

## **DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MIEL MEDIANTE SISTEMAS EN FLUJO DE INYECCIÓN SECUENCIAL (SIA) Y MULTICONMUTADO (MCFIA). ESTUDIO COMPARATIVO**

### **GLUCOSE DETERMINATION IN HONEY BY FLOW SYSTEMS BASED ON SEQUENTIAL INJECTION (SIA) AND MULTICOMMUTATION (MCFIA). A COMPARISON**

**Alexandra Sixto y Moisés Knochen**

Universidad de la República, Facultad de Química, Departamento "Estrella Campos", Cátedra de Química Analítica, Av. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo – Uruguay  
(e-mail: alesixto@fq.edu.uy)

*Recibido: 10/09/2010 - Evaluado: 29/09/2010 - Aceptado: 15/10/2010*

#### **RESUMEN**

Se presentan dos diferentes sistemas de análisis en flujo para la determinación automatizada de glucosa en muestras de miel. Los mismos se basan respectivamente en Análisis en Flujo Multiconmutado (MCFIA) y en Análisis por Inyección Secuencial (SIA) y emplean un reactivo enzimático en solución con detección colorimétrica (método de Trinder). Durante la validación, ambos métodos exhibieron linealidad satisfactoria hasta 0.8 g L<sup>-1</sup> de glucosa y precisión mejor al 3%, sin interferencia significativa de la fructosa. El estudio de la veracidad se realizó por análisis de muestras comerciales y comparación con el método de referencia AOAC 954.11. Las diferencias entre los resultados arrojados por los métodos propuestos y el método de referencia fueron en general, menores al 10% lo que se consideró aceptable para la aplicación buscada. La frecuencia de muestreo fue de 46 muestras por hora, muy superior a la de los métodos de referencia.

#### **ABSTRACT**

Two different flow analysis systems are presented for the automated determination of glucose in honey samples. These are based respectively in Multicommutated Flow Analysis (MCFIA) and Sequential Injection Analysis (SIA) and employ an enzyme reagent in solution and colorimetric detection (Trinder's method). During validation, both methods presented satisfactory linearity up to 0.8 g L<sup>-1</sup> glucose and precision better than 3%, with no significant fructose interference. Validity assessment was performed by the analysis of commercial samples and its comparison to AOAC 954.11 reference method. The differences between the results obtained by each proposed method and the reference method were generally lower than 10%, which was considered acceptable for the desired application. The sampling frequency was 46 samples per hour, higher than the reference methods' one.

Palabras clave: glucosa; miel; análisis en flujo multiconmutado; análisis por inyección secuencial  
Keywords: glucose; honey; multicommutated flow analysis; sequential injection analysis

## INTRODUCCIÓN

Entre los principales constituyentes de la miel, se destacan los azúcares, en especial la glucosa. Estas sustancias determinan el valor nutricional, y afectan varias características físicas y químicas, entre ellas la cristalización y la acidez. El cociente fructosa/glucosa determina la susceptibilidad a la cristalización y es un índice de genuinidad.

La determinación selectiva de glucosa en miel requiere que la misma sea aislada de la matriz de la muestra. Esto puede lograrse tanto por procedimientos clásicos que involucran cromatografía en columna, y que son largos y tediosos, como por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Cunnif, 1995a; 1995b).

Otra forma de alcanzar la selectividad deseada sin necesidad de recurrir a una separación, es empleando reacciones enzimáticas, que se caracterizan por su elevada selectividad. La mayoría de las aplicaciones de reacciones enzimáticas en línea emplean enzimas inmovilizadas en reactores como forma de disminuir su consumo (García de María y Townshend, 1992; Miró et al., 2004; Sixto y Knochen, 2009). Sin embargo esto conlleva algunas desventajas, entre ellas, el tiempo necesario para realizar la inmovilización, el empleo de reactivos tóxicos, y la necesidad de disponer de personal entrenado. Por otra parte a lo largo del tiempo hay una gradual disminución de la actividad de la enzima inmovilizada, ya sea por pérdidas o inactivación en el curso de reiterados análisis.

La reacción de Trinder (Trinder, 1969) ha sido ampliamente usada para determinar glucosa enzimáticamente. Esta reacción involucra la oxidación de la glucosa en presencia de glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, y la formación de una quinonimina roja por reacción del peróxido con 4-aminoantipirina y 4-hidroxibenzoato en presencia de peroxidasa. La quinonimina formada se determina espectrofotométricamente a 505 nm.

Actualmente muchas metodologías analíticas pueden implementarse ventajosamente mediante técnicas de análisis en flujo como Análisis por Inyección en Flujo (FIA) (Hansen y Miró, 2007), Análisis por Inyección Secuencial (SIA) (Lenehan et al., 2002; Ruzicka y Marshall, 1990), y Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFIA) (Reis et al., 1994). Estas técnicas permiten entre otras cosas la automatización de la metodología, aportando una serie de ventajas laterales como mayor precisión y productividad, así como disminución del volumen de reactivos consumidos, y por ende de desechos generados.

En este trabajo se desarrollaron dos sistemas en flujo empleando glucosa oxidasa en solución. Esta estrategia evita las dificultades asociadas a la inmovilización, pero exige un diseño cuidadoso a fin de minimizar el consumo de enzima. Teniendo en cuenta este aspecto las técnicas seleccionadas fueron análisis en flujo multiconmutado (MCFIA) y análisis por inyección secuencial (SIA).

La técnica de MCFIA ya fue probada anteriormente para la determinación de glucosa en miel con enzima inmovilizada (Sixto y Knochen, 2009). Cuenta entre sus ventajas con mayor rapidez y flexibilidad y menor consumo de reactivos que el análisis por inyección en flujo (FIA) convencional, motivo por el cual fue considerado para emplear la enzima en solución.

La otra técnica seleccionada, el análisis por inyección secuencial, fue desarrollada desde sus inicios para revertir algunas desventajas de FIA como el alto consumo de reactivos y el empleo de sistemas multicanal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Los reactivos empleados fueron de calidad analítica a menos que se indique lo contrario. D-glucosa anhidra (Anedra, pureza polarimétrica 98.6 %). D-fructosa (Sigma, contenido de glucosa <0.05%). Kit comercial para la

determinación de glucosa (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina, Serie AA), conteniendo glucosa oxidasa  $\geq 10 \text{ kU L}^{-1}$  y peroxidasa  $\geq 1 \text{ kU L}^{-1}$ .

**Instrumentación y software**

Para ambos sistemas las bobinas se construyeron empleando tubo de Teflon FEP de 0.8 mm de diámetro interno, el que se usó también para las conexiones. Como detector se empleó un espectrofotómetro Shimadzu (Kyoto, Japón) modelo UV-240 dotado de celda de flujo de 80  $\mu\text{L}$  (Hellma, Müllheim, Germany) registrándose la señal mediante su registrador gráfico. Asimismo se empleó un baño de agua termostatzado a 37°C.

*Sistema multiconmutado:* Se empleó una bomba peristáltica de cuatro canales (Alitea, Estocolomo, Suecia, modelo C8/2-XV) con tubos de bombeo de Tygon. La conmutación se logró empleando 3 válvulas solenoide de 3 vías y 12 V (NResearch, West Caldwell, NJ, USA, modelo 161T031). Las válvulas se controlaron a través de un driver CoolDrive™ (NResearch) conectado al puerto paralelo LPT1 del notebook. El software empleado para el control del sistema multiconmutado fue compilado en QuickBasic 4.0, corriendo bajo MS-DOS 6.0. Se utilizó una bobina de mezclado de 150 cm y los caudales empleados fueron de 1.5, 2.0 y 2.0  $\text{mL min}^{-1}$  para muestra, reactivo y portador respectivamente.

*Sistema SIA:* Fueron empleados una bomba de jeringa Tecan (San Jose, CA, USA) Cavro XP 3000, una válvula selectora de 10 puertos Valco (Houston, TX, USA) modelo EMHCA-CE, y una bobina de retención de 100 cm. El caudal fue de 8.5  $\text{mL min}^{-1}$  en todos los casos. Tanto la bomba de jeringa como la válvula fueron controladas desde un notebook por medio de los puertos seriales RS-232c. El software usado para controlar el sistema fue compilado en Visual Basic 6.0 corriendo bajo Windows XP.

*Descripción de los sistemas:* El sistema multiconmutado (Figura 1a) consiste de una bomba peristáltica (BP), tres válvulas solenoides de 3 vías (V1-V3), una bobina de mezclado (BM) en un baño termostatzado (BT) y un espectrofotómetro como detector (D). V1 se empleó para introducir la muestra, V2 el reactivo y V3 el portador.

Al inicio de la operación, el software requiere los parámetros de control, los cuales determinan que las válvulas se activen o no según el patrón que se muestra en la figura (Figura 1b).

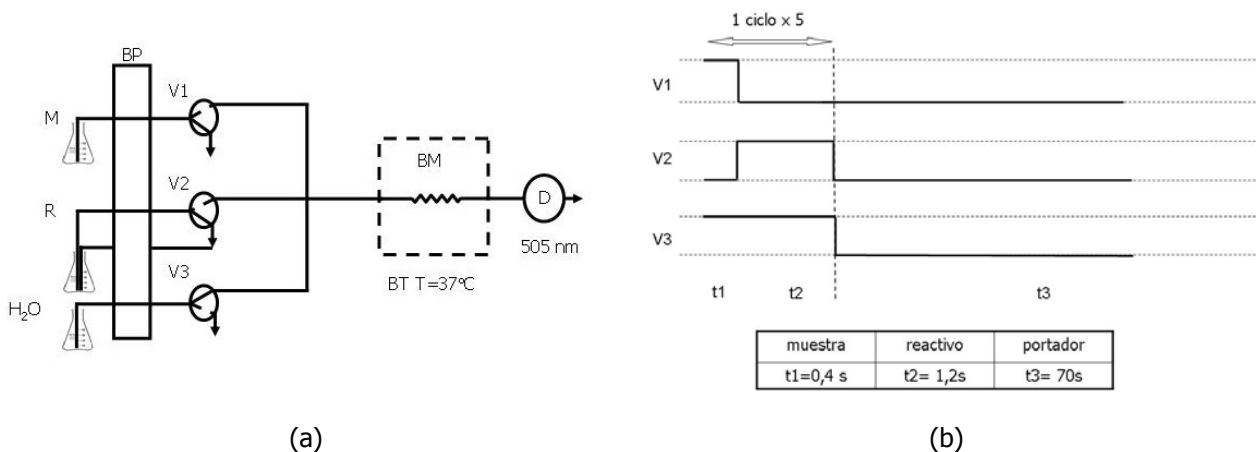


Fig. 1: (a) Esquema sistema MCFIA. BP: bomba peristáltica. V1, V2, V3, válvulas solenoide. M: muestra. R: reactivo. BM: bobina de mezclado. BT: baño termostatzado. D: detector. (---) válvula activada (—) válvula desactivada. (b) Diagrama de tiempos de la operación de las válvulas. Se representa un ciclo de un total de 5.

Cuando no están siendo introducidos al sistema los reactivos se reciclan. La operación del sistema comprende un ciclo analítico en el que los reactivos y muestra (o estándar) son inyectados repetidamente midiéndose la respuesta (máximo de absorbancia de la señal transitoria).

La muestra y el reactivo se mezclan al inicio empleando la técnica de muestreo binario (Reis et al., 1994).

Para esto se activa la válvula V1 y se desactiva la V2 durante un intervalo  $t_1 = 0,4$  s y luego se desactiva V1 y se activa V2 por un tiempo  $t_2 = 1,2$  s, repitiéndose durante 5 ciclos.

En estas condiciones un volumen de muestra de  $50 \mu\text{L}$  reacciona con un volumen de  $200 \mu\text{L}$  de reactivo enzimático. Posteriormente durante un tiempo  $t_3 = 70$  s donde las válvulas están apagadas, el bolo de muestra es impulsado a la bobina de mezclado dentro del baño termostatzado teniendo lugar la reacción y la quinonimina roja formada se detecta a  $505 \text{ nm}$ .

El sistema SIA (Figura 2) consiste en una válvula selectora multiposición, una bomba de jeringa, una bobina de retención en un baño termostatzado y un espectrofotómetro como detector.

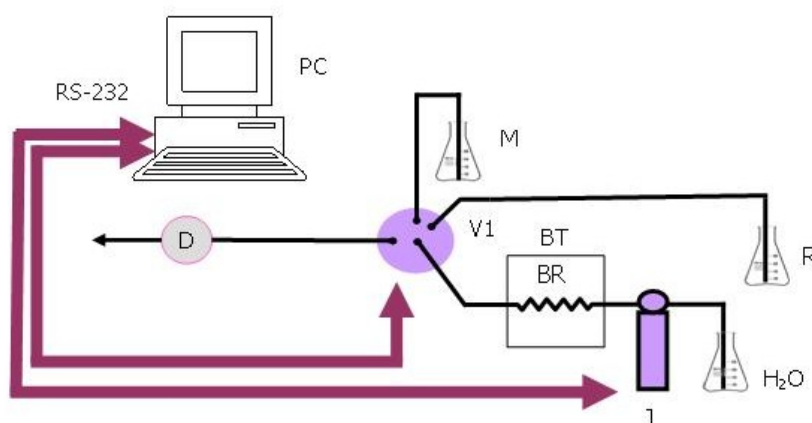


Fig. 2: Esquema SIA. J: bomba de jeringa. V1: válvula selectora multiposición. BR: bobina de retención. BT: baño. D: detector. R: reactivo. M: muestra. PC: computador con puerto RS-232.

La muestra se introdujo en 3 segmentos de  $25 \mu\text{L}$  entre segmentos de reactivo en una secuencia reactivo (R) - muestra (M) de  $42$  (R) -  $25$  (M) -  $83$  (R) -  $25$  (M) -  $83$  (R) -  $25$  (M) -  $42$  (R)  $\mu\text{L}$  respectivamente, por lo que una cantidad de muestra de  $75 \mu\text{L}$  reacciona con  $250 \mu\text{L}$  de reactivo enzimático. Los segmentos se mezclaron en la bobina de retención mediante 5 inversiones sucesivas de sentido de flujo con un desplazamiento de  $42 \mu\text{L}$  cada una. El conjunto de estas operaciones insumió  $76$  s, originando una frecuencia de muestreo de  $47 \text{ hora}^{-1}$ .

De esta forma se obtuvo una mayor sensibilidad que con un único segmento de igual volumen de muestra y reactivo.

#### Método

Se obtuvieron curvas de calibración inyectando soluciones estándar de glucosa en el rango  $0-0.8 \text{ g L}^{-1}$  midiendo la altura del pico obtenido (absorbancia). Las curvas se ajustaron por análisis de regresión de mínimos cuadrados.

Una cantidad de muestra de 2.5 g fue pesada exactamente y disuelta en 20 mL de agua bajo agitación, llevando a un volumen final de 25.0 mL. Se tomó 1.0 mL de esta solución y se diluyó con agua a 250.0 mL. Esta solución se inyectó por quintuplicado.

Para el sistema multiconmutado el agua empleada para la preparación de las soluciones fue desgaseada por calentamiento y filtración a vacío. En el caso del sistema SIA se encontró que esta precaución no era necesaria.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el sistema multiconmutado se estudiaron las siguientes variables: largo de la bobina de mezclado, volumen de muestra y volumen de reactivo.

Para el sistema SIA se estudiaron: efecto de una bobina de mezclado, volumen de muestra, volumen de reactivo y secuencia de agregado.

Como criterio de optimización se consideró la recuperación conjuntamente con la precisión y la sensibilidad. Para el cálculo de la recuperación se consideró la adición, sobre la muestra procesada como se indicó bajo "Método", de un patrón de glucosa equivalente a una variación de  $0.15 \text{ g L}^{-1}$ . La recuperación se calculó como el cociente de la diferencia de valores obtenidos, dividido la adición.

