



Abril 17-19, La Habana

## Sistema automatizado de cromatografía líquida con detección polarimétrica láser y aplicaciones

V. Fajer<sup>a†</sup>, C. Rodríguez<sup>b</sup>, T. Cepero<sup>a</sup>, S. Naranjo<sup>b</sup>, E. Arista<sup>a</sup>, W. Mora<sup>a</sup>, G. Mesa<sup>a</sup>, H. Fernández<sup>a</sup>, J. Arteché<sup>a</sup>, V. Hormaza<sup>c</sup> y G. Cossío<sup>a</sup>.

a) Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). La Habana. Cuba;

[vfajer@ceaden.edu.cu](mailto:vfajer@ceaden.edu.cu)

b) Facultad de Biología. Universidad de La Habana. [carlosw@fbio.uh.cu](mailto:carlosw@fbio.uh.cu)

c) Departamento Investigaciones Analíticas. Instituto Cubano de Investigaciones del Azúcar (ICINAZ); [victoria.hormaza@icinaz.minaz.cu](mailto:victoria.hormaza@icinaz.minaz.cu).

†Autor para la correspondencia

Recibido el 1/02/08. Aprobado en versión final el 1/09/2008.

**Sumario.** Se describen las características del sistema de desarrollo de cromatografía de geles utilizando como detector un polarímetro láser automático de alta sensibilidad. Se hace referencia al tubo polarimétrico de flujo diseñado de un volumen de 330  $\mu\text{L}$  y una longitud de 50mm modelado a través del programa COSMOSFloWorks 2003. El sistema referido dispone de un programa de adquisición de datos que permite la obtención en línea de los cromatogramas procedentes de la salida RS232 del detector polarimétrico. El almacenamiento de ficheros electrónicos de los cromatogramas facilita su análisis y elaboración y disminuye significativamente el tiempo requerido para el análisis de los resultados. El tiempo de medición del detector de cada punto es de 1s y utilizando una velocidad de elusión entre 5 y 10 mL/min, los tiempos de obtención de los cromatogramas oscilan entre 30 y 50 min. El sistema fue aplicado como método complementario en el diagnóstico de la enfermedad denominada escaldadura foliar que produce afectaciones significativas en los cultivos de caña de azúcar.

**Abstract.** The characteristics of the developed gel chromatographic system employing a laser polarimetric detector are described. It is referred a flux polarimetric tube of 330 $\mu\text{L}$  volume and 50 mm length designed by the authors, which was modeled using the COSMOSFloWorks 2003 program. The system has a data acquisition program which obtains on line the chromatograms from the RS232 polarimetric detector output. The storage of the chromatogram files makes easier its analysis and elaboration and diminishes significantly the required time for obtaining the results. The measurement time of the detector for each point is one second, employing an elution velocity between 30 and 50 min. The system was applied as a complementary method for diagnostics of the scald foliar disease which produces significant damages in the sugar cane plantations.

**Palabras clave.** Laser applications of, 42.62.-b, chromatography 82.80Bg, polarimeters 7.60Fs.

### 1 Introducción

En trabajos anteriores<sup>1,2</sup> se han presentado resultados sobre un sistema de cromatografía de geles con detección polarimétrica discreto desarrollado por los autores con el

que se han obtenido resultados de interés en el análisis de carbohidratos.

La cromatografía líquida de exclusión molecular con geles Sephadex G-10 y G-50 permite la separación de carbohidratos, lo cual resulta de gran importancia en la evaluación de extractos vegetales de la biotecnología y la

agroindustria. Entre sus aplicaciones se encuentra la determinación de carbohidratos presentes en el jugo de caña cuyos pesos moleculares exceden el peso de la sacarosa, los cuales influyen en la determinación del contenido real de sacarosa en jugos<sup>3,4</sup>.

El establecimiento de un sistema que combine la cromatografía líquida de exclusión molecular y la detección polarimétrica láser He-Ne de alta resolución, en un procedimiento a flujo continuo podrá contribuir beneficiosamente a la determinación de la sacarosa real y al estudio de la calidad de los jugos con mayor rapidez y economía de recursos. El detector polarimétrico láser permite realizar mediciones cada segundo atendiendo al principio magneto-óptico de medición y el empleo de pulsos de corriente lo cual resulta ventajoso respecto a otros detectores alternativos. En el presente trabajo se describe un sistema de flujo automatizado con detección polarimétrica que ha permitido obtener velocidades de elusión de hasta 10 mL/min lo que permite realizar una corrida cromatográfica en un tiempo de aproximadamente 30 min. Se evaluaron patrones de sacarosa, glucosa, dextrana y fructosa tanto por el método discreto como por el continuo y se compararon los resultados.

## 2 Materiales y métodos

Se han empleado dos sistemas polarimétricos cromatográficos desarrollados íntegramente por los autores. El primer sistema es discreto (figura 1). El mismo está compuesto por dos columnas G-10 y G-50 con gel Sephadex, se colectan las fracciones de manera discreta y se realiza la lectura polarimétrica en una cubeta fotométrica de 2 mL de capacidad. El segundo (figura 2) está compuesto por dos columnas conectadas entre sí, con selector de paso, el cual permite realizar la limpieza de sistema o el paso de la muestra al interior de las columnas.

A la salida de la segunda columna se coloca una cubeta de flujo desarrollada por los autores de 0,3 mL y a continuación, un medidor de volumen. La medición de la fracción fluida se realiza cada segundo y la velocidad se encuentra entre 5 y 10 mL/min, en dependencia del control de salida del fluido.

Las mediciones realizadas en el sistema de flujo continuo se compararon con las lecturas discretas. Con este propósito se midieron separadamente muestras de glucosa, fructosa, sacarosa 5 y una mezcla de glucosa, sacarosa y dextrana (figuras 3 a 6).

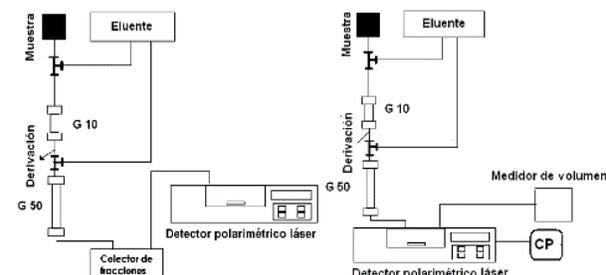
Las mediciones fueron realizadas en la escala sacariométrica del instrumento correspondiente a una concentración de 6,5 g/dL en un tubo polarimétrico de 50 mm. Esto permite disponer de una alta sensibilidad para bajas concentraciones de sustancias.

Como parte del sistema concebido se diseñó un tubo polarimétrico de flujo que permitiera la automatización del régimen de mediciones. Se modeló el flujo de líquidos<sup>5</sup> dentro del tubo polarimétrico con el propósito de obtener las características del mismo y optimizar su diseño y construcción. Para caracterizar el movimiento de

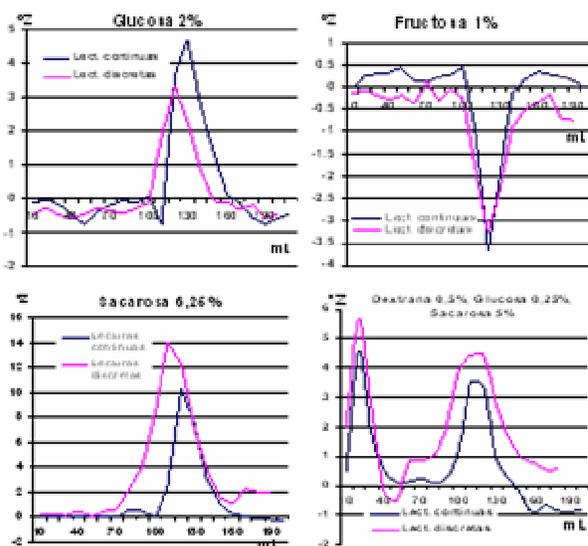
los fluidos, se emplea el número adimensional de Reynolds. Este número se calcula mediante la fórmula

$$Re = \frac{v \cdot d}{\mu} \rho$$

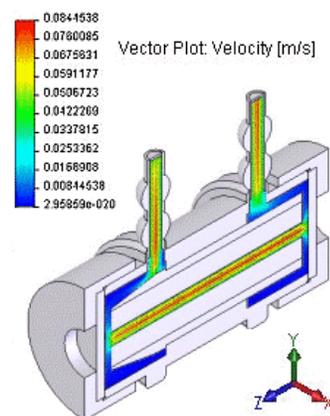
, donde:  $\rho$ , es la densidad del fluido;  $v$  es la velocidad característica del fluido;  $d$  es el diámetro de la sección transversal analizada a través de la cual circula el fluido y  $\mu$  la viscosidad del fluido.



**Figuras 1 y 2.** Esquema del sistema discreto (izq) y continuo (der).



**Figuras 3 a 6.** (Arr.) Cromatogramas de la glucosa (izq), fructosa (der); (Ab.) sacarosa (izq) y una mezcla (der).



**Figura 7.** Corte de sección transversal del tubo polarimétrico, mostrando las isolíneas de velocidad para un flujo de 10 mL/min de agua con densidad de 996,09 Kg/m<sup>3</sup>, viscosidad cinemática 0,000806

Como parámetros normalizados se impusieron para el diseño:

- Recorrido total de  $50 \pm 0,005$  mm por dentro del fluido, medido en el eje central del tubo polarimétrico.
- Diámetro del capilar interior, 3 mm.
- Diámetro medio del haz láser de He-Ne, menor que 1 mm.
- Velocidad del flujo, 10 mL/min.
- Variación de  $\rho$  y  $\mu$ .

.Tipo de modelación: flujo por el interior de una frontera definida por la geometría del tubo polarimétrico de la figura 7.

**Parámetros de diseño.** Según la modelación, se obtiene una velocidad media para el movimiento del fluido por el interior del capilar central de 0,0251 m/s y para la misma el número de Reynolds calculado es de:

$$Re_{II} = \frac{v \cdot d}{\mu} \rho = \frac{0,0251 \cdot 0,002}{0,000806} 996,09 = 62,04$$

lo cual indica un flujo del tipo lámina. En la figura 7 se muestra como se obtiene un flujo considerablemente uniforme y homogéneo sin que se produzcan regímenes de turbulencia de consideración. El diseño del tubo polarimétrico garantizó el funcionamiento del sistema de flujo con las velocidades requeridas para la cromatografía de geles.

### 3 Análisis cuantitativo con patrones de referencia con vistas a evaluar sus posibilidades como herramienta analítica

Para evaluar la linealidad del sistema se emplearon patrones de dextrana y glucosa en distintas concentraciones indicadas en las figuras 8 a 10 y se midieron las áreas de los distintos picos empleando el programa Microcal Origin 7.

El rango de las concentraciones de dextrana estuvo comprendido entre 0.125 y 2 g/dL y en el caso de la glucosa de 0.5 hasta 8 g/dL. Los patrones fueron elaborados empleando reactivos de calidad farmacéutica que fueron pesados en balanza analítica. Se observa como los picos de dextrana y glucosa se ubican correctamente y la existencia de una linealidad satisfactoria para los rangos de concentraciones evaluados.

### 4 Aplicaciones

La evaluación de jugos de caña de azúcar afectados por escaldadura foliar es un ejemplo de las posibilidades que ofrece el sistema descrito. La escaldadura foliar es una enfermedad de origen bacteriano que afecta la caña de azúcar bloqueando los vasos xilemáticos debido a la generación de un material de tipo xantano<sup>6,7</sup>.

Muestras de cañas sanas y enfermas afectadas por escaldadura foliar, variedades My5514 y C88 382 de 9 meses de crecimiento, fueron obtenidas del mismo lugar con el propósito de obtener sus cromatogramas (figuras 11 y 12).

Se muestran modificaciones que incluyen 3 fracciones

principales de este tipo de separación cromatográfica; en las fracciones de las plantas enfermas el contenido de polímeros dextrorrotatorios es incrementado afectando los correspondientes a los de baja masa molecular.

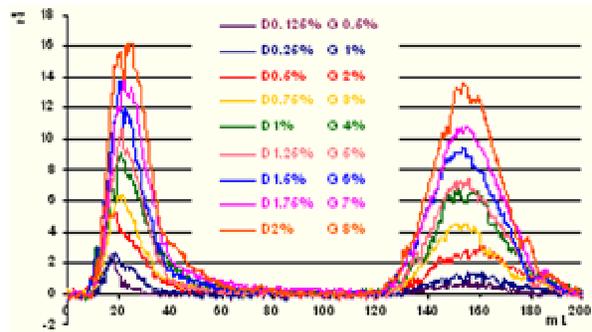
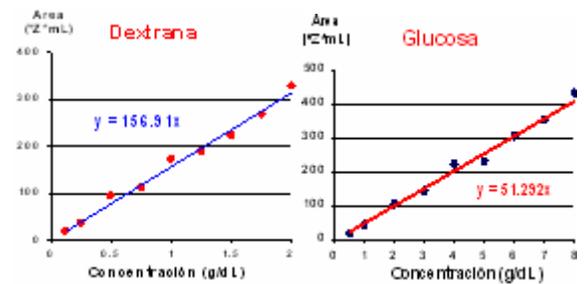


Figura 8. Cromatograma de mezclas de dextrana y glucosa en distintas concentraciones



Figuras 9 y 10. Respuesta lineal de las concentraciones de dextrana (izq) y glucosa (der).

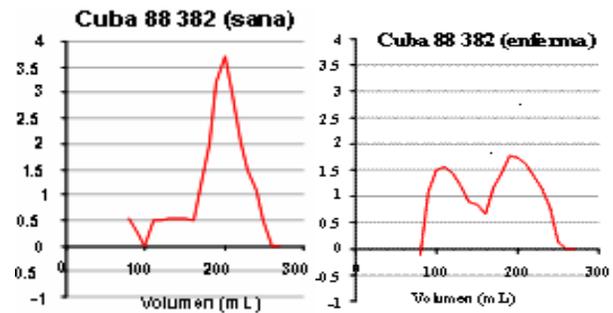


Figura 11. Cromatogramas de la variedad C 88382 sana (izq) y enferma (der).

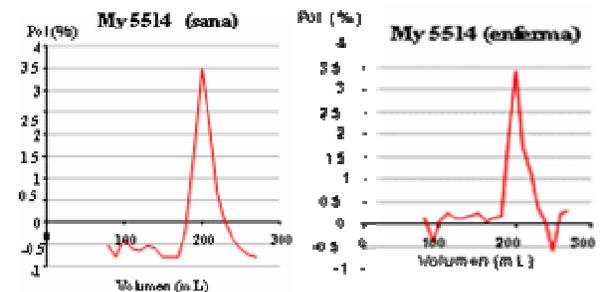


Figura 12. Cromatograma de la variedad My 5514 sana (izq) y enferma (der).

Los cromatogramas que representan las fracciones de plantas sanas y enfermas de las variedades estudiadas muestran las modificaciones de los fracciones de las plantas enfermas relativas a las sanas y de la resistente (My 5514) relativa a la susceptible (C88 382).

En la caña de azúcar resistente (My 5514) las modificaciones son evidentes en las fracciones de alta y mediana masa molecular, que fluyen primero y donde la baja presencia de xantanos no afecta significativamente la composición de la sacarosa y los reductores que constituyen la fracción mayoritaria en estos jugos, creando una modificación en los polímeros de alta y mediana masa donde los componentes dextrorrotatorios se superponen a la presencia de heterofructanos que aparecen en las cañas sanas.

En la planta susceptible C88 382, las modificaciones cubren las fracciones fundamentales de este tipo de separación cromatográfica, y en las fracciones de los jugos enfermos el contenido de polímeros se incrementa en la masa de carbohidratos de baja masa molecular. En esta variedad se distingue menos la presencia de componentes levorrotatorios relativo a la variedad My 5514.

## 5 Resultados y discusión

- Se observa en las figuras una buena concordancia entre los cromatogramas obtenidos de forma continua y discreta lo cual avala las posibilidades de empleo del sistema de flujo. Aparece una mejora de la resolución en el caso del sistema continuo que se atribuye entre otros aspectos a la posibilidad de realizar mediciones cada segundo y por tanto de construir con mayor fidelidad el cromatograma.
- El haber logrado velocidades de elusión hasta de 10 mL/min constituye una importante ventaja del sistema que permite realizar una corrida en 30 min. Los cromatogramas se almacenan en ficheros electrónicos.
- El diseño y modelación del tubo polarimétrico de flujo permitió obtener un flujo laminar en el sistema corroborado de forma teórica y experimental.
- Se han publicado resultados comparativos sobre cañas sanas y enfermas por electroforesis capilar que

muestran marcadas diferencias entre las mismas coincidentes con los resultados obtenidos.

## 6 Conclusiones

El sistema desarrollado para la evaluación de sustancias ópticamente activas tiene ventajas significativas respecto a otros métodos analíticos debido a la facilidad, rapidez y exactitud del mismo. Los resultados preliminares indican que podría utilizarse como método complementario para realizar un diagnóstico rápido de la enfermedad denominada escaldadura foliar, de caña de azúcar.

## Referencias

1. Fajer V., Rodríguez C.W., González R., Cossío G., Martínez M y Bravo O.L., Laser polarimeter LP101M and its applications in liquid chromatography. Proc.SPIE. The international society for optical engineering. Vol. 2730, pg: 234, (1995).
2. López J. Fajer V., Rodríguez W., Mora L., Fernández H. y Cossío G. Sistema magneto-óptico de detección de la actividad óptica de carbohidratos utilizando cromatografía de exclusión molecular continua. Memorias del evento TECNOLASER 2003. ISSN-1607-6281, (2003).
3. De Armas R, Legaz ME, Martínez M, Medina I, Rodríguez C. W, Vicente C.,(1989) Composition of Some Soluble Carbohydrate Fractions from Sugarcane Juice. Proceedings XX Congress ISSCT; Sao Paulo, Brazil; p., 625-33, Oct 12-21, (1989).
4. Martínez M, Legaz ME, Paneque M, De Armas R, Pedrosa MM, Medina I, et al. The Origin of Soluble Fructans in Sugar Cane Juice. Int. Sugar J, 1100:155-9.B., (1990).
5. Artech J., Fernández H., Naranjo S., Cerero T, Fajer V., Rodríguez C.W. Modelación de un tubo de flujo continuo para un sistema de cromatografía líquida con detección polarimétrica. Memorias del evento TECNOLASER 2007. ISBN 959-7136-48-1 (2007).
6. Fontaniella, C. W. Rodríguez, D. Piñón, C. Vicente, M. E. Legaz. J. Chromatography B 770,275-281, (2002).
7. C. Vicente, B. Fontaniella, A. M. Millanes, C. W. Rodríguez, M. E. Legaz, Food Sci. Biotecnol. Vol.12, No 4, pp.346-350, (2003).