

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD Y PRECISIÓN DE LOS MÉTODOS M-HIDROXIFENILFENOL Y CARBAZOL APLICADOS EN LA CUANTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS PÉCTICAS

Humberto Barazarte¹; Tonny García¹; Luis Duran¹; Luis Chaparro¹ y Jordy Gamez².

¹MSc. (USB, UNELLEZ). Programa de Ingeniería Agroindustrial. Decanato de agronomía, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Apartado 3001. Barquisimeto, Edo. Lara, Venezuela. tonnygarcia@ucla.edu.ve

²Ing. Agroindustrial (UNELLEZ). Programa Ciencias del Agro y del Mar. Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales. UNELLEZ-San Carlos, Cojedes, Venezuela 2201.

Recibido: 17-11-2006 / Aceptado: 09-04-2007

RESUMEN

La exactitud y precisión de los métodos colorimétricos mhidroxifenilfenol y carbazol se evaluó de la siguiente manera: La comparación de las curvas de calibración se realizó a través del coeficiente de correlación de Pearson (r), coeficiente de determinación del modelo (R^2) y error estándar, los resultados indicaron que las curvas son lineales en el rango de 10 a 60 mg de ácido anhidrouónico/ml. En el estudio de precisión se utilizaron 3 concentraciones estándares de 15, 35 y 55 g de ácido anhidrogalacturónico/ml, con 6 repeticiones de cada ensayo, originando coeficientes de variación entre 0,44% y 4,27%. La exactitud se evaluó por medio de una prueba t - student al 95%, comparando los valores de concentración para las soluciones estándares de 15, 35 y 55 g de ácido anhidrogalacturónico/ml determinándose que no existe diferencia significativa entre las medidas experimentales y el patrón correspondiente. Se compararon los métodos colorimétricos usando soluciones de pectina comercial a 20 y 40 mg/ml, obteniéndose resultados estadísticamente iguales a un nivel de confianza de 95%. Adicionalmente la influencia de los azúcares sobre las técnicas colorimétricas fue estudiada con una solución de 30 mg de ácido anhidrogalacturónico/ml en presencia de fructosa, arabinosa, galactosa y glucosa a 50, 100 y 200 g/ml, resultando interferencia apreciable en cada una de las concentraciones en evaluación.

Palabras claves: *Pectina, carbazol, m hidroxifenilfenol.*

INTRODUCCION

La determinación de pectinas aplicando métodos colorimétricos presenta problemas exactitud y precisión debido a la influencia de diversos factores. Algunos compuestos presentes en el material péctico aumentan el valor de la absorbancia, lo que se traduce en una alteración del contenido de pectinas. La interferencia de los azúcares neutros es uno de los principales problemas de las técnicas espectrofotométricas. Estos compuestos pueden estar libres o ligados a la cadena principal poligalacturónica, así como procedentes de polímeros hemicelulósicos.

La sensibilidad y especificidad del reactivo colorimétrico es otro factor que repercute considerablemente en la exactitud y precisión del método durante la cuantificación de sustancias pécticas a través de técnicas espectrofotométricas.

Un estudio del comportamiento ante diferentes variables de métodos colorimétricos de determinación de pectinas, permitirá establecer si cumplen con un grado de exactitud y precisión satisfactorio. Esto constituye un aporte a futuras investigaciones que requieren de métodos prácticos y confiables.

Es por ello que la presente investigación esta dirigida a evaluar la exactitud y precisión de los métodos m-hidroxifenilfenol y carbazol aplicados en la cuantificación de sustancias pécticas. Para tal fin se compararon las curvas de calibración de los métodos mhidroxifenilfenol y carbazol utilizando solución patrón de ácido galacturónico, además se determinó la exactitud y precisión de ambas técnicas a través de la aplicación de estadística descriptiva. Adicionalmente se realizó una comparación de las dos metodologías mediante la determinación de pectina comercial y por último se estudió la influencia de los azúcares en la respuesta instrumental de cada método en evaluación.

METODOLOGÍA.

