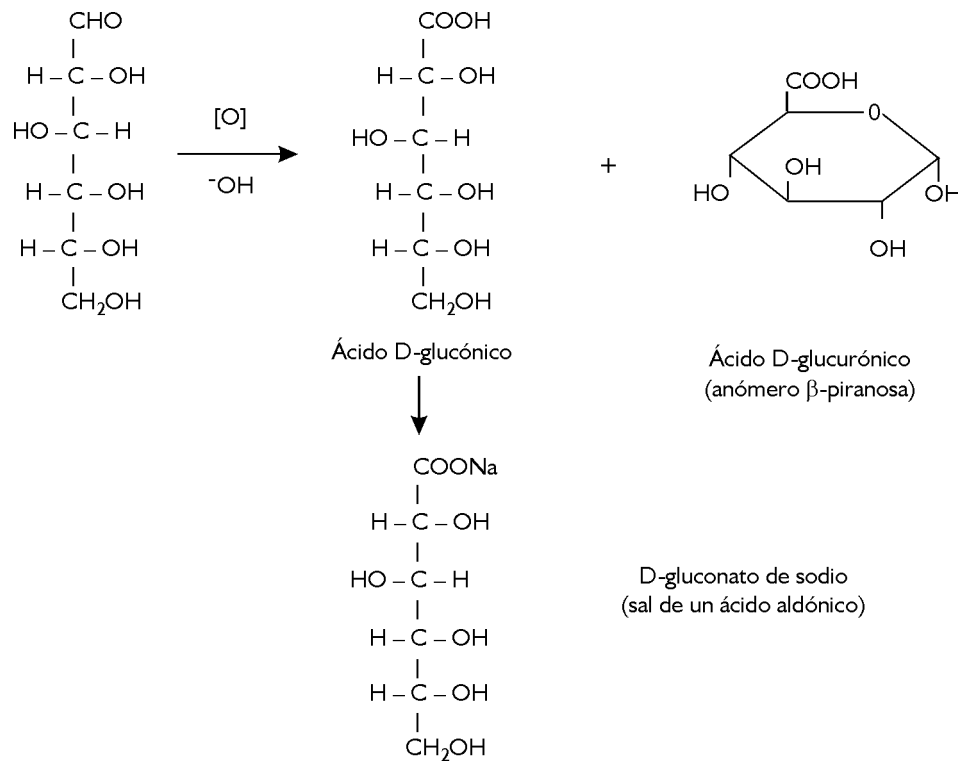
El molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico y de arsenato de sodio da origen al ácido molibdoarsénico, complejo de color amarillo:



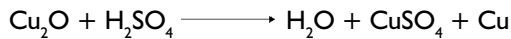
Análisis de la reacción con el reactivo de Somogyi

Al colocar en el tubo de ensayo el reactivo de Somogyi y la solución de azúcar reductor, el reactivo en su medio básico (pH 9) oxida el azúcar, formando un óxido de cobre (figura de arriba).

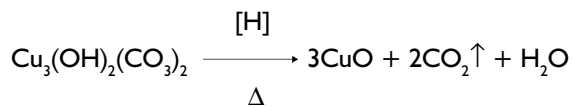
Es importante recordar que cuando se opera en caliente, el Cu_2O se forma al tratar las sales cúpricas por reductores enérgicos, porque en frío se forma hidróxido cuproso (CuOH) de color amarillo. Entonces, al añadir un azúcar reductor al reactivo de Somogyi y calentar, se produce un precipitado de cobre reducido bajo la forma de hidrato cuproso y óxido cuproso, que oscila entre los colores rojo y amarillo (Puig, 1934) y se mantiene inalterado gracias a la presencia del sulfato de sodio utilizado para minimizar la entrada de oxígeno atmosférico a la solución y evitar así la reoxidación del óxido cuproso (Plummer, 1996).



El Cu_2O es un cuerpo sólido, cristalino, de color rojo rubí, insoluble en el agua (Puig, 1934), que en ocasiones puede aparecer de color amarillo-anaranjado; dependiendo del tamaño de las partículas, una coloración verde también es posible cuando se ha agregado exceso de reactivo (Martínez, 1972). Los ácidos lo atacan, pero no dan la sal cuprosa correspondiente, sino la sal cúprica, porque queda cobre libre:



Igualmente, es viable que el hidrocarbonato de cobre que pudiese estar presente como precipitado azul, al ser calentado, dé origen al óxido cúprico, el cual se observa en forma de polvo negro, insoluble en agua, que por la acción del calor cede oxígeno con facilidad, en presencia de cuerpos reductores (Puig, 1934).



