

28  
Rej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMEN DE TITULACIONALES  
DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA REACCION DEL ACIDO 3,5-  
DINITROSALICILICO CON AZUCARES  
REDUCTORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA EN ALIMENTOS  
P R E S E N T A ,  
MARIANA SEDAS VALENCIA



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

28  
Rej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

GRANDE ESCUELA DE QUIMICA  
FAC. DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA REACCION DEL ACIDO 3,5-  
DINITROSALICILICO CON AZUCARES  
REDUCTORES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA EN ALIMENTOS  
**P R E S E N T A :**  
MARIANA SEDAS VALENCIA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. M en C GÓMEZ RUÍZ HUMBERTO RAMÓN
Vocal	Prof. Q GARCÍA OSUNA ADOLFO
Secretario	Prof. M en C CORNEJO BARRERA LUCÍA
1er. suplente	Prof. Q HERNANDEZ GARCADIIEGO LUCÍA
2do. suplente	Prof. M en C COUTIÑO COVARRUBIAS MARÍA VICTORIA

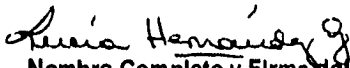
### Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado,  
Edificio B, Laboratorio de Espectrometría de Masas, Facultad de Química,  
UNAM.



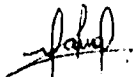
Nombre completo y Firma del Asesor del tema:

**HUMBERTO RAMÓN GÓMEZ RUÍZ**



Nombre Completo y Firma del asesor Técnico:

**LUCÍA HERNÁNDEZ GARCADIIEGO**



Nombre Completo y Firma de la sustentante:

**MARIANA SEDAS VALENCIA**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Primero que nada quiero agradecer a Dios por darme la vida, por su amor y compañía constantes en mi vida.

A mi compañero y esposo Chuy, por su amor y apoyo en todo momento. Eres mi fuente de inspiración y uno de los motores principales en mi vida.

A mis padres, a tí mamita, que inculcaste en mí los principios y valores que rigen mi vida y me enseñaste a luchar por mis ideales y tratar de ser feliz cada día como si fuera el último. A tí papá por ser tan amoroso conmigo durante toda mi vida, gracias por haberme enseñado el valor de la familia y el camino del bien.

A mis hermanos José Arturo, Sandi y Mauricio, ya que son para mí no solo grandes amigos, sino un ejemplo de vida. Gracias a sus respectivos esposos (as) por su cariño y apoyo.

A mis adorados abuelitos: Lolita y Alfredito, porque siempre han estado a mí lado, en los momentos en que más los he necesitado.

A la familia Villaseñor Bustamante, en especial a Adriana y Jesús, por alentarme en todo momento, por el apoyo y el cariño que me han demostrado siempre.

A mis compañeros y amigos, en especial a Erika por su compañía y amistad durante toda nuestra carrera, que estoy segura continuará por siempre; a Luis, Mary y Adriana por su cariño.

A todos mis maestros, en especial al Laboratorio de espectrometría de masas: a Humberto, Lucía, Adolfo, Silvia y Gini por su paciencia y apoyo en el desarrollo de mi carrera y tesis.

**A TODOS MIL GRACIAS UNA VEZ MÁS!**

## ÍNDICE:

1. Introducción,	1
2. Objetivos,	5
3. Antecedentes,	6
3.1 Azúcares Reductores,	6
3.1.1 Carbohidratos Comunes,	8
3.1.2 Estructura Química,	12
3.1.3 Reacciones Químicas de los Monosacáridos,	17
3.1.3.1 Reacciones de los Carbohidratos en Presencia de Alcalis,	17
3.1.3.2 Reacciones de Carbohidratos por Altas Temperaturas,	20
3.2 Métodos para la Determinación de Azúcares,	21
3.2.1 Reacciones de Color,	22
3.2.2 Reacciones de Oxidación por Sales Metálicas en Solución Alcalina,	24
3.2.3 Formación de Derivados,	28
3.2.4 Otros Métodos,	31
3.2.4.1 Polarimetría,	31
3.2.4.2 Refractometría,	32
3.2.5 Métodos Enzimáticos,	33
3.2.5.1 Metodología FIA (Flow Injection Analysis) para la Determinación Enzimática de Carbohidratos,	36
3.2.6 Métodos Cromatográficos,	37
3.3 Discusión sobre la Metodología Analítica (UV-VIS) en la que se Basa el Desarrollo Experimental del Presente Trabajo,	39
3.3.1 Principios,	39
3.3.2 Instrumentación,	44
3.3.3 Aplicación de las Medidas de Absorción al Análisis Cuantitativo,	47
3.3.4 Desviaciones de la Ley de Lambert y Beer,	48
3.4 Análisis de los Artículos Revisados Referentes al Método del DNS para la Determinación de Carbohidratos,	50

4. Desarrollo Experimental y Resultados,	68
4.1 Reactivos, Equipo y Material,	68
4.1.1 Reactivos,	68
4.1.2 Equipo,	68
4.1.3 Material,	68
4.2 Metodología,	69
4.2.1 Método Original para la Determinación de Azúcares,	69
4.3 Desarrollo Experimental,	70
4.3.1 Evaluación de la $\lambda$ Máxima de Absorción del Compuesto Colorido Formado,	71
4.3.2 Estudio del Mecanismo de Reacción,	73
4.3.3 Justificación del Uso de Cada uno de los Reactivos,	77
4.3.3.1 Justificación de la Sal de Rochelle,	77
4.3.3.2 Justificación del Fenol y Bisulfito de Sodio,	85
4.3.4 Evaluación del Tiempo de Calentamiento,	86
4.3.5 Protocolo de Trabajo,	89
5. Resumen de Resultados,	93
5.1. Curvas de Variación de Concentración de Glucosa con Respecto al DNS en Diferentes Condiciones,	93
5.2 Análisis de Costos,	94
6. Discusión Final de Resultados,	97
7. Conclusiones,	100
8 Bibliografía,	101

## 1. INTRODUCCIÓN:

Con la finalidad de encontrar un método analítico para determinar azúcares reductores, que fuese fácil de adaptar a un proceso automatizado de análisis, se realizó una investigación bibliográfica de los métodos clásicos de análisis de éstos.

La mayoría de ellos son métodos que involucran la formación de precipitados, como es el caso del método Fehling, basado en la reducción de una disolución alcalina de sulfato de cobre y en la formación de un precipitado de óxido cuproso rojo. El hecho de que se genere algún precipitado en el método de análisis, implica graves problemas si se piensa en su automatización.

Por lo anterior se analizaron aquellos métodos analíticos que permitieran llevar a cabo la determinación sin la formación de precipitados. De todos ellos, se encontró que en particular, el método que emplea como reactivo al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), podía ser buen prospecto para su automatización.

El método es muy empleado no sólo en el campo de la química en alimentos sino también en áreas tan importantes como la química clínica (determinación de glucosa en sangre y orina) y la biotecnología (determinación de actividades enzimáticas), entre otras. Éste método se fundamenta en la reacción de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico; El producto de la reacción es cuantificado por espectrofotometría UV-visible, tomando las lecturas en el máximo de absorción a 540 nm (43).



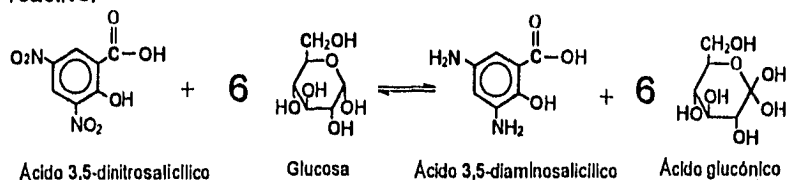
Al tratar de implantar un método automatizado es de suma importancia el tener claros los mecanismos de reacción involucrados para ver si el orden de adición de reactivos afecta o no la producción del compuesto.

Al analizar detenidamente la literatura referente al método del DNS, se resaltaba el hecho de que es un método que desde su introducción hasta la fecha, no ha sido debidamente optimizado ni estudiado a pesar de ser sumamente utilizado. Es importante mencionar que en la actualidad los recursos científicos y tecnológicos resultan ser mucho más avanzados en relación a aquellos con los que Sumner contaba en el tiempo en el que introdujo dicho método.

El método del DNS fue propuesto originalmente por J.B. Sumner en 1921 (43), quién en dos artículos posteriores (44, 45), optimiza las condiciones para llevar a cabo la reacción y básicamente desde entonces, el método no ha sido revisado o analizado con detalle. El método optimizado involucra el uso de cinco reactivos: ácido 3,5-dinitrosalicílico, NaOH, sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio), fenol y bisulfito de sodio.