La curva de calibración de los métodos m-hidroxifenilfenol y carbazol fué realizada de la siguiente manera: se pesó 120,5 mg de ácido galacturónico monohidratado (100 mg de ácido anhidrogalacturónico) secado en vacío a 30° C por 5 horas y se transfirió a un balón aforado de 1

L. Se adicionó 0,5 ml de NaOH 1N y se enrazó con agua destilada. Se mezcló y dejó en reposo toda la noche. De esta solución de ácido anhidrogalacturónico (AGA) a concentración de 100 mg/ml se tomaron 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ml y se llevó a volumen de 100 ml. Se determinó la absorbancia de cada solución aplicando los métodos del carbazol y m-hidroxifenilfenol.

Nota: AGA = Ácido galacturónico monohidratado $\times 176/212$

Para la exactitud y precisión se preparó una solución de ácido anhidrogalacturónico (AGA) a 100 mg/ml. De allí se tomaron 15, 35 y 55 ml y fueron colocados en balones aforados de 100 ml, se enrazó con agua destilada, obteniéndose 3 soluciones de AGA a 15, 35 y 55 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se determinó la absorbancia de las 3 soluciones aplicando los métodos del carbazol y mhidroxifenilfenol, realizando 6 repeticiones por cada concentración.

La determinación de pectina se llevó a cabo mezclando 2,0 g de pectina comercial con 200 ml de alcohol etílico al 95%, se dejó en reposo por 30 min para luego filtrar en un papel Whatman N° 1. Se repitió el proceso 2 veces con alcohol etílico al 70%. Se colocó en una estufa al vacío a 30 °C y 25 mmHg por 24 h. Luego fueron llevados 0,1g de esta muestra a un balón aforado de 100 ml y se enrazó con hidróxido de sodio al 0,05 N, dejando en reposo por 30 min. Se tomaron 2 y 4 ml de esta solución de pectina desterificada y libre de azúcares y fueron llevados a balones aforados de 100 ml, se enrazó con agua destilada para obtener dos soluciones de 20 y 40 μg de pectina/ml cada una. Se determinó la absorbancia utilizando los métodos del carbazol y mhidroxifenilfenol con 10 repeticiones por cada solución.

El estudio de la influencia de los azúcares sobre los métodos colorimétricos se prepararon soluciones de 30 μg de AGA/ml en presencia de fructosa, arabinosa, galactosa y glucosa a concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$, se determinó la absorbancia de cada solución por triplicado aplicando los métodos del carbazol y m-hidroxifenilfenol. Además se determinó la absorbancia originada por 3 réplicas de una solución de 30 μg de AGA/ ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Comparación de las curvas de calibración de los métodos m-hidroxifenilfenol y carbazol.

La curva del método del mhidroxifenilfenol posee un coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0,9966, valor que representa alta correlación positiva entre la absorbancia y la concentración aunque en menor escala a la existente en el método del carbazol. El coeficiente de determinación (R^2) se ubicó en 99,33%, menor al 99,89% del carbazol, sin embargo es un valor que demuestra que las variaciones en la concentración del ácido galacturónico inciden en los cambios de absorbancia. El valor del error estándar fue de 0,0124, mayor al obtenido con el método del

carbazol (0,0049).

Los resultados anteriores indican que la curva de calibración del método del carbazol presenta un comportamiento lineal semejante al comportamiento de la curva del método del mhidroxifenilfenol.

Determinación de la exactitud y precisión con soluciones de ácido anhidrogalacturónico

En el cuadro 1 se observan los resultados para el análisis de exactitud y precisión aplicado a los métodos m-hidroxifenilfenol y carbazol. La precisión es determinada utilizando el coeficiente de variación, el cual indica la magnitud de la dispersión con respecto a la media. Se puede visualizar que en ambos métodos y a los niveles de concentración en estudio el coeficiente de variación, oscila entre 0,44% y 4,27%.