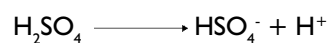
Así pues, la glucosa se oxida, sea por oxidación del C_1 (el carbono aldehídico) para producir un ácido aldónico, o por oxidación del carbón numerado con la cifra más alta (el carbono que lleva el alcohol primario) para producir un ácido aldurónico (Horton *et al.*, 1995). El primero de ellos, el ácido D-glucónico, es estable en forma de sus sales, ya que se lactoniza. Las lactonas obtenidas pueden ser γ o δ y frecuentemente se obtiene una mezcla de ambas (Rakoff *et al.*, 1980).

Por otra parte, las disoluciones de las sustancias electrolíticas como el sulfato, el carbonato y el bicarbonato de sodio se suponen constituidas de dos partes: una sin disociar, formada por las moléculas del ácido, de la base o de la sal, y la otra disociada o ionizada, constituida por radicales o iones de ambos signos. Como la disolución se halla en estado neutro, eléctricamente hablando, al verificarse el fenómeno de la ionización deberán producirse iguales cantidades de electricidad positiva y negativa.

La porción de sustancia que permanece sin disociar en la solución se supone inactiva, o sea, no toma parte en la conducción de la corriente; ejerce un efecto normal sobre las propiedades físicas de la disolución, tales

como cambios de la tensión de vapor, puntos de ebullición y de congelación; no comunica a la disolución ninguna de las propiedades características de los ácidos, de las bases o de las sales, y no interviene directamente en las reacciones llamadas de desplazamiento y de doble descomposición. En cambio, la porción de sustancia disociada en sus iones es la que comunica a las disoluciones las propiedades especiales, según la naturaleza de la sustancia disuelta. Así, el equilibrio se establece en proporciones muy diferentes entre el primero y el segundo miembros, por lo que la ionización es prácticamente completa en disoluciones muy grandes (Puig, 1934).

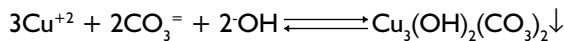
Una vez establecido el equilibrio iónico, si por algún medio se hacen desaparecer iones el equilibrio se rompe y se restablece espontáneamente, disociando nuevas cantidades de producto no ionizado. Si la eliminación de iones continúa, puede llegarse a un punto en el cual las cantidades de sustancia no ionizada sean prácticamente nulas. Esta eliminación se logra mediante la electrólisis, el desplazamiento o sustitución y la doble descomposición. La primera de ellas no es viable, porque no se está colocando corriente eléctrica a las soluciones. Sin embargo, el fenómeno de desplazamiento o sustitución tiene lugar cuando un elemento actúa sobre un ácido diluido o sobre una solución salina. Así, al reaccionar el cobre metálico con ácido sulfúrico diluido, se desprende hidrógeno, porque el cobre toma la carga eléctrica del ion H^+ y éste se queda en estado neutro, desprendiéndose como gas (Puig, 1934):



En igual forma, es posible la doble descomposición, la cual se verifica entre los cuerpos disueltos en el agua. La reacción tiene lugar entre los iones que se hallan parcialmente disociados. De momento se rompe el equilibrio en la parte ionizada y con esta diferencia, al cabo de cierto tiempo se llega a un nuevo equilibrio, dando lugar a distintas sustancias en estado de disolución, en estado iónico y en estado molecular, con reacciones reversibles que regulan las reacciones de equilibrio entre ellas.

Entonces, para el caso propuesto, las sustancias moleculares disueltas son: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Na_2SO_4 , NaHSO_4 , K_2CO_3 , KHCO_3 , K_2SO_4 , KHSO_4 , CuSO_4 , NaOH , KOH , H_2O y H_2SO_4 ; mientras que las sustancias iónicas son: $-\text{OOC}(\text{CHOH})_2\text{COO}^-$, Na^+ , CO_3^{2-} , Cu^{+2} , SO_4^{2-} , H^+ , K^+ y OH^- .