Al analizar el posible mecanismo de reacción, resultó evidente el que no existe una justificación real para la adición del fenol, la sal de Rochelle y el bisulfito de sodio.

La reacción balanceada indica una relación estequiométrica entre la glucosa y el DNS de 6 a 1, sin que para ello se requiera de algún otro reactivo.



La posibilidad de que los otros reactivos tuvieran una función diferente en la determinación: como enmascarantes, soluciones amortiguadoras, o acomplejantes de otros compuestos presentes en las muestras se analizó con cuidado sin encontrar una justificación satisfactoria. Por ejemplo, si el pH se ajusta a 13 o 14 con sosa, no tiene sentido la adición del tartrato doble de sodio y potasio, ya que por sus valores de pKa este se encontraría totalmente disociado y entonces se podría utilizar tartrato de sodio que es más barato. Dado que la disolución se prepara al 30 %, la única justificación para usar la sal de Rochelle pudiera ser la solubilidad (el tartrato de sodio y potasio es más soluble). Sin embargo, como se verá posteriormente, la adición de tartratos es innecesaria, pero mas aún a esa concentración tan alta.

Sumner (44) justifica la adición de la sal de Rochelle en concentraciones tan elevadas, diciendo que el oxígeno disuelto en la solución es desplazado por efecto salino, "evitándose así la supuesta acción destructiva del oxígeno en presencia de álcali sobre el azúcar reductor", además de un supuesto incremento en la intensidad del color.

Con respecto al fenol y al bisulfito de sodio, estos son adicionados al reactivo original ya que según Sumner, "el fenol, a pesar de no tener efecto reductor sobre el ácido 3,5-dinitrosalicílico, incrementa de manera significativa la cantidad de color dada por la glucosa". "El bisulfito de sodio se adiciona ya que se observaba que el color producido después del calentamiento era inestable y con la adición de pequeñas cantidades de éste reactivo se prevenía lo anterior".

Como se verá más adelante, ninguno de estos reactivos mejora las condiciones de reacción, por lo menos en muestras que únicamente

contienen glucosa; habría que ver si esto es diferente al tratar muestras reales.

Otro hecho que resulta cuestionable en el método original, es la longitud de onda a la cual se toman las lecturas, ya que al obtener el espectro de absorción del compuesto reducido, el máximo de absorción se presenta a 480 nm y no a 540, longitud reportada en el método de referencia.

De todo lo anterior se deducía que el método presentaba serias dudas en su proceso y que era necesario llevar a cabo una revisión minuciosa de todo el procedimiento y establecer un adecuado protocolo de trabajo en donde se propusiera un método optimizado más simple, rápido y sobre todo mucho más barato.

Este método es ampliamente utilizado en los laboratorios de enseñanza de ésta Facultad de Química, por lo que es sumamente importante el optimizarlo de manera integral, con lo cual se obtendrán ventajas significativas de entre las que se encuentran mejoras en sensibilidad y eficiencia así como reducción de costos.

## **2. OBJETIVOS:**

- 1. Revisión bibliográfica del método para la cuantificación de azúcares reductores por su reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.**
- 2. Estudio del mecanismo de reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con azúcares reductores, basados tanto en estudios teóricos como en datos experimentales.**
- 3. Evaluación y justificación del uso de cada uno de los reactivos que intervienen en la metodología original. Modificación de algunos parámetros con la finalidad de optimizar la reacción.**
- 4. Proposición de un protocolo de trabajo que incluya el método optimizado, tomando en cuenta tanto el uso de reactivos como las condiciones de la reacción.**

### **3. ANTECEDENTES:**

#### **3.1 AZÚCARES REDUCTORES:**

Los carbohidratos constituyen uno de los grupos más importantes de sustancias orgánicas de origen natural, ampliamente distribuidos en la naturaleza se encuentran en frutas, vegetales, miel, leche, etc.; son las unidades en que están constituidos carbohidratos más complejos (polisacáridos) como el almidón, celulosa, pectina, glucógeno, etc. Aparecen de igual manera en moléculas orgánicas tanto simples como complejas como los ácidos nucleicos (DNA y RNA), las glucoproteínas, etc. Todos los carbohidratos deben ser desdoblados hasta azúcares simples (monosacáridos) para poder ser asimilados, siendo la glucosa y la fructosa los monosacáridos más comunes.

Los azúcares y almidones derivados de materiales de origen vegetal desempeñan un papel importante en la nutrición y en la industria alimentaria; resultan ser la fuente más abundante y barata de alimentos de la naturaleza y por lo tanto los más consumidos por los seres humanos "en muchos países constituyen de un 50 a 80 % de la dieta del pueblo (1)".

La determinación tanto cualitativa como cuantitativa, el aislamiento, purificación y modificación de los carbohidratos, resultan ser prácticas sumamente recurridas en muy diversas áreas tanto de la industria como de la investigación, por lo cual resultan ser de gran importancia.

Los carbohidratos se definen como polihidroxialdehídos, polihidroxiketonas o compuestos que por hidrólisis, se convierten en estos.

Los carbohidratos que no pueden ser hidrolizados en otros más simples se denominan monosacáridos, como los de tres átomos de carbono llamados triosas, o los de cuatro, cinco y seis que corresponden a las tetrosas, pentosas y hexosas, respectivamente. A su vez a los que contienen el grupo cetona se les asigna el sufijo "ulosa" para distinguirlos de los aldehídos que llevan la terminación "osa", por ejemplo la levulosa (siendo la fructosa su nombre común) es una cetosa del grupo de las hexulosas, mientras que la glucosa es una aldosa que pertenece a las hexosas. A pesar de que en el reino vegetal se encuentran muchos azúcares de seis átomos de carbono, sólo cinco se han aislado en estado libre, tres de los cuales son aldosas (glucosa, galactosa y manosa) y dos cetosas (fructosa y sorbosa).

(1)

Los monosacáridos son los monómeros o unidades básicas de los carbohidratos más complejos; la unión química de pocos de ellos (de 2 a 10, aproximadamente) da como resultado los oligosacáridos; cuando el número es más grande, se forman los polisacáridos, que a su vez pueden ser constituidos por una o varias clases de monómeros. La palabra azúcar se emplea para designar generalmente a los carbohidratos clasificados como mono y oligosacáridos.

A continuación se presentan algunas clases y ejemplos de carbohidratos de origen natural:

### MONOSACÁRIDOS:

Pentosas (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	Hexosas (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )
L-arabinosa	D-glucosa
D-ribosa	D-fructosa
D-xilosa	D-galactosa
	D-manosa

### OLIGOSACÁRIDOS:

Disacáridos (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Trisacáridos (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> )
sacarosa (D-glucosa + D-fructosa)	rafinosa (D-glucosa + D-fructosa + D-galactosa)
maltosa (D-glucosa + D-glucosa)	
lactosa (D-galactosa + D-glucosa)	

### POLISACÁRIDOS:

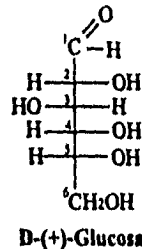
Plantas	Animales
almidón	glucógeno
celulosa	

#### 3.1.1 CARBOHIDRATOS COMUNES: (1, 2, 3, 4, 5)

La **glucosa** es un azúcar de seis carbonos y, por consiguiente, es designado como una hexosa. El hecho de que el grupo carbonilo sea aldehídico se indica clasificando la glucosa como una aldohexosa. Es el monosacárido más común, y bien pudiera ser que el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza.

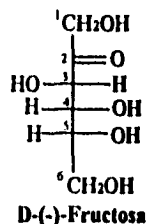
Se encuentra libre en la sangre (azúcar sanguíneo) y en otros numerosos fluidos corporales, así como en los jugos de las plantas (azúcar de uva), y es el componente principal de muchos oligosacáridos y polisacáridos.

La glucosa es metabolizada directamente por el organismo. La D-glucosa existe en estado anhidro (p.f. 146 °C) y en forma hidratada (p.f. 86 °C) la cual contiene una molécula de agua. Se obtiene comercialmente por hidrólisis del almidón y de los disacáridos, tales como sacarosa, y por consiguiente, es común en muchos productos alimenticios que contienen azúcares.