Asimismo se detalla que a la concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se obtienen los valores más altos del coeficiente de variación. También se observa, que a excepción de la concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el método del m-Hidroxifenilfenol presenta menor variación que el método del carbazol. Rodríguez et al. (1992), obtuvieron un coeficiente de variación de 1,91% con el método del m-hidroxifenilfenol cuando utilizaron 100 mg de ácido péctico patrón.

La desviación estándar es de la misma magnitud para ambas metodologías a concentraciones de estudio de 15 y 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pero a nivel de 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la desviación estándar para el método del mhidroxifenilfenol (0,78) fue el triple a la desviación estándar del método del carbazol (0,24).

La exactitud se determinó utilizando el error relativo y la prueba tstudent para una muestra, con un nivel de confianza de 95%. A través de estas pruebas se compara la media de cada concentración con su respectivo patrón (15, 35 y 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En la prueba tstudent mostrada en el cuadro 1 todos los valores de probabilidad de ocurrencia son mayores a 0,025, indicando que las medidas obtenidas experimentalmente, tanto para el método del carbazol como para el método del m-hidroxifenilfenol no difieren significativamente del patrón correspondiente, en este sentido, se afirma que ambas técnicas poseen la exactitud requerida para un intervalo de confianza del 95%.

Adicionalmente el valor más alto de error relativo obtenido de los niveles de concentración en estudio es de 2,8%, lo que confirma la exactitud de los métodos. West y Skook (1989), indican que para el procedimiento espectrofotométrico el error relativo de las mediciones de concentración se encuentra entre los límites de 1% a 3%.

Resultados semejantes fueron obtenidos por Visciglio y Sanjuán (2000) en soluciones estándares de 5, 30 y 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido anhidrogalacturónico, donde concluyó que el método del carbazol poseía la exactitud requerida en un nivel de confianza de 95%.

Cuadro 1. Valores estimados de ácido anhidrogalacturónico/ml con 6 repeticiones y su comparación con el patrón mediante prueba T-Student.

Repetición	Carbazol			M-Hidroxifenilfenol		
	15 µg/ml	35 µg/ml	55 µg/ml	15 µg/ml	35 µg/ml	55 µg/ml
R1	14,99	35,05	55,10	15,43	34,70	56,31
R2	14,58	35,18	54,96	14,06	34,43	54,93
R3	15,13	34,22	54,83	15,43	34,98	55,07
R4	13,75	34,77	55,38	14,88	34,29	53,97
R5	13,89	34,22	55,10	15,71	35,53	55,62
R6	15,13	35,32	54,69	14,88	34,43	55,07
Media	14,58	34,79	55,01	15,07	34,72	55,16
Desviación estandar	0,62	0,48	0,24	0,59	0,46	0,78
Coefficiente de variación	4,27	1,38	0,44	3,94	1,34	1,41
Error relativo (%)	2,80	0,60	0,18	0,47	0,80	2,30
Valor de t	1,66	1,06	0,10	0,27	1,44	0,51
Probabilidad de ocurrencia	0,158	0,340	0,923	0,799	0,209	0,632

Determinación de pectina comercial aplicando los métodos m-hidroxifenilfenol y carbazol

El cuadro 2 muestra el resultado de la determinación de pectina comercial utilizando los métodos colorimétricos del carbazol y mhidroxifenilfenol. El coeficiente de variación para las dos metodologías en estudio se encuentra entre 3,05% y 4,47%. La desviación estándar presenta valores en un rango de 0,71 a 1,31. Rodríguez et al (1992) obtuvieron coeficientes de variación de 3,40%, 1,75% y 1,06% con soluciones de 10, 20 y 30 µg de ácido péctico/ml respectivamente.

El valor de probabilidad de ocurrencia fue de 0,032 y 0,532 para 20 y 40 µg/ml respectivamente, superiores al valor de referencia ($\alpha/2= 0,025$), lo que indica que no hay diferencia significativa entre las medias de las dos metodologías en estudio a los niveles de concentración antes mencionados.

Cuadro 2. Valores estimados de Pectina/ml con los métodos Carbazol y M-hidroxifenilfenol.

Repetición	Carbazol		M-Hidroxifenilfenol	
	20 µg/ml	40 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml
R1	19,22	38,68	20,39	37,51
R2	19,35	37,68	8,72	37,51
R3	19,10	38,81	19,26	36,63
R4	18,60	38,18	19,01	38,84
R5	19,72	38,68	20,37	37,51
R6	19,22	37,68	18,64	39,01
R7	19,35	37,44	20,01	36,51
R8	19,47	37,81	21,14	39,01
R9	18,48	37,44	20,26	40,41
R10	17,25	34,24	18,76	37,38
Media	18,98	37,66	19,66	38,00
Desviación Estándar	0,71	1,31	0,88	1,15
Coefficiente de Variación	3,76	3,48	4,47	3,05

Influencia de los azúcares en la respuesta instrumental de los métodos colorimétricos.

La prueba de Medias de Dunnett al 95%, mostrada en los cuadros 3, 4, 5 y 6 señala que la diferencia entre el valor de concentración experimental obtenido al adicionar azúcares y el valor patrón supera el límite correspondiente, en base a ello se puede deducir que todos los azúcares en estudio, a niveles de concentración de 50, 100 y 200 µg/ml, producen una interferencia apreciable en ambos métodos colorimétricos.

Cuadro 3. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 95% en el método del Carbazol para la Arabinosa y Galactosa .

Comparación	Arabinosa			Galactosa		
	Diferencia	Límite		Diferencia	Límite	
0 – 50	10,98	0,55	***	4,66	0,32	***
0 – 100	18,13		***	9,47		***
0 – 200	26,09		***	17,94		***

***Diferencia Significativa

Cuadro 4. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 95% en el método del Carbazol para la Fructosa y Glucosa

Comparación	Fructosa			Glucosa		
	Diferencia	Límite		Diferencia	Límite	
0 – 50	4,62	0,59	***	2,70	1,72	***
0 – 100	16,61		***	17,81		***
0 – 200	30,35		***	26,87		***

***Diferencia Significativa

Cuadro 5. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 95% en el método del m-hidroxifenilfenol para la arabinosa y galactosa.

Comparación	Arabinosa			Galactosa		
	Diferencia	Límite		Diferencia	Limite	
0 – 50	9,69	0,91	***	14,37	0,86	***
0 – 100	16,48		***	20,47		***
0 – 200	24,73		***	23,77		***

***Diferencia Significativa

Cuadro 6. Prueba de comparación de medias de Dunnett al 95% en el método del m-hidroxifenilfenol para la Fructosa y Glucosa.

Comparación	Fructosa			Glucosa		
	Diferencia	Limite		Diferencia	Limite	
0 – 50	9,88	1,35	***	7,54	1,6	***
0 – 100	21,34		***	11,21		***
0 – 200	34,74		***	16,57		***

***Diferencia Significativa

El efecto de los azúcares en el método del carbazol se denota en el cuadro 7 a través del porcentaje de interferencia, valor que indica la relación de la magnitud de la interferencia con respecto a la concentración de la solución patrón. Allí se observa que la fructosa, con un porcentaje de interferencia de 95.67% a 200 $\mu\text{g/ml}$, muestra el parámetro más alto. A concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, la glucosa aumenta 8,7%, la lectura del ácido galacturónico. La mayor interferencia a 50 $\mu\text{g/ml}$, esta representada por la arabinosa con 34,63%. Por su parte la galactosa y fructosa presentan un comportamiento semejante a dicha concentración.

Cuadro 7. Porcentaje de interferencia de los azúcares a diferentes concentraciones en el método del Carbazol.

Concentración	Arabinosa	Galactosa	Fructosa	Glucosa
50	34,63%	14,72%	14,72%	8,7%
100	57,14%	29,87%	52,38%	56,28%
200	82,25%	56,71%	95,67%	84,85%

De igual manera, el comportamiento del método del mhidroxifenilfenol, esta representado en el cuadro 8. Semejante a lo ocurrido en el método del carbazol, la fructosa constituye el azúcar que origina mayor interferencia, encontrándose 114,67% a 200 $\mu\text{g/ml}$. La galactosa, con 48,89% a 50 $\mu\text{g/ml}$, interfiere a mayor escala que los demás azúcares a este nivel de concentración, efecto diferente al mostrado en el método del carbazol, donde solamente aumentó 14,72% el valor de la absorbancia. La arabinosa, fructosa y glucosa produjeron 33,78%, 34,22% y 26,27% de interferencia a esta misma concentración. La glucosa representa el azúcar que afectó en menor proporción el método del m-hidroxifenilfenol.

Cuadro 8. Porcentaje de interferencia de los azúcares a diferentes concentraciones en el método del m-hidroxifenilfenol.

Concentración	Arabinosa	Galactosa	Fructosa	Glucosa
50	33,78%	48,89%	34,22%	26,67%
100	55,56%	55,11%	73,78%	38,67%
200	82,22%	79,11%	114,67%	56,00%

El resultado de este estudio no se asemeja al reportado por Mc Comb y Mc Cready (1952). Los autores aplicaron el método del carbazol en presencia de 33,2 μg de ácido anhidrogalacturónico, encontrando poca interferencia con glucosa y fructosa a concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$ y ninguna interferencia cuando experimentaron con arabinosa a la misma concentración. Al observar el cuadro 13 se encuentra que la fructosa, arabinosa y glucosa producen 52,38%, 57,14% y 56,28% de interferencia respectivamente en condiciones semejantes a las utilizadas por los autores antes mencionados. Así mismo, se visualiza en dicho cuadro que el efecto de la arabinosa es bastante considerable a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$, caso contrario al efecto reportado por Mc Comb y Mc Cready (1952), quienes debieron usar 500 g/ml de arabinosa para alcanzar solo una escasa interferencia.

Esta diferencia puede originarse de modificaciones realizadas al método del carbazol de Mc Comb y Mc Cready (1952) hecha por Emaldi (1994) y que fueron utilizadas en el método aplicado. La adición de ácido bórico, no contemplada por Mc Comb y Mc Cready, incrementa la producción de compuestos furfúricos, entre ellos los provenientes por hexosas y pentosas, aumentando así la interferencia ocasionada por los azúcares. Scott (1979), encontró incremento en la absorbancia de la glucosa con el método del 3,5 - dimetilfenol cuando adicionó ácido bórico.

Otra modificación importante se observa en el aumento del tiempo y la temperatura de

reposo al mezclar la muestra con el ácido sulfúrico concentrado. El tiempo se incrementa aproximadamente 8 minutos, mientras que la variación de temperatura oscila 8°C. La elevación de temperatura aumenta la velocidad de reacción, aumentando la producción de compuestos furfúricos, tanto provenientes del ácido anhidrogalacturónico como de los azúcares. Un mayor tiempo de reacción incrementa la posibilidad de reacción entre unos compuestos y otros. Scott (1979), manifiesta que los tiempos cortos de reacción disminuyen el color desarrollado por los azúcares, especialmente de la glucosa.

Resultados semejantes fueron los obtenidos por Blumenkrantz y Asboe - Hansen (1973), ellos encontraron interferencia considerable por parte de la glucosa y arabinosa en presencia de ácido glucurónico utilizando el método del carbazol de Dische.

Rodríguez et al (1992), sólo encontraron interferencia de 4,40%, 3,82%, 4,29% y 3,49% en soluciones de 2 mg/ml de glucosa, manosa, xilosa y arabinosa, respectivamente con el método del m-hidroxifenilfenol, resultado diferente al obtenido en el estudio actual. La causa principal se atribuye al uso de un blanco muestra por parte de estos autores, si bien, en la técnica utilizada por Rodríguez et al., (1992) no se detalla esta actividad, la poca interferencia mostrada por los azúcares a esta alta concentración solo puede eliminarse de esta forma. Carbonell et al. (1989), obtuvieron lecturas de absorbancia de 0,446 y 0,870 para dos (2) mezclas (1:1) de glucosa y fructosa a concentraciones 1 y 2 mg/ml respectivamente. El valor del blanco muestra resultó 0,347 para la concentración de 1 mg/ml y 0,639 para la concentración de 2 mg/ml, lo que origina que la diferencia de absorbancia entre ambos sea 0,099 y 0,231, eliminando enormemente el efecto de interferencia.

Blumenkrantz y Asboe - Hansen (1973), tampoco encontraron interferencia considerable al determinar ácido glucurónico en presencia de arabinosa y glucosa. Ellos utilizaron el blanco muestra para realizar las lecturas de absorbancia.

Cabe destacar que en el método del m-hidroxifenilfenol desarrollado en el estudio actual no se utilizó el blanco muestra, en concordancia con De Giorgi et al (1985), citado por Carbonell et al. (1989).

CONCLUSIONES

1. La evaluación de la exactitud y precisión de los métodos colorimétricos m-hidroxifenilfenol y carbazol permitió concluir:
2. Las curvas de calibración de los dos métodos son lineales en el rango de concentración de 10 a 60 µg de ácido. anhidrogalacturónico/ml.
3. Los métodos colorimétricos m-hidroxifenilfenol y carbazol presentan una precisión

expresada como coeficiente de variación entre 0,44% y 4,27% en el rango de concentración de 10 a 60 μg de ácido anhidrogalacturónico/ml.

4. Los métodos colorimétricos mhidroxifenilfenol y carbazol, en el rango de concentración de 10 a 60 μg de ácido anhidrogalacturónico/ml, poseen 95% de probabilidad de originar resultados que no difieran significativamente del valor real.
5. La determinación de pectina comercial aplicando el método del carbazol posee un 95% de probabilidad de originar resultados que no difieran estadísticamente con los valores obtenidos de la aplicación del método del m-hidroxifenilfenol utilizando soluciones de 20 y 40 μg de pectina/ml.
6. Los azúcares neutros en niveles iguales o mayores a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ interfirieren significativamente en la respuesta instrumental de los métodos colorimétricos m-hidroxifenilfenol y carbazol en presencia de 30 μg de ácido anhidrogalacturónico/ml.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUMENKRANTZ, N and ASBOE HANSEN, G. (1973). New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. *Analytical Biochemistry*. No 54. pp 484 - 489.
- CARBONELL, E., COSTELL, E. and DURAN, L. (1989). Evaluation of Various Methods for Measurement of Pectin Content in Jam. *J. Assoc off. Anal. Chem.* Vol. 72, No 4. pp 689 - 693.
- EMALDI, U. (1994). Evaluación de la Calidad de Frutos Procedentes de Plantas de Mangos (*Mangifera indica* L) obtenidas mediante injertos de patrones criollos (Bocado, Hilacha y Manga) con copas de la variedad Haden. Tesis de Grado, Maestría. Facultad de Ciencias Universidad Central de Venezuela.
- MC COMB, E. A. and MC CREADY, R. M. (1952). Colorimetric Determination of Pectin Substances. *Analytical Chemistry*. Vol. 24, N° 10. pp 1630 - 1632.
- RODRIGUEZ, M., REDONDO A. y VILLANUEVA, M. J. (1992). Estudio Comparativo de los métodos de H-Hidroxifenilfenol y 3,5 dimetilfenol para determinar sustancias Pécicas en Nabo (*Bassica napus*). *Alimentaria*. N° 79 pp 79 - 82.
- VISCIGLIO, S.B. y SANJUAN, N. (2000). Determinación del Contenido de Pectinas en Cáscara de Frutas Cítricas: Modificación y Optimización del Método del Carbazol. *Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos*. Vol. II. pp 719 - 733.
- SCOTT, R. W. (1979). Colorimetric Determination of Hexuronic Acids in Plant Materials. *Analytical Chemistry*. Vol. 51, N° 7. pp. 936 - 941.
- SKOOK, D. A. Y WEST, D. M. (1989). *Análisis Instrumental*. McGrawHill/Interamericana de México, S.A. DE C.V. México.