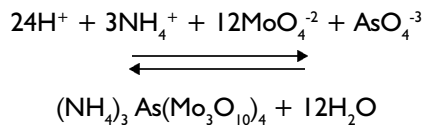
Como adicionalmente hay productos resultantes que se separan de la solución por ser insolubles o volátiles (Faucher, 1964), ya no puede establecerse el equilibrio con las sustancias primitivas, por lo que éstas van disociándose. Sirve de ejemplo para esto la siguiente reacción:



El hidrocarbonato de cobre, por ser insoluble, se va al fondo de la solución, y en último término no quedaría Cu^{+2} en el medio; sin embargo, el $\text{Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$ se disocia mediante calor para dar CuO , que con el ácido sulfúrico presente en el medio o en el reactivo de Nelson, regenera el sulfato de cobre.

Análisis de la reacción con el reactivo de Nelson

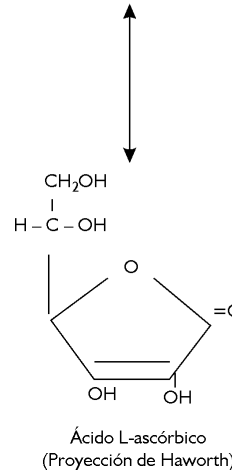
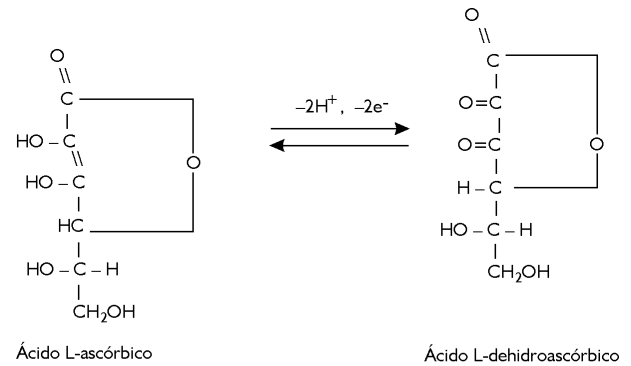
El molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico y arsenato de sodio da origen al ácido molibdoarsénico (molibdoarsenato de amonio), complejo de color amarillo:



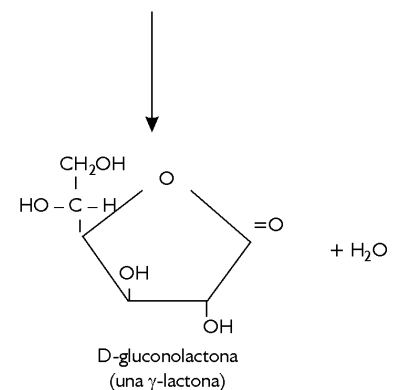
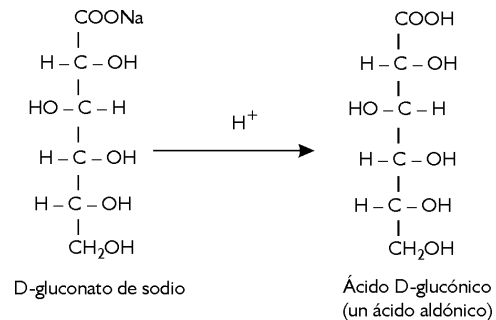
Complejo de color amarillo

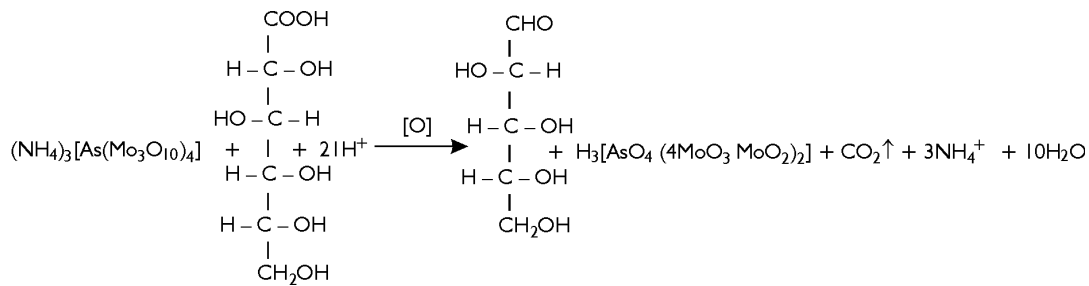
Análisis de la reacción entre los reactivos de Somogyi y Nelson

En este instante, la reacción de Somogyi - Nelson inicia el consumo de agentes reductores tales como ácido ascórbico o ácidos carboxílicos derivados de las aldosas (ácidos aldónicos o aldurónicos) (Horton *et al.*, 1995).



Mientras tanto, el ácido sulfúrico se combina con el D-gluconato de sodio, para liberar el ácido D-gluconico, que lactoniza en sus formas γ o δ :



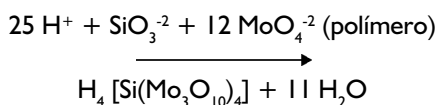
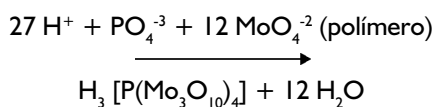
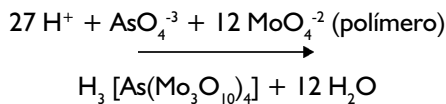


Complejo de color amarillo Ácido glucónico D-arabinosa Azul de molibdeno

Entonces, el molibdoarsenato de amonio reacciona con el ácido aldónico (por ejemplo, ácido D-glucónico) obtenido durante la oxidación del azúcar reductor con el reactivo de Somogyi, reduciendo el complejo amarillo a azul de molibdeno y oxidando el ácido a una aldosa con un átomo de carbono menos que el ácido aldónico inicial (Rakoff *et al.*, 1980) (figura anterior).

Como la cantidad de azul de molibdeno formado y el porcentaje de sulfato de cobre que dejó de reaccionar en el reactivo de Somogyi son proporcionales a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra, la intensidad del color puede medirse con espectrofotómetro, relacionando la absorbancia con la concentración.

En general, en condiciones adecuadas los iones arsenato, fosfato, silicato y algunos otros iones reaccionan con el molibdato para formar complejos como el ácido molibdoarsénico, el amonio molibdafosfato y el ácido molibdosilícico; así una reducción controlada de estos compuestos poliméricos produce un complejo azul de molibdeno. Las reacciones que se llevan a cabo son (Gutiérrez, 1982):



Esto significa que el método presenta interferencia de los silicatos y de los fosfatos. La interferencia debida a $\text{Si-Si}(\text{OH})_4$ no es significativa hasta concentraciones de 10 ppm de $\text{Si-Si}(\text{OH})_4$, cuando los iones silicato dan origen a la existencia de dos formas del ácido silicomolibdico: las formas α y β , isoméricas, que difieren entre sí únicamente en el grado de hidratación y cuya proporción depende de la concentración de las diferentes especies de molibdato, las cuales están en función de la relación ácido/molibdato. El isómero β se origina a partir del ion $\text{Mo}_4\text{O}_{13}^{+2}$ y su formación se favorece con un pH bajo y una relación molar $\text{H}^+:\text{Mo}$ de 3:5; este isómero es inestable y lenta e irreversiblemente se transforma en el complejo. El isómero α se obtiene como el principal producto de la reacción, cuando el pH de la disolución se encuentra en el intervalo 3,7 y 4,6; por tanto, es necesario controlar la acidez de la disolución cuidadosamente durante el proceso de reducción con objeto de evitar la formación del complejo de azul de molibdeno, ya sea por el exceso de molibdato del reactivo o de los heteropolíácidos² de otros elementos. Afortunadamente, la formación del complejo silicomolibdico toma más de quince minutos (Gutiérrez, 1982).

Los componentes análogos de fósforo también pueden estar presentes y en las condiciones ácidas en que se lleva a cabo la reacción (pH mayor de 0,7), existe el riesgo de que los fosfatos orgánicos se hidrolicen y alte-

2. Los heteropolíácidos (HPA) son ácidos que incorporan aniones polioximetallatos (llamados heteropolianiones); los hay de varias clases, pero los de mayor importancia son aquellos que se utilizan para catálisis. La fórmula general de un heteropolianión es $[\text{XM}_{12}\text{O}_{40}]^{x-}$, donde X es el átomo central (Si^{+4} , P^{+5} , etc.) y x es el estado de oxidación del metal u otro metal (Mo^{+6} , W^{+6} , V^{+5} , etc.). El $\text{H}_3 [\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ y el $\text{H}_3 [\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ son ejemplos de heteropolíácidos (Kozhevnikov, 1987).

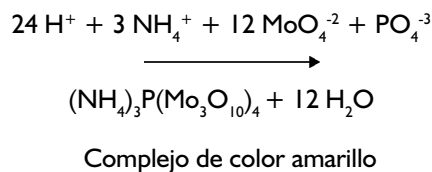
ren los resultados. Así, Strickland y Solórzano (1966) encontraron que sólo el adenosinmonofosfato reacciona apreciablemente en una hora, mientras que Gutiérrez (1982) reporta que en medios no salinos existe una hidrólisis del 5,0% del fosfato orgánico más reactivo.

ALTERNATIVAS DE MODIFICACIÓN

Considerando la toxicidad del arsenato de sodio, su dificultad para conseguirlo en el mercado y que el presente análisis busca sustituirlo para cuantificar la presencia de azúcares reductores, sin alterar el principio del método, se plantearon dos alternativas químicas basadas tanto en su capacidad de interferir como de reaccionar con agentes reductores para dar origen a complejos coloreados. Esto es, sustituir el arsenato de sodio por fosfatos o por silicatos. A continuación se revisan desde el punto de vista químico las dos técnicas:

Sustitución del arsenato de sodio por fosfatos

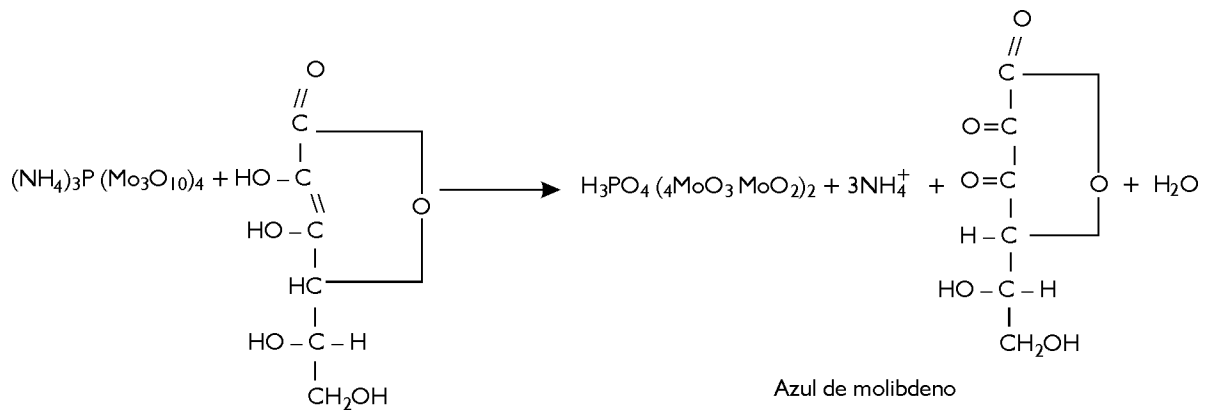
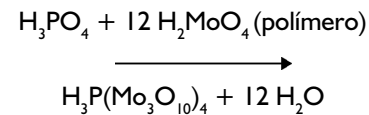
Para el análisis de fosfatos se agrega una disolución de molibdato de amonio en ácido sulfúrico y una disolución de ácido ascórbico a la disolución de la muestra (fosfato), para formar el complejo amarillo de ácido fosfomolibdico (molibdofosfato de amonio):



Al tratar con un agente reductor como el ácido ascórbico, el complejo ácido se reduce a azul de molibdeno. Normalmente la reducción es lenta, pero la adición de un catalizador como el tartrato de antimónilo hace que se lleve a cabo con rapidez (Gutiérrez, 1982).

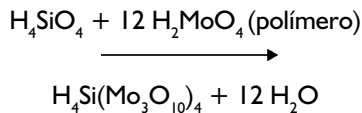
Al igual que en el caso anterior, la cantidad de azul de molibdeno formado es proporcional a la concentración de fósforo expresada como ortofosfato presente en la muestra y la intensidad del color puede medirse con espectrofotómetro. El método presenta interferencia de los silicatos y arsenatos, por lo que se requiere reducir el arsénico a arsenito usando metabisulfito o tiosulfato, antes de la adición de reactivos (Gutiérrez, 1982).

Ahora bien, cuando se utiliza cloruro estañoso como agente reductor, la reacción de color también se basa en la reacción del fosfomolibdeno azul (PMB). Los iones ortofosfato PO_4^{3-} reaccionan con ácido isopolimolibdico en solución de ácido sulfúrico para dar ácido fosfomolibdico, el cual es entonces reducido con SnCl_2 y origina fosfomolibdeno azul, un óxido complejo mixto en forma coloidal que contiene molibdeno con diferentes valencias (Merck, 1987).



Sustitución del arsenato de sodio por silicatos

Cuando se estudia la presencia de iones silicato, éstos se hacen reaccionar con molibdato de amonio, de tal manera que se forman los complejos silicomolibdato. A la solución resultante se le agregan metol (p-metil-amino-fenol-sulfato) y ácido oxálico, mismos que reducen el complejo silicomolibdato y generan un compuesto azul, a la vez que descomponen cualquier fosfomolibdato o arsenomolibdato, de manera que se eliminan las interferencias por fosfatos y arsenatos (Gutiérrez, 1982). De igual modo, los componentes de fósforo también pueden eliminarse selectivamente con ácido tartárico. Así mismo, la reducción parcial del molibdeno con mezcla Photo-Rex®/Bisulfito resulta en la producción de β-silicomolibdeno azul, el cual es un ácido silicomolibdico modificado que resuena debido a electrones en exceso y absorbe en la región azul del espectro (Merck, 1987).



Cuadro 2. Rangos aproximados de longitudes de onda en la región visible

Color absorbido	Color transmitido	Absorbida nm
Violeta	Amarillo verdoso	380 - 450
Azul	Amarillo	450 - 480
Verde azulado	Naranja	480 - 490
Azul verdoso	Rojo	490 - 500
Verde	Púrpura a rojo violeta	500 - 570
Amarillo	Azul	570 - 590
Naranja	Verde azulado	590 - 620
Rojo	Azul verdoso	620 - 780

Fuente: Aroca, 1997.

Obsérvese como los dos métodos estudiados dependen de la producción del complejo con molibdato y su posterior reducción a un compuesto azul, cuya intensidad se mide teniendo en cuenta la absorción de luz a una determinada longitud de onda. En ellos, el color que se va a medir se debe tanto a la presencia de un pigmento añadido como a la formación por reacción química de un producto coloreado (azul de molibdeno),

mientras que la intensidad obtenida determina la concentración de la sustancia problema. Por tanto, las lecturas deben realizarse en un espectrofotómetro diseñado para comparar la intensidad de luz transmitida por la solución frente a la de un blanco (solvente puro o solvente puro y reactivos sin muestra), teniendo en cuenta la relación entre el color transmitido y el absorbido (cuadro 2), así como los datos reportados en la literatura para sistemas con azul de molibdeno (cuadro 3):

Cuadro 3. Revisión bibliográfica para definir la longitud de onda de trabajo

Sustancia analizada	λ (nm)	Referencia
Por Somogyi - Nelson		
Glucosa y azúcares reductores	520	Ros <i>et al.</i>
Oligogalacturonatos	500	Collmer <i>et al.</i>
Glucosa	540	Hawk <i>et al.</i>
Azúcares reductores	610	Castellanos
Azúcares reductores	660	Fisher
Otros iones		
Fosfatos	885	Gutiérrez
Fosfatos	700	Merck
Silicatos	810	Gutiérrez
Silicatos	820 o 650 ¹	Merck

1. Menor precisión.

Otros aspectos que hay que tener en cuenta son la estabilidad del color con respecto al tiempo, a la temperatura y al pH, así como el almacenamiento y la preservación de muestras y reactivos.

Estabilidad del color en el tiempo

Cuando se utilizan fosfatos, la absorbancia alcanza su valor máximo después de 2-3 minutos y entonces declina continuamente. El tiempo de parada se ha definido en cuatro minutos y hay un compromiso entre la estabilidad del color y el tiempo de parada (Merck, 1987). Cuando se usa ácido ascórbico como agente reductor, la extinción logra su máximo a los cinco minutos, y permanece constante por muchas horas. Sin embargo, para trabajos precisos se recomienda que la lectura de la extinción se haga dentro de dos o tres horas, porque puede haber ligeros cambios en la primera mitad del día (Gutiérrez, 1982).

Dependencia de la temperatura

La reacción máxima se obtiene a 25 °C y las mediciones fotométricas pueden ejecutarse en un rango de temperatura de 20-30 °C (Merck, 1987). Para el caso específico del ácido ascórbico, el método descrito no presenta cambios significativos de temperatura (menor de 0,2%) entre 15 y 30 °C (Gutiérrez, 1982). Además, las desviaciones dependientes de la temperatura para muestras entre 20 y 40 °C están dentro de $\pm 2\%$. Los resultados para temperaturas de 15 °C o menos relacionan la temperatura inicial de las soluciones muestra con el incremento de varios grados durante la reacción a temperatura ambiente (23 °C). En el caso de temperaturas bajas constantes, los valores están dos a cinco puntos más bajos; en casos extremos, tales como a 5 °C, el resultado puede ser el 25% del que se obtiene a temperatura ambiente. Las muestras deberán calentarse por lo menos a 20 °C para evitar errores de este tipo (Merck, 1987).

Efecto del pH sobre la reacción de coloración

En el cuadro 4, elaborado en el Departamento de Química de la Universidad Nacional, se definió el efecto del pH sobre la reacción de coloración, utilizando la técnica descrita por Fisher en 1989. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 4. Efecto del pH sobre la reacción de Somogyi-Nelson

Glucosa	Absorbancia leída una longitud de onda = 660 nm			
	pH 5,0	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0
0	0	0	0	0
20	0,1839	0,2978	0,2122	0,1579
30	0,2478	0,4667	0,4105	0,2806
40	0,2955	0,5857	0,4422	0,3251
50	0,3705	0,7345	0,5063	0,4528

Fuente: Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

Al ajustar los datos anteriores, se obtuvieron las regresiones presentadas en el cuadro 5.

De donde se concluye que el pH afecta ligeramente la correlación de la curva y que el más adecuado es el de 6,0, cuando la longitud de onda a la cual se hace la lectura de absorbancia es 660 nm.

Cuadro 5. Ecuaciones de correlación del efecto del pH sobre la reacción de Somogyi-Nelson

pH	Ecuación	Coefficiente de correlación
5,0	$Y = 0,0072 X + 0,0167$	0,9853
6,0	$Y = 0,0147 X + 0,0057$	0,9983
6,5	$Y = 0,0105 X + 0,0197$	0,9539
7,0	$Y = 0,0089 X - 0,0056$	0,9858

Almacenamiento y preservación de las muestras

Las muestras pueden almacenarse en botellas de polietileno sin mayor estabilización (Merck, 1987) y guardarse en un congelador a -20 °C para su análisis posterior (Gutiérrez, 1982). Para estudios cinéticos, se recomienda analizar inmediatamente.

Almacenamiento y preservación de los reactivos

La facilidad de reacción descrita, tanto de los reactivos de Somogyi como del reactivo de Nelson, conduce a que las soluciones deben conservarse separadamente, en frascos oscuros y bien tapados. Además, es necesario revisar de manera periódica la capacidad reactiva de la solución de Nelson, ya que ésta se reduce y cambia rápidamente de color, alterando los resultados.

CONCLUSIONES

El reactivo de Somogyi está formado por dos soluciones: la primera es un complejo cupro tartárico en medio alcalino, capaz de oxidar el azúcar reductor para formar óxido de cobre y una mezcla de lactonas γ y δ provenientes del ácido aldónico; la segunda es una solución salina con predominio en sulfato sódico que facilita las reacciones incrementando el flujo de electrones y regulando el equilibrio químico del sistema, a la vez que minimiza la entrada de oxígeno atmosférico a la solución y evita la reoxidación del óxido cuproso.

El reactivo de Nelson corresponde a un complejo amarillo del ácido molibdoarsénico que oxida el ácido aldónico a una aldosa con un átomo de carbono menos y da origen a un complejo azul de molibdeno.

Como en condiciones adecuadas los iones arsenato, fosfato y silicato forman complejos amarillos de ácido molibdoarsénico, molibdofosfato y molibdosilícico, respectivamente, compuestos todos que pueden reducirse para producir un complejo azul de molibdeno, es entonces viable la sustitución del arsenato de sodio por fosfatos o silicatos, desde el punto de vista químico.

El reactivo de Nelson presenta una elaboración relativamente estándar, mientras que el reactivo de Somogyi varía en cuanto a composición y técnica de preparación; por tanto, del primero puede depender la sensibilidad del método y del segundo la longitud de onda a la cual se lee la absorbancia.

En este estudio se muestran dos alternativas químicamente posibles para sustituir el arsenato de sodio en el método de Somogyi-Nelson; en ambas la cantidad de azul de molibdeno formada debe ser proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra y, por tanto, medible en espectrofotómetro. Además, la estabilidad del compuesto coloreado, al igual que en la reacción inicial, puede verse afectada por el pH, la temperatura y el tiempo, mientras que la sensibilidad de la técnica deberá variar al cambiar el arsenato por un fosfato o un silicato.

Entender químicamente la técnica permite iniciar estudios experimentales que lleven a la modificación de un método (Somogyi-Nelson) tendiente a desaparecer por la toxicidad del arsenato y la no disponibilidad del mismo en el mercado.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Elizabeth López, de la Universidad Nacional, por su aporte.

BIBLIOGRAFÍA

Aroca Montaña, L., "Determinación de agua por Karl Fischer, espectroscopia ultravioleta-visible e infrarroja", Memorias del Seminario Taller, Universidad Nacional de Colombia, 1997, pp. 15 - 18.

Bernal de Ramírez, I., *Análisis de alimentos*, Bogotá, Editora Guadalupe Ltda., 1994, pp. 86 - 87.

Castellanos, O., "Proyecto de investigación sobre la relación entre las particularidades bioquímicas (enzimáticas) de la interacción del hongo *Beauveria bassiana* y la broca del café con el grado de

patogenicidad del hongo", Bogotá, Universidad de La Salle, 1995, pp. 8-9.

Collmer, A., Ried, J. y Mount, M., "Assay Methods for Pectin Enzymes", *Methods in enzymology*, Vol. 161, Academic Press, Inc., 1988, pp. 333 - 334.

Faucher, R., *Chimie*, París, Librairie A. Hatier, 1964, pp. 97-109.

Getman, F. y Daniels, F., *Tratado moderno de fisicoquímica*, Argentina, Editorial Hasa, 1950, pp. 88-92.

Gutiérrez, H., "Determinación de fósforo reactivo", *Manual de técnicas para análisis de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos*. Cartagena, Armada Nacional de Colombia, Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, 1982, pp. 51-58.

Gutiérrez, H., "Silicatos", *Manual de técnicas para análisis de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos*, Cartagena, Armada Nacional de Colombia, Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, 1982, pp. 59-64.

Hawk, P., Oser, B. y Summerson, W., *Practical Physiological Chemistry*, McGraw - Hill Book Company, 1954, pp. 572-575.

Horton, R., Moran, L., Ochs, R., Rawn, D. y Scrimgeour, G., *Bioquímica*, México, Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., 1995, pp. 8-16.

Instituto de Investigaciones Tecnológicas. *Estudio bibliográfico sobre derivados de almidón 1947 - 1970*, Vol. 1, Bogotá, Instituto de Investigaciones Tecnológicas, 1971, p. 109.

Kozhevnikov, I. V. *Advances in Catalysis by Heteropoly Acids*, Russ. Chem. Rev. 56, 1987, p. 811.

Maier, H., "Métodos cromatográficos incluyendo el intercambio iónico", *Métodos modernos de análisis de alimentos*, tomo II, Zaragoza, 1978, pp. 97-99.

Martínez, J. C., *Análisis orgánico*, Universidad Nacional de Colombia, 1972, pp. 81-82.

Meneges de Góngora, B., Luna, F. y Maldonado García, C., "Estandarización de una metodología neurofarmacológica para estudiar sustancias de origen natural", *Informaciones Químicas Merck*, No. 51, Bogotá, 1991, p. 9.

Merck, "Patrones para absorción atómica", *Informaciones Químicas Merck*, No. 46, Bogotá, 1987, p. 18.

Merck, *Rapid Test Handbook*, E. Merck. Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt 1, Federal Republic of Germany, 1987, pp. 42-46, 222-237.

Molinari, H., *Química general y aplicada a la industria*, Barcelona, Editorial Gustavo Gili, 1920, pp. 320, 507, 739-740.

Novo Nordisk, "Aplicaciones industriales de las enzimas", *Novo Nordisk*, 1988, p. 20.

Norma Técnica Colombiana, NTC 926.

Plummer, D., *Bioquímica práctica*, Editorial McGraw-Hill Latinoamericana, S. A., 1996, pp. 174-175.

Puig, I. *Curso general de química*, 3a. ed., Barcelona, Editorial Manuel Marín, 1934, pp. 344-348, 407-409, 569-570.

Rakoff, H. y Rose, N., *Química orgánica fundamental*, México, Editorial Limusa, 1980, pp. 760-761.

Ros, J., Saura, D., Coll, L. y Laencina, J. "Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y sctividades enzimáticas pectolíticas", *Alimentación, Equipos y Tecnología*, año 11, No. 2, marzo, 1992, p. 150.

Rosales, I., Poutou, R. y Arias, J., "Validación de métodos analíticos empleados en el control de calidad de productos biotecnológicos", *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 1, No. 2, Bogotá, julio, 1998, pp. 73-75.