La linealidad se evaluó a través de una curva de calibración de 6 puntos en el rango  $0 - 0.8 \text{ g L}^{-1}$ . Se obtuvo respuesta lineal para ambos métodos.

La ecuación de regresión para el sistema multiconmutado fue  $h = 0.4380 C + 0.0812$  con un coeficiente de regresión  $r^2 = 0.9963$  y para el sistema SIA fue  $h = 1.0430 C + 0.1354$  con un coeficiente de regresión  $r^2 = 0.9995$  donde  $h$  es la altura de pico (absorbancia) y  $C$  es la concentración en  $\text{g L}^{-1}$ .

El examen visual del ajuste de los puntos a la recta de regresión confirmó en ambos casos la hipótesis de linealidad.

Para estudiar la potencial interferencia debida a la fructosa se emplearon tres soluciones conteniendo respectivamente fructosa, glucosa y fructosa + glucosa, en concentraciones exactamente conocidas. La relación de las concentraciones de esas sustancias fue elegida de modo de ser similar a la presente normalmente en miel.

Para el sistema multiconmutado las concentraciones de las soluciones usadas fueron fructosa  $0.1663 \text{ g L}^{-1}$ , glucosa  $0.1321 \text{ g L}^{-1}$  y la solución mezcla conteniendo  $0.1663 \text{ g L}^{-1}$  de fructosa y  $0.1321 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa.

Para el sistema SIA se empleó una solución de fructosa de  $0.1663 \text{ g L}^{-1}$ , una solución de glucosa de  $0.1387 \text{ g L}^{-1}$  y una solución conteniendo  $0.1663 \text{ g L}^{-1}$  de fructosa y  $0.1387 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa.

La señal producida por la solución de fructosa se comparó con la señal de blanco, y la señal producida por la solución de glucosa + fructosa se comparó con la señal producida por la solución de glucosa, en ambos casos mediante un test "t" de Student de valores medios. Cada solución se inyectó 10 veces.

La Tabla 1 muestra los resultados del test "t" de Student. Los valores de  $t$  experimental se comparan con el valor crítico  $t(0.05,18) = 2.101$ . No se hallaron diferencias significativas en ambos ensayos para ninguno de los métodos. Se concluyó que bajo las condiciones empleadas no existe interferencia aditiva ni multiplicativa de la fructosa.

La precisión de repetibilidad fue obtenida a partir de 10 inyecciones sucesivas y los límites de detección y cuantificación fueron expresados en contenido porcentual en masa.

Tabla 1: Cifras de mérito de las metodologías desarrolladas mediante las técnicas MCFIA y SIA.

Selectividad, prueba "t" de Student.	MCFIA	SIA
t exp, solución de fructosa vs blanco	0.026	0.543
t exp, solución de glucosa vs glucosa + fructosa	-1.430	-0.382
Precisión (s,(%), n=10)	2.98	1.25
Límite de detección, LD (3σ, % m/m)	4.00	1.81
Límite de cuantificación, LQ (10σ, % m/m)	13.20	6.02
Frecuencia de muestreo (muestras/hora)	46	47

Siete muestras del mercado uruguayo, obtenidas tanto de apicultores como de comercios, se midieron por los métodos propuestos y por el método de referencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Estudio de veracidad de los métodos propuestos sobre muestras comerciales.

Muestra	AOAC 954.11, % (m/m)	SIA, % (m/m)	Diferencia relativa SIA -AOAC 954.11 (%)	MCFIA % (m/m)	Diferencia relativa MCFIA-AOAC 954.11 (%)
1	27.8	30.04	7.95	31.56	13.37
2	27.6	28.32	2.71	29.02	5.29
3	29.5	32.99	11.77	31.59	7.02
4	29.5	32.69	10.95	30.80	4.52
5	28.9	30.87	6.94	31.62	9.54
6	27.9	28.71	2.80	31.83	10.38
7	27.7	29.05	4.75	28.63	3.23

La diferencia entre los resultados obtenidos mediante los métodos en flujo propuestos y el método de referencia AOAC 954.11, en general menores al 10%, se consideraron aceptables para la aplicación al control de calidad de la producción.

Tabla 3: Consumo de reactivos por determinación

MCFIA		SIA		AOAC 954.11	
Reactivo serie AA	Cantidad	Reactivo serie AA	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Glucosa oxidasa	2 U	Glucosa oxidasa	2.5 U	Etanol	63 mL
Peroxidasa	0.2 U	Peroxidasa	0.25 U	Iodo	0.4 g
Hidroxibenzoato	0.0004 g	Hidroxibenzoato	0.0005 g	Hidróxido de sodio	0.2 g
4-aminoantipirina	0.00002 g	4-aminoantipirina	0.000025 g	Ácido sulfúrico	0.6 mL
Fosfato monobásico de potasio	0.0025 g	Fosfato monobásico de potasio	0.003 g	Tiosulfato de sodio	0.05 g
Fosfato dibásico de potasio	0.004 g	Fosfato dibásico de potasio	0.0044 g	Carbonato de sodio	0.06 g
Volumen total	200 µL	Volumen total	250 µL	Tartrato de sodio y potasio tetrahidrato	0.06 g
				Sulfato de cobre pentahidrato	0.02 g
				Bicarbonato de sodio	0.05 g
				Yoduro de potasio	0.06 g
				Oxalato de potasio	0.05 g
				Yodato de potasio	0.003 g

Por otra parte, ambos métodos en flujo presentan un consumo pequeño de reactivo enzimático, que se compara favorablemente con los elevados consumos de diversas sustancias requeridas por el método de referencias. La Tabla 3 resume los consumos de reactivos por determinación para cada uno de los métodos considerados.

## CONCLUSIONES

Ambos sistemas permiten determinar glucosa en miel de forma rápida, simple y económica. Sin embargo el sistema SIA es más preciso y sensible y resultó asimismo menos susceptible a la presencia de aire disuelto. Los dos métodos propuestos, con un rendimiento de al menos 46 determinaciones individuales por hora son considerablemente más rápidos que el método de referencia AOAC 954.11 (separación en columna y volumetría) e incluso que el AOAC 977.20 (HPLC) que requiere unos 20 minutos por corrida.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (CSIC – UdelaR) y al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA).

## REFERENCIAS

- Cunnif, P. (Ed.) (1995a); Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Method 954.11, vol. II, p. 22 (Capítulo 44), AOAC International, Maryland, USA.
- Cunnif, P. (Ed.) (1995b); Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Method 977.20, vol. II, p. 25 (Capítulo 44), AOAC International, Maryland, USA.
- García de María, C.; Townshend, A. (1992); *Sequential determination of glucose, fructose and sucrose by flow injection analysis with enzyme reactors and spectrophotometric detection*. Anal. Chim. Acta: 261, 137-143.
- Hansen, E.H.; Miró, M. (2007); *How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses*. TRAC Trends Anal. Chem.: 26, 18-26.
- Lenehan, C.E.; Barnett, N.W.; Lewis, S.W., (2002); *Sequential injection analysis*. Analyst: 127, 997-1020.
- Miró, M.; Manera, M.; Estela, J.M.; Cerdá, V. (2004); *A multisyringe flow injection system with immobilized glucose oxidase based on homogeneous chemiluminescence detection*. Anal. Chim. Acta: 508, 23-30.
- Reis, B.F.; Giné, M.F.; Zagatto, E.A.G.; Lima, J.L.F.C.; Lapa, R.A. (1994); *Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*. Anal. Chim. Acta: 293, 129-138.
- Ruzicka, J.; Marshall, G.D. (1990); *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*. Anal. Chim. Acta: 237, 329-343.
- Sixto, A.; Knochen, M. (2009); *Multicommutated flow system for the determination of glucose in honey with immobilized glucose oxidase reactor and spectrophotometric detection*. Talanta: 77, 1534-1538.
- Trinder, P. (1969); *Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor*. Ann. Clin. Biochem.: 6, 24-25.