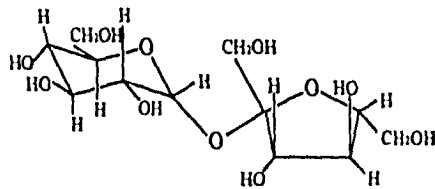
La *fructosa* es también un azúcar de seis carbonos, el hecho de que el grupo carbonilo sea cetónico se indica clasificando la fructosa como una cetohehexosa, las cuales se nombran también utilizando el sufijo -ulosa y, por consiguiente, es designado como una hexulosa. Es un componente de jugos de frutas y de la miel. Se encuentra normalmente acompañada de D-glucosa y sacarosa. Una mezcla de D-glucosa y D-fructosa se denomina azúcar *invertido*. La D-fructosa se convierte fácilmente en D-glucosa en el cuerpo. Se puede producir enzimáticamente a partir de jarabe de glucosa.





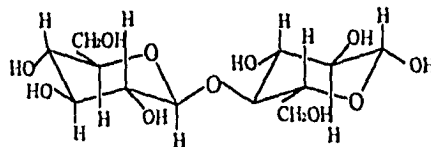
La **sacarosa**, el azúcar de mesa común, es un disacárido integrado por una glucosa cuyo carbono aldehídico se une al cetónico de la fructosa, estableciendo un enlace glucosídico  $\beta(1,2)$  que impide que este disacárido sea reductor por carecer de grupos aldehído o cetona libres. La fructosa que contiene la sacarosa, está como furanosa tensionada, lo que hace que el enlace glucosídico sea muy lábil al calor y a los ácidos y se pueda hidrolizar muy fácilmente, produciendo una mezcla altamente reductora de los correspondientes monosacáridos; de hecho, entre todos los disacáridos, ésta unión es de las más sensibles. Comercialmente se obtiene de la remolacha azucarera y de la caña de azúcar; abunda en forma natural en la mayoría de las frutas, de las raíces y de los granos, en concentraciones que varían de manera considerable según el grado de madurez de estos productos; además es considerado como uno de los principales productos orgánicos industriales. Como ya se mencionó, la sacarosa es un azúcar no reductor, que no presenta mutarrotación debido a que las unidades de hexosa que la forman se unen por medio de sus carbonos anoméricos. Tiene una rotación de signo positivo ( $[\alpha] = +66.5^\circ$ ) Lo mismo que la D-glucosa ( $[\alpha] = +52.7^\circ$ ). Por otra parte, la D-fructosa tiene una rotación negativa grande, ( $[\alpha] = -92.4^\circ$ ). Por esto la hidrólisis completa de la sacarosa para dar glucosa y fructosa, causa una inversión del signo de la rotación y el producto es conocido como azúcar invertido. La miel es

principalmente azúcar invertido debido a que las abejas contienen la enzima invertasa ( $\beta$ -fructosidasa) que cataliza la hidrólisis. La sacarosa tiene una solubilidad en el agua extraordinariamente elevada: (1.5 g de sacarosa se disuelven en 1 g de agua a la temperatura ambiente) y además posee una gran capacidad de hidratación (6.6 +/- 0.7 Moles  $H_2O$  / mol azúcar).



(+)-Sacarosa

La *lactosa* (azúcar de la leche) es un disacárido que se encuentra en la leche de los mamíferos y tiene sólo ligero sabor dulce. Es hidrolizada por los ácidos y por la  $\beta$ -galactosidasa produciendo cantidades iguales de D-galactosa y D-glucosa que en el disacárido se encuentran unidas mediante un enlace glucosídico  $\beta(1,4)$ . Debido a que el carbono anomérico de la glucosa está libre, este disacárido presenta las características de los azúcares reductores, existe en los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ , y por lo tanto, presenta el fenómeno de mutarrotación. La lactosa tiene la fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . La lactosa se obtiene normalmente a partir del suero, un subproducto de la manufactura del queso.



Lactosa (anómero $\beta$ )

### 3.1.2 ESTRUCTURA QUÍMICA: (1, 2, 3, 4)

Los monosacáridos más comunes en la naturaleza, tales como las tetrosas, pentosas y hexosas, derivan del D-gliceraldehído con la adición de grupos CHOH a la cadena básica de carbonos. El átomo número dos del gliceraldehído es asimétrico y puede existir como los isómeros D y L (fig. 1); en los primeros el hidroxilo del carbono simétrico más alejado del aldehído (átomo de carbono de referencia), se encuentra a la derecha del plano lineal de la molécula (en las hexosas, las pentosas y las tetrosas, se localiza en el C-5, C-4 y C-3 respectivamente), y en los de la serie L dicho hidroxilo de referencia se ubica a la izquierda del plano central.

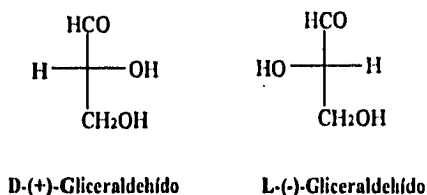


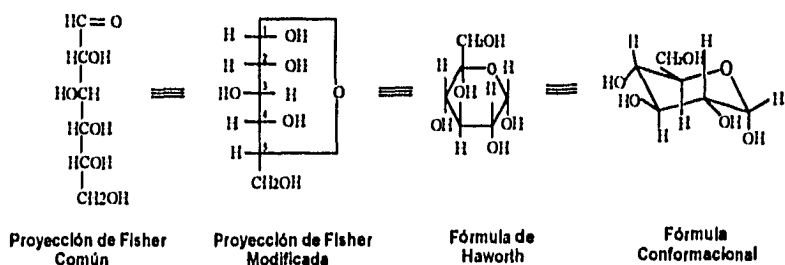
Figura 1. Formas D- y L- del gliceraldehído

Es necesario hacer notar que las designaciones D y L no indican la dirección en la cual el azúcar hace rotar el plano de la luz polarizada, y si se desea hacer mención a su poder rotatorio, se deben incluir los signos (+) o (-) que corresponden a carbohidratos dextrorrotatorios o levorrotatorios, respectivamente.

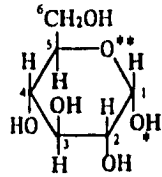
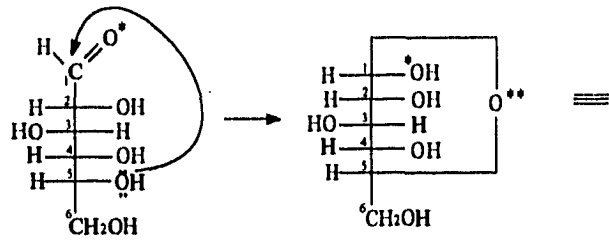
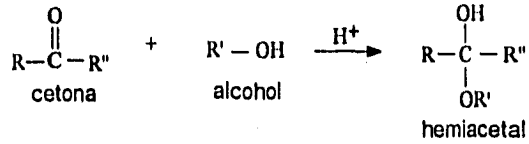
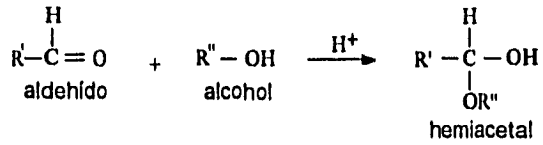
Se llama epímero el azúcar cuya única diferencia en su molécula es la localización o posición de un solo hidroxilo que no sea el de referencia; así

la glucosa es epímero de la manosa en el hidroxilo del C-2; igualmente la glucosa y la galactosa son epímeros por el hidroxilo del C-4.

Las representaciones químicas pueden hacerse con las proyecciones de Fisher y de Haworth, o bien con la fórmula conformacional (fig. 2). En la primera, los carbonos están en una cadena lineal abierta y se numeran a partir del aldehído, pero en el caso de las cetosas se hace por el átomo de carbono más cercano a la cetona. Debido a su alta reactividad, el carbonilo interactúa con grupos alcohol de la misma molécula, produciendo enlaces hemiacetales intramoleculares que originan azúcares cíclicos, y que en agua se encuentran en equilibrio con la cadena abierta (fig. 3). En las hexosas se producen generalmente compuestos de conformación de piranosa (anillos de seis átomos), excepto en el caso de la fructosa que es una furanosa (anillo de cinco átomos); de estos dos arreglos, el primero es el más estable y más común entre los distintos azúcares debido a que presenta menos tensiones entre los enlaces. Por lo tanto, estos hidratos de carbono se denominan con la terminación piranosa o furanosa, según el tipo de anillo que desarrollen.

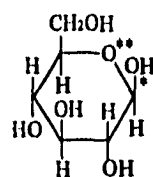


**Figura 2.** Relaciones entre las fórmulas de Fisher, Haworth y conformacional de la  $\alpha$ -D-glucosa.



$\alpha$ -D-glucosa

ó

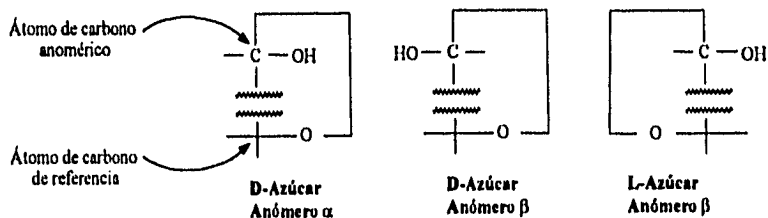


$\beta$ -D-glucosa

**Figura 3.** Enlaces hemiacetal de los monosacáridos.

La unión hemiacetal origina un nuevo centro asimétrico correspondiente al carbono anomérico en posición 1 de la representación de Haworth que da origen a dos posibles enantiómeros; la asignación de la

designación  $\alpha$  o  $\beta$  depende de la relación entre la configuración del carbono anomérico y la del carbono que determina si el compuesto es D o L (el átomo de carbono de referencia). Cuando se dibuja una fórmula de proyección de Fisher de la molécula cíclica para indicar configuración D o L en el átomo de carbono de referencia, la molécula es  $\alpha$  si el grupo (OH o OR) está situado al mismo lado de la cadena carbonada vertical que el grupo de referencia y  $\beta$  si el grupo anomérico y el grupo de referencia están en lados opuestos, (fig. 4). En la serie D, esto corresponde a que el grupo anomérico de un anómero  $\alpha$  esté situado por debajo del plano del anillo en las estructuras conformacionales o de Haworth. En la serie L es el anómero  $\beta$  el que se dibuja con el grupo anomérico abajo.



**Figura 4.** Representación de los átomos de carbono anoméricos y de referencia.

Cabe indicar que los diferentes isómeros de un azúcar pueden presentar características físicas y químicas distintas, como ocurre con la  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosa (ver tabla 1)

	$\alpha$ -D-glucosa	$\beta$ -D-glucosa
Rotación específica	+112.2°	+18.7°
Punto de fusión (°C)	146	150
Solubilidad en agua (%)	82.5	178
Velocidad relativa de oxidación con glucosa oxidasa	100	<1.0

Tabla 1. Propiedades de la glucosa.

La representación cíclica de Haworth es más adecuada ya que las cadenas lineales no responden estequiométricamente al poder reductor de los grupos aldehído o cetona. Las soluciones acuosas de los monosacáridos sufren modificaciones en su actividad óptica durante el almacenamiento lo cual indica que existe un proceso dinámico de conformación química hasta alcanzar el equilibrio mediante el fenómeno que recibe el nombre de mutarrotación; por ejemplo, la  $\alpha$ -D-glucosa disuelta en agua tiene una rotación óptica de aproximadamente (+)112°, que se reduce a (+)53° después de 4 horas, cuando se alcanza el equilibrio entre las formas cíclica y lineal; por su parte, la  $\beta$ -D-glucosa aumenta de (+)19° a (+)53° en un proceso similar al anterior. La mutarrotación es una manifestación del equilibrio que se establece entre las estructuras anomérica o de aldehído y la cíclica o hemiacetal de los azúcares reductores (fig. 5).

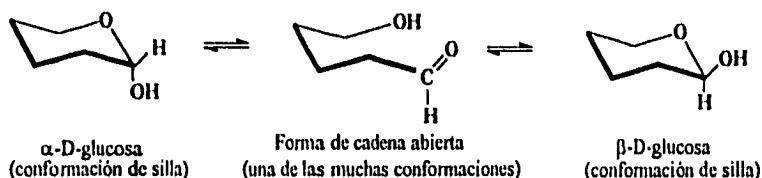


Figura 5. Mutarrotación de la D-glucosa en solución, pasando por la forma aldehído de cadena abierta.

### **3.1.3 REACCIONES QUÍMICAS DE LOS MONOSACÁRIDOS: (1, 6, 7)**

Los monosacáridos tienen un grupo aldehído o una cetona y varios hidroxilos y consecuentemente los cambios químicos a los que están sujetos se relacionan con la transformación de estas funciones.

Se ven afectados por los ácidos, los álcalis, las altas temperaturas y los agentes oxidantes y reductores, que provocan su isomerización, enolización, deshidratación, ciclización, oxidación, reducción además de una de las reacciones más relevantes en el área de los alimentos (confitería, panadería), que es la reacción de oscurecimiento o empardeamiento (1); sin embargo, de las posibles reacciones que puede sufrir un carbohidrato, solo se hablará de aquellas relacionadas con el método estudiado (Reacción de azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico); es decir, las que se llevan a cabo en presencia de álcalis y en presencia de altas temperaturas.

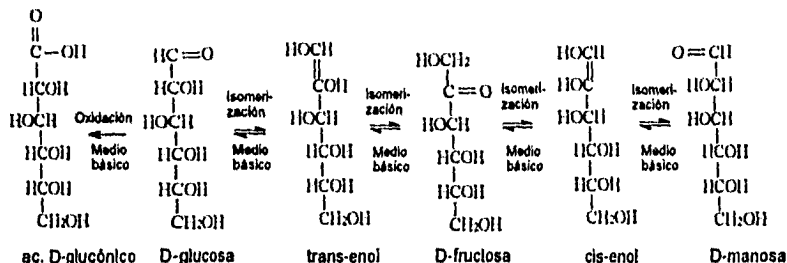
#### **3.1.3.1 REACCIONES DE LOS CARBOHIDRATOS EN PRESENCIA DE ÁLCALIS:**

La acción de los álcalis sobre los azúcares sigue tres vías de manera general: la isomerización, principalmente del grupo reductor final de la molécula; fragmentación en sustancias con un número menor de átomos de carbono en relación al azúcar original y reacciones internas de oxidación y reducción.

Los álcalis inducen diversas transformaciones en los monosacáridos según la concentración de álcali empleada; en soluciones consideradas débiles (0.05 N) se produce la isomerización de los azúcares, como ocurre



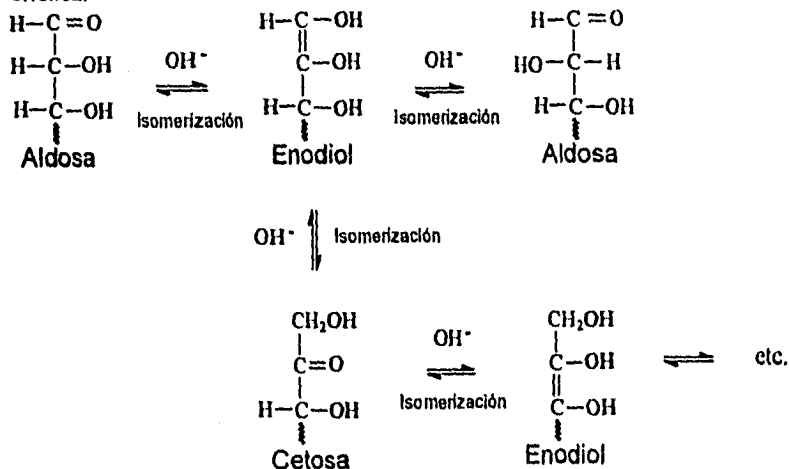
con la glucosa que se tautomeriza y produce un enol, que por un arreglo se convierte en una mezcla de D-fructosa (32 %), D-manosa (3 %) y D-glucosa (65 %), (fig. 6). Este cambio que es más fácil a pH alcalino puede ocurrir también en condiciones ácidas, pero a una velocidad más baja.



**Figura 6.** Transformación de la glucosa por isomerización con bases débiles hasta manosa; por oxidación a ácido glucónico.

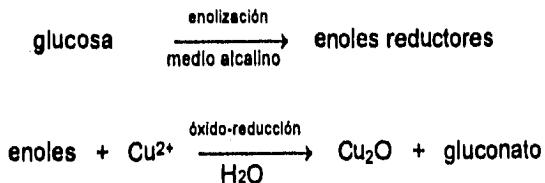
Esta interconversión es explicada por la formación de una forma

endólica:



Al incrementarse la concentración de álcali (0.5 N), además de formarse enoles en todos los carbonos del monosacárido, estos se rompen en los átomos en que se localiza la doble ligadura; por ejemplo, la hidrólisis de un enol entre el C-1 y el C-2 produce una molécula de formaldehído y una pentosa, entre el C-2 y el C-3 una tetrosa y aldehído glicólico, y entre el C-3 y el C-4, gliceraldehído y una triosa. Las aldosas que se generan con éste rompimiento pueden a su vez enolizarse y sintetizar nuevos compuestos, entre los cuales destacan el diacetilo, el acetol, la acetoina y algunos ácidos como el láctico, el propiónico y el pirúvico.

Cabe indicar que debido a que estos enoles son agentes muy reductores (más que los propios monosacáridos de donde provienen), su presencia se aprovecha para medir el poder reductor de los azúcares, mediante una reacción alcalina en la que se usa el ion cúprico como agente oxidante. El método más conocido es el de Fehling, que emplea sulfato cúprico con tartrato de sodio y potasio; al calentar el carbohidrato disuelto en ésta solución se generan enoles que reducen el ion cúprico a cuproso, produciéndose el óxido correspondiente de color rojo; la secuencia de éstas reacciones para el caso de la glucosa, se resume a continuación:



Además del método Fehling, existen otros, como el de Benedict y el de Somogy, basados en un principio semejante.

En condiciones fuertemente alcalinas, los grupos aldehído o cetona se oxidan y se convierten en sus correspondientes ácidos; por ejemplo, la glucosa se transforma en ácido glucónico, (ver fig. 6).

### 3.1.3.2 . REACCIONES DE CARBOHIDRATOS POR ALTAS TEMPERATURAS (90°C):

Las altas temperaturas aceleran considerablemente todos los cambios que le suceden a los monosacáridos en condiciones tanto ácidas como alcalinas, pero a pH neutro catalizan las reacciones de caramelización y de oscurecimiento no enzimático.

Además de estos efectos, el calentamiento de los azúcares también favorece algunos mecanismos que implican la polimerización y la epimerización de los monosacáridos; por ejemplo, cuando la glucosa se somete a tratamientos intensos de temperatura, se propicia la síntesis de oligosacáridos tales como gentobiosa (6-O-β-D-glucopiranosil-glucopiranososa), isomaltosa (6-O-α-D-glucopiranosil-glucopiranososa), maltosa, panosa, celobiosa y otros más complejos; en el caso de la lactosa se observa la epimerización de la glucosa en fructosa, con lo cual el disacárido se convierte en lactulosa.

### **3.2 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES:**

Los carbohidratos resultan ser una de las clases de compuestos orgánicos que presentan una variedad muy grande de reacciones, formas y derivados químicos, en el presente trabajo solo se hará mención de los métodos clásicos más recurridos en ésta área (7, 8).

La mayoría de las determinaciones de carbohidratos se basan en el hecho de que en el caso de los azúcares reductores, los grupos aldehídicos o cetónicos libres que tienen en su estructura, reaccionan como agentes reductores débiles (Estos incluyen todos los monosacáridos y a los disacáridos maltosa, lactosa y celobiosa). Sin embargo, otros de los disacáridos tales como sacarosa y rafinosa además de los oligosacáridos superiores, como el almidón y la celulosa, que resultan ser carbohidratos no reductores debido a que están constituidos por azúcares simples combinados a través de sus grupos aldehídicos o cetónicos, deben ser hidrolizados a sus azúcares reductores constituyentes para poder ser determinados como azúcares reductores.

El análisis de azúcares reductores como la glucosa, puede ser llevado a cabo usando métodos físicos, químicos y bioquímicos. Las medidas cuantitativas de los azúcares pueden realizarse con polarimetría, refractometría, reacciones de reducción química, reacciones enzimáticas asociadas con desarrollo de color, cromatografía de gases (CG) o cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) (10); muchas de las pruebas cuantitativas, son aplicables a la determinación cualitativa de azúcares, con la única finalidad de su identificación, tal es el

caso del color desarrollado en la presencia de ácidos y fenoles o la formación de metales u óxidos metálicos por la acción de los azúcares reductores sobre sales de metales pesados.

### **3.2.1 REACCIONES DE COLOR:**

Un gran número de reacciones con azúcares, producen compuestos de colores rojizos que pueden ser detectados de manera sensible y eficaz con el uso de espectrofotómetros o colorímetros, con lo cual se han desarrollado métodos muy sensibles para la determinación cuantitativa de los azúcares.

La reacción de color más distintiva presentada por los azúcares es la que se obtiene por tratamiento con diferentes fenoles en la presencia de ácido sulfúrico o clorhídrico concentrado. Los monosacáridos en solución ácida fuerte, forman un furfural que se une a compuestos fenólicos para dar una coloración que permite cuantificar y en ocasiones identificar un problema (71).

Como ya se mencionó, la presencia de carbohidratos es indicada por el desarrollo de color (generalmente café rojizo), cuando la muestra que contiene el azúcar es tratada con ácido sulfúrico concentrado y un fenol, amina aromática o compuesto relacionado apropiados; por ejemplo:  $\alpha$ -naftol (Prueba de Molish para carbohidratos), resorcinol, naftoresorcinol, cresol, timol, orcinol, fluoroglucigol, antrona y carbazola (7, 8, 71). A continuación se presenta un resumen de las principales reacciones de éste tipo para el análisis de carbohidratos:

REACCIÓN	REACTIVO	CARACTERÍSTICAS
Molish	$\alpha$ -Naftol Ácido sulfúrico	Muy sensible. Positiva con la mayoría de hidratos de carbono.
Selivanoff	Resorcinol Ácido clorhídrico	Positiva con las cetosas.
Tollens	Floroglucigol Ácido clorhídrico	Positiva con galactosa, pentosas y ácido glucorónico.
Tauber	Bencidina Ácido acético	Con las pentosas da color rojizo.
Antrona	Antrona Ácido sulfúrico	Positiva con la mayoría de carbohidratos. Muy sensible. Cuantitativa
Ortotoiluidina	Ortotoiluidina Ácido acético	Muy sensible. Cuantitativa

**Tabla 2.** Principales reacciones de coloración.

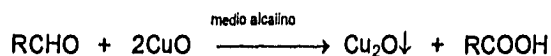
En relación a lo anterior, uno de los métodos más utilizados para la cuantificación de azúcares es el del Fenol-Ácido sulfúrico, en el cual los azúcares simples, así como los polisacáridos, oligosacáridos y sus derivados, incluyendo los metil éteres, con grupos aldehído libres o potencialmente libres; dan compuestos de color anaranjado-amarillo al ser tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado. La reacción resulta ser muy sensible y el color es estable. (12)

Los azúcares reductores reducen a los nitrofenoles como el ácido pícrico (que es reducido al amido dinitrofenol), *o*-dinitrobenzenceno, *m*- o el *p*-nitrobenzaldehído y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, entre otros, dando lugar a compuestos característicos de color rojizo. El azul de metileno, se reduce y se decolora por soluciones alcalinas de azúcares reductores; la safranina cambia de color rojo a amarillo bajo condiciones similares (7).

Aunque ya se mencionó, resulta importante recalcar el fundamento de uno de los métodos más utilizados para el análisis de azúcares reductores, se trata del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, el cual al reaccionar con los azúcares reductores en un medio alcalino da lugar a un compuesto nitroamino rojizo, altamente colorido que es determinado espectrofotométricamente. (43, 44, 45)

### 3.2.2 REACCIONES DE OXIDACIÓN POR SALES METÁLICAS EN SOLUCIÓN ALCALINA (7, 8, 71)

Los azúcares simples y algunos disacáridos como maltosa y lactosa, tienen la propiedad de reducir las soluciones alcalinas de algunas sales de cobre, plata, mercurio y bismuto. Esta resulta ser una reacción característica de los aldehídos, cuyo fundamento es la oxidación del grupo aldehído o cetona. La base reducida es precipitada, ya sea como metal libre o como óxido:



En solución alcalina, los azúcares reductores son oxidados por oxidantes suaves, tales como las disoluciones de Benedict "solución alcalina de ion complejo cúprico con ion citrato" y Fehling "en la que el complejo cúprico es con ion tartrato" (ambas son reducciones de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ ) y el reactivo de Tollens (Reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ ) dando lugar a metales u

óxidos respectivos, lo que resulta ser una evidencia de la presencia de azúcares reductores en la muestra.

Es importante mencionar que la reacción llevada a cabo entre los azúcares y las sales alcalinas de los metales, generalmente no procede estequiométricamente ya que se sabe que los azúcares con grupos aldehído y cetona libres, sufren rápidamente cambios, aún cuando se encuentren en soluciones débilmente alcalinas. La glucosa, fructosa y la manosa sufren entre sí una interconversión hasta establecerse el equilibrio. Bajo éstas circunstancias, es sorprendente como la reacción mencionada, puede ser considerada como método cuantitativo; sin embargo, se ha encontrado que a pesar de que puede haber formación de muy diversos productos por acción del medio alcalino, al estandarizarse las condiciones de reacción, se puede asegurar que la cantidad de óxido cuproso formado resulta ser proporcional a la cantidad de azúcar reductor presente en la muestra.

La introducción del tartrato de sodio y potasio, como componente del reactivo, tuvo lugar en 1844 por parte de Barreswil (7), quien reporta haber encontrado que con la adición de dicho compuesto, la estabilidad de las soluciones de sulfato cúprico se incrementa de sobremanera, debido a la formación de sales complejas, favoreciendo así la estabilidad del cobre en solución.

Existen otros compuestos que también pueden ser adicionados al reactivo para estabilizar las sales cúpricas en solución alcalina, como son los citratos, oxalatos, salicatos y glicerol entre otros.

Debido a que el método de reducción de cobre ha sido utilizado de una manera tan general, se le han realizado numerosas modificaciones, que



se encuentran basadas en los mismos principios fundamentales, pero que difieren en detalles analíticos.

La solución de Fehling, resulta ser inestable, por lo cual se han realizado esfuerzos por mejorar su estabilidad. Muchas sustancias orgánicas diferentes a los azúcares causan precipitación de óxido cuproso o por el contrario la previenen aun cuando se encuentren presentes los azúcares en solución. Consecuentemente, han sido utilizadas otras disoluciones de cobre, especialmente para análisis biológicos. Como fuente de ion cúprico, pueden ser utilizados tanto el sulfato como el acetato de cobre (método de Barfoed) (7). El hidróxido de potasio ha sido utilizado en lugar del hidróxido de sodio, en otros métodos. Los citratos o carbonatos, han sustituido al hidróxido de sodio y de potasio con la finalidad de producir reactivos con menor alcalinidad, como es el caso del reactivo de Benedict y Soldani. Sin embargo a pesar de todas estas modificaciones, la solución de Fehling-Soxhlet, ha sido la más ampliamente utilizada en el análisis de azúcares, aunque puede ser que otras soluciones de cobre sean más convenientes bajo circunstancias especiales.

Se ha encontrado que la cantidad de cobre reducida por acción de varios azúcares, varía en función del grado de alcalinidad, temperatura, tiempo de calentamiento, concentración y naturaleza del azúcar, tipo de tartrato (D, L o meso), el tiempo de contacto con el aire, etc. Sin embargo se puede asegurar que bajo condiciones estandarizadas, la cantidad de óxido cuproso formado es proporcional a la cantidad inicial de azúcar.

Es importante mencionar que el óxido de cobre precipitado, (durante la reducción, bajo condiciones estándares establecidas), puede determinarse por muy diversas técnicas (7, 8, 11). El óxido cuproso formado puede ser pesado directamente, (método Munson-Walker, en donde la cantidad de

azúcar se determina en tablas), o puede sufrir una ignición para formar el óxido cúprico. El  $\text{Cu}_2\text{O}$  puede ser reducido a cobre metálico por acción de hidrógeno, por vapor de alcohol o por electrólisis en solución de ácido nítrico.

En el método del cianuro (8), se determina el exceso del ion cúprico, es decir el cobre no reducido proveniente del filtrado de óxido de cobre, el cuál es titulado con una solución estandarizada de cianuro de potasio hasta la desaparición del color azul. La diferencia entre el cobre de la solución de Fehling y aquel encontrado en el filtrado después de la reducción, es la cantidad de cobre reducido por el azúcar.

También han sido desarrollados algunos métodos que miden el grado de la reducción, sin la necesidad de filtrar el precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$  formado. Se puede llevar a cabo la titulación del exceso del ion cúprico. Los métodos Scales, Shaffer-Hartmann y Shaffer-Somogy emplean la determinación iodométrica del ion cuproso en la presencia de citratos que forman lones complejos con los iones cúpricos. El método Folin-Wu (8) y su modificación según Benedict, se basa en la medida del color producido por la reacción entre las sales cúpricas con un reactivo de ácido túngstico.

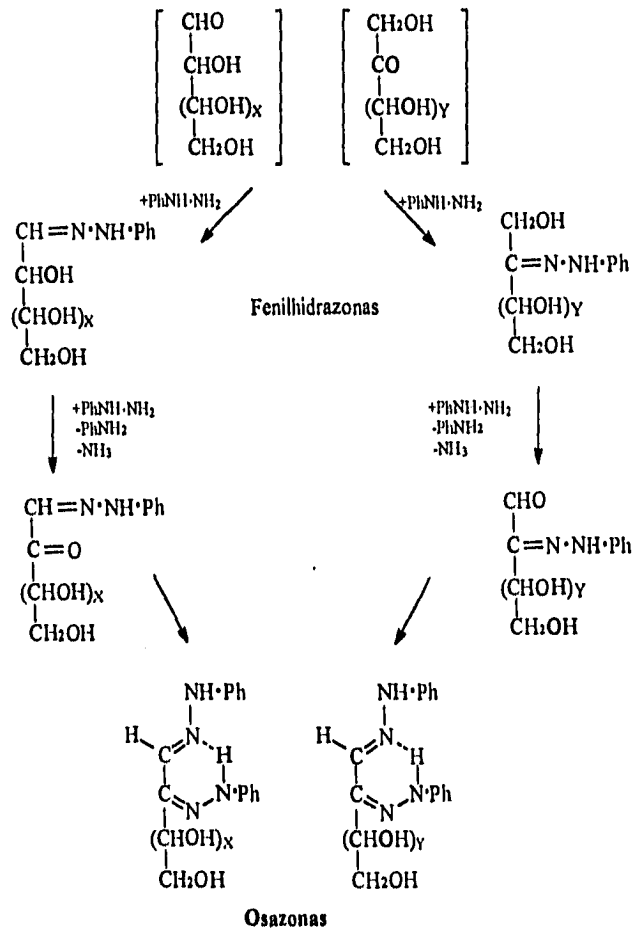
En lugar de medir el cobre reducido por una cantidad determinada de azúcar, la solución de cobre puede ser titulada directamente por la adición del azúcar a la solución de cobre hirviendo. El punto final de la titulación se distingue por la desaparición de color azul de la solución de cobre (método de Violette y Pavy), por pruebas con ferrocianuro (Soxhlet), o por el indicador interno azul de metileno (método de Lane-Eynon) (5).

Por último es importante mencionar que la reducción con sales cúpricas en solución alcalina, puede ser llevada a cabo tanto en aldosas como en cetosas (es decir, aldehídos o hidroxicetonas).

### 3.2.3 FORMACIÓN DE DERIVADOS:

Una de las pruebas cualitativas más importantes, para el análisis de azúcares, resulta ser su reacción con la fenilhidracina ( $C_6H_5NHNH_2$ ) y sus derivados; ya que además de ser una herramienta muy valiosa para la separación e identificación de azúcares, fue la manera por la cual se estudió y entendió su constitución (8).

Los carbohidratos que contienen un grupo funcional aldehído o cetona, en su estructura, reaccionan con una proporción molecular de fenilhidracina en frío, para dar lugar a las correspondientes fenilhidrazonas; éstas son usualmente solubles en agua y consecuentemente tienen poco valor para propósitos de separación e identificación; sin embargo si el carbohidrato es calentado en la presencia de un exceso de fenilhidracina (3 a 4 moles), el grupo  $\text{>CHOH}$  en una aldosa y el  $\text{-CH}_2\text{OH}$  en una cetosa, adyacentes al grupo de la fenilhidrazona, resultan ser efectivamente oxidados por una molécula de fenilhidracina al correspondiente grupo carbonilo, reaccionando entonces con otra molécula de la fenilhidracina para dar lugar a una bifenilhidracina u osazona; la anilina y el amonio son subproductos de la reacción:



**Figura 7.** Formación de osazonas.

Las osazonas, resultan ser compuestos cristalinos bien definidos, usualmente de color amarillo, que son prácticamente insolubles en agua fría.

Las formas cristalinas características de las osazonas de los azúcares más comunes, pueden ser empleadas para su identificación, al ser

examinadas al microscopio; los puntos de fusión o de descomposición, son parámetros menos satisfactorios ya que estos dependen en alto grado de la velocidad de calentamiento (9).

Algunos carbohidratos pueden ser identificados por la duración del tiempo requerido para la formación de osazonas, después de su tratamiento con la fenilhidracina bajo condiciones experimentales estándares.

Fisher descubrió que la formación de osazonas no sólo era útil para la identificación de carbohidratos, sino también para la determinación de sus configuraciones, lo que es mucho más importante. Así, por ejemplo, las dos aldohexosas diastereoisómeras (+)-glucosa y (+)-manosa dan la misma osazona, cuya formación destruye la configuración del C-2 de una aldosa, pero no afecta a la configuración del resto de la molécula.

La formación de osazonas no se limita a carbohidratos, sino que es típica de  $\alpha$ -hidroxialdehídos y -cetonas en general (2).

Es importante mencionar que una de las limitaciones más importantes de la identificación de carbohidratos a partir de la formación de sus osazonas, es el hecho de que los azúcares isoméricos dan la misma osazona; así por ejemplo los azúcares de seis carbonos D-glucosa, D-manosa y D-fructosa, dan la misma fenilosazona con punto de fusión de 206 °C (8).

### **3.2.4 OTROS MÉTODOS:**

#### **3.2.4.1 POLARIMETRÍA:**

La medición de la rotación óptica resulta ser un método muy conveniente para la identificación y análisis de muestras de azúcares o sus derivados, siempre y cuando, estos se encuentren puros (7, 71).

Rotación óptica, es el ángulo a través del cual es girado el plano vibracional de la polarización lineal de luz cuando la luz polarizada atraviesa una solución que contiene un compuesto ópticamente activo (5).

Uno de los métodos físicos mas utilizados para el análisis de carbohidratos, es la polarimetría; que puede definirse como el estudio de la rotación de la luz polarizada por sustancias transparentes. La dirección y el grado de rotación (potencia rotatoria óptica) es útil para el análisis cualitativo y cuantitativo, y para la elucidación de estructuras químicas.

La determinación polarimétrica de azúcares es rápido y no destructiva. Este método provee resultados confiables bajo las siguientes características:

1) la solución debe ser transparente (libre de color), o en su defecto ligeramente colorada, 2) la concentración del azúcar que será analizado, debe encontrarse en el rango óptimo del instrumento, y 3) la solución no debe contener otros compuestos ópticamente activos que interfieran en la determinación (74).

La rotación óptica de un compuesto puro bajo condiciones especificadas proporciona una constante física útil para fines de identificación, semejante al punto de fusión, al punto de ebullición o al índice de refracción. La actividad óptica es característica de muchas sustancias

naturales como aminoácidos, esteroides y carbohidratos; la polarimetría representa un valioso instrumento para identificar muchos compuestos; también puede ser utilizada para análisis cuantitativo y para determinar la estructura de compuestos ópticamente activos como los carbohidratos (42).

Las determinaciones polarimétricas de azúcares se llevan generalmente a cabo con un tipo de polarímetro llamado "sacarímetro", calibrado para leer directamente el porcentaje de sacarosa (11).

#### 3.2.4.2 REFRACTOMETRÍA:

Al igual que la densidad, el punto de fusión y el de ebullición, el índice de refracción es una de las constantes físicas clásicas utilizadas para describir a una especie química. Aunque no constituye una propiedad específica, pocas sustancias presentan índices de refracción iguales para una temperatura y una longitud de onda determinadas. En consecuencia ésta constante resulta ser útil para confirmar la identidad de un compuesto y valorar su pureza.

De entre las variables más comunes controlables experimentalmente que afectan a la medición de un índice de refracción, están la temperatura, la longitud de onda y la presión (42).

Los refractómetros, que pueden medir la relación de la velocidad de la luz en una celda estándar con respecto a su velocidad en la sustancia muestra, son calibrados usualmente para medir porcentajes de sacarosa, pero también han sido utilizados para medir jarabes de glucosa o soluciones de azúcar invertido. El refractómetro provee resultados razonables cuando se estima el contenido de azúcar en jarabes puros (10). Estos son

ampliamente utilizados en la industria azucarera para medir el contenido de sólidos disueltos en soluciones de azúcar.

### 3.2.5 MÉTODOS ENZIMÁTICOS:

El uso de enzimas como reactivos analíticos altamente eficientes y selectivos, ha tenido considerable atención debido a las ventajas considerables que presentan.

En los últimos 15 años se han desarrollado preparaciones enzimáticas puras, lo que ha originado el desarrollo de útiles técnicas analíticas, por ejemplo, métodos UV basados en reacciones enzimáticas de los componentes de los alimentos (en especial de azúcares individuales), electrodos con enzimas y enzimas inmovilizadas para métodos automáticos (5).

La determinación de carbohidratos por medio de procedimientos enzimáticos, se fundamenta en la acción de enzimas de la clase oxidoreductasa y en particular de las subclases oxidasas y deshidrogenasas cuyas reacciones son la oxidación y reducción con oxígeno y con NADP (Nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato), respectivamente (16).

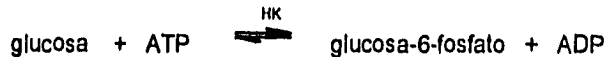
Para el análisis particular de glucosa, las determinaciones enzimáticas se basan principalmente en dos enzimas: la Glucosa oxidasa y la Glucosa 6-P-deshidrogenasa; cuyos productos de reacción pueden ser analizados espectrofotométricamente de manera directa como es el caso del NADH (Nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido), producido por la enzima



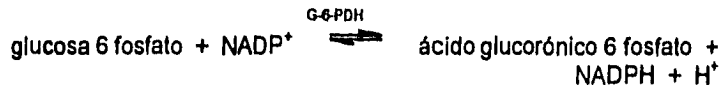
glucosa deshidrogenasa o indirectamente a partir del peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa oxidasa.

**a) Procedimiento enzimático de la hexoquinasa:**

El proceso enzimático de la hexoquinasa permite determinar de manera precisa, sensible y específica la cantidad de glucosa y fructosa que contiene una muestra, éste procedimiento se basa en la reacción de la glucosa con adenosín trifosfato (ATP) en la presencia de la enzima hexoquinasa (HK) para producir glucosa-6-Fosfato:



La adición de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) en la presencia de el trinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NADP) produce ácido glucónico-6-fosfato y una cantidad equivalente de la forma reducida (NADPH):

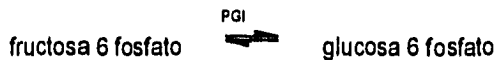


La cantidad del NADPH formado puede ser medida a partir de su absorbancia a 340 nm conociendo así la cantidad de glucosa originalmente presente.

En el caso de la fructosa la reacción es:



Esta es convertida a glucosa-6-fosfato en la presencia de la enzima fosfoglucosa Isomerasa (PGI):



Finalmente la sacarosa debe ser hidrolizada a fructosa y glucosa utilizando la enzima invertasa. (14)

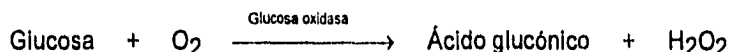
La lactosa se puede hidrolizar en presencia de  $\beta$ -galactosidasa a glucosa y galactosa. La glucosa se determina vía hexoquinasa o se determina la galactosa por oxidación de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) para dar ácido galactónico en presencia de  $\beta$ -galactosa deshidrogenasa. Se forma el NADH en concentración equivalente a la concentración de la galactosa y al contenido de lactosa en la solución de la muestra.

La maltosa se puede hidrolizar por la maltasa ( $\alpha$ -glucosidasa) a dos moléculas de glucosa las cuales se determinan vía hexoquinasa. Además de la maltosa, la  $\alpha$ -glucosidasa también hidroliza a la sacarosa, que de existir en la muestra, debe determinarse por separado vía invertasa.

El almidón es hidrolizado por la amiloglucosidasa a glucosa que se puede determinar vía hexoquinasa. (5)

**b) Determinación de D-glucosa por D-glucosa oxidasa:**

La glucosa es oxidada por la  $\beta$ -D-glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno molecular



El peróxido de hidrógeno producido ha sido determinado mediante métodos electroquímicos (17, 18, 19, 20, 21), espectrofotométricos (13, 22, 23, 24, 25) y fluorométricos (26) entre otros.

**3.2.5.1 METODOLOGÍA FIA (FLOW INJECTION ANALYSIS (por sus siglas en inglés) PARA LA DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE CARBOHIDRATOS:**

Es a partir de la importancia tan grande que han tenido los métodos enzimáticos para la determinación de carbohidratos, que se ha desarrollado y optimizado una técnica automatizada de análisis que ha tenido gran auge en los últimos tiempos, se trata de la metodología FIA que ha sido utilizada exitosamente en conjunto con sistemas enzimáticos, gracias a las bien conocidas ventajas que presenta como versatilidad, participación humana reducida, elevada velocidad de muestreo y reducida cantidad de muestras y reactivos necesarios para cada análisis, entre otras (15).

Existen reportados en la bibliografía un gran número de artículos en los que se determina la glucosa por procedimientos de flujo continuo (FIA), que involucran el uso de enzimas, en particular Glucosa oxidasa y Peroxidasa.

Las enzimas han sido ampliamente utilizadas en sistemas de flujo continuo lo cual ofrece considerables ventajas sobre otras alternativas, siendo una de las más significativas la reducción en el consumo de las enzimas, por diferentes procedimientos: introduciendo el catalizador disuelto mediante inyección, inmovilizando la enzima en un soporte adecuado, lo que da lugar a un reactor empacado y por inmovilización de la enzima en la zona de detección (sensores bioquímicos). De éstas tres, la alternativa más frecuente en sistemas de flujo continuo, resulta ser la inmovilización y empacado de la enzima en reactores (27).

Es importante mencionar que en la mayoría de los artículos revisados (17, 18, 19, 20, 21, 23, 24), se lleva a cabo la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa, lo cual ofrece claras ventajas como mayor sensibilidad, selectividad y estabilidad del método; además de la reducción del manejo manual, el aumento de reproducibilidad y la posibilidad de reutilizar la enzima (22).

### **3.2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS:**

La introducción de las técnicas cromatográficas en el área de los carbohidratos, ha hecho posible el uso de nuevas herramientas poderosas, para separar e identificar los compuestos en las mezclas de azúcares. Se reconocen distintos tipos de técnicas cromatográficas para el análisis de carbohidratos, de entre las cuales se reconocen como las más importantes la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía capilar de electroforesis por zonas (CZE).

El desarrollo de metodologías analíticas para el análisis de carbohidratos por HPLC, ha sido motivo de estudio de muchos investigadores (28, 29). Los carbohidratos son compuestos particularmente difíciles de detectar debido a que no presentan absorciones significativas en longitudes de onda por encima de los 210 nm por lo que no pueden ser detectados por detectores utilizados en HPLC, como absorción UV-VIS y fluorescencia (29). Por lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos de detección electroquímica que permiten el análisis de carbohidratos de manera sensible y eficaz (28, 29, 30, 31).

Otra de las técnicas cromatográficas ampliamente utilizada en el área de los carbohidratos es la cromatografía de Gas-Líquido (CGL), (33, 34, 35).

La separación rápida y eficiente así como la obtención precisa de medidas cuantitativas, hacen de la CGL una metodología muy adecuada para la identificación y cuantificación de azúcares en muy diversas muestras (33). Sin embargo, es necesario mencionar una de las mayores dificultades para la aplicación de esta técnica en el área de carbohidratos trata de la necesidad de transformar estos compuestos en derivados que sean volátiles para poder ser analizados por CG, por esto se han desarrollado muy diversas técnicas de derivatización química, de entre las que se encuentran los acetatos de alditol (33, 36, 37) y los derivados siliados (TMS ó Trimetilsilil derivados) (35); además de las anteriores existen numerosas alternativas para la derivatización de carbohidratos como son los acetatos de aldonitrilos, los acetatos de metiloxima y los trifluoroacetatos entre otros (37).

La cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas (CG-EM), resulta ser una técnica ampliamente utilizada de manera exitosa en el área de los carbohidratos (36, 37, 38).

Otra de las técnicas de separación ampliamente desarrolladas en el área de los carbohidratos en los últimos años, se trata de la Electroforesis Capilar de Zona (CZE) (30, 31, 32); ésta es una nueva metodología que se fundamenta en la separación de compuestos iónicos basándose en sus velocidades de migración diferenciales en un campo eléctrico (32).

La electroforesis capilar es una herramienta muy poderosa para la separación de una gran variedad de compuestos biológicos; de entre sus principales cualidades, se encuentran su capacidad para analizar volúmenes de muestra extremadamente pequeños y la elevada eficiencia de separación que puede ser obtenida (30).

### **3.3 DISCUSIÓN SOBRE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA (UV-VIS) EN LA QUE SE BASA EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PRESENTE TRABAJO:**

Por ser ésta la técnica instrumental que se utilizó para el presente trabajo, a continuación se presenta una breve descripción de ésta:

#### **3.3.1 PRINCIPIOS:**

Esta técnica está basada en la absorción de la energía electromagnética (radiación electromagnética), en las regiones del espectro electromagnético ultravioleta cercano, y visible, lo cual produce cambios en la estructura electrónica de iones y moléculas. (39)

La luz visible es una pequeña parte del espectro electromagnético, la cual puede ser detectable por el ojo humano; es por esto que fue la primera región del espectro electromagnético, utilizada para el análisis químico.(40)

El espectro electromagnético comprende una inmensa gama de longitudes de onda o energías desde las radiaciones de alta energía como los rayos cósmicos, pasando por los rayos X, ultravioleta, visible e Infrarrojo, hasta las ondas de radio de baja energía.

La región visible del espectro corresponde al intervalo de longitudes de onda comprendido entre 380-800 nm. La región ultravioleta se subdivide en dos zonas espectrales: el UV lejano o de vacío situado por debajo de los 190 nm y el UV cercano que comprende el intervalo de 190-380 nm.

La energía y la longitud de onda están relacionadas por las siguientes ecuaciones:

$$E = h \nu$$

Donde: E = energía  
h = Constante de Planck  
 $\nu$  = Frecuencia

y

$$\nu = c / \lambda$$

Donde: c = Velocidad de la luz  
 $\lambda$  = Longitud de onda

De aquí podemos observar que las radiaciones de menor  $\lambda$  contienen más energía que aquellas con mayor  $\lambda$ .

Las  $\lambda$ 's en la región UV-VIS son usualmente medidas en unidades de  $10^{-9}$  m (nanómetros, nm).

La absorción UV-VIS llevada a cabo por átomos y moléculas provoca una serie de transiciones electrónicas entre los diferentes niveles de

energía. Los niveles de energía electrónicos de una molécula, en condiciones normales, se denominan estado fundamental, y los niveles electrónicos más altos representan los estados excitados primero, segundo, etc. En cada nivel electrónico existe un estado vibratorio fundamental y varios excitados, y de forma análoga en cada nivel vibracional existe un nivel rotatorio fundamental y varios excitados. (fig 8).

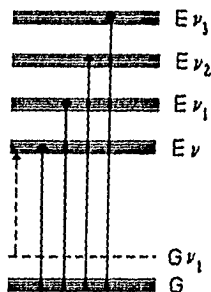
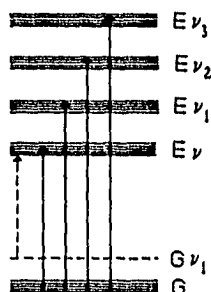


Figura 8. Representación gráfica de los niveles de energía de una molécula poliatómica y explicación del origen de las líneas de absorción. G representa el estado electrónico fundamental; E es el estado electrónico excitado y  $\nu_1, \nu_2$  y  $\nu_3$  son los diferentes estados vibratorios. Las líneas de menor espacio representan los niveles rotatorios.

Si una molécula absorbe un fotón de energía de una fuente que irradia en la región de microondas, sólo cambia su energía de rotación. Si la fuente de radiación es de mayor energía, por ejemplo en la región infrarroja, entonces cambiarán las energías vibratoria y rotatoria de la molécula. Si la energía de la radiación es aún mayor, como en el caso de la luz ultravioleta, tendrán lugar cambios en la energía electrónica, vibratoria y rotatoria de la molécula. Dicho espectro resultante (ver fig. 9), se caracteriza por ser una



energía. Los niveles de energía electrónicos de una molécula, en condiciones normales, se denominan estado fundamental, y los niveles electrónicos más altos representan los estados excitados primero, segundo, etc. En cada nivel electrónico existe un estado vibratorio fundamental y varios excitados, y de forma análoga en cada nivel vibracional existe un nivel rotatorio fundamental y varios excitados. (fig 8).



**Figura 8.** Representación gráfica de los niveles de energía de una molécula poliatómica y explicación del origen de las líneas de absorción. G representa el estado electrónico fundamental; E es el estado electrónico excitado y  $\nu_1, \nu_2$  y  $\nu_3$  son los diferentes estados vibratorios. Las líneas de menor espacio representan los niveles rotatorios.

Si una molécula absorbe un fotón de energía de una fuente que irradia en la región de microondas, sólo cambia su energía de rotación. Si la fuente de radiación es de mayor energía, por ejemplo en la región infrarroja, entonces cambiarán las energías vibratoria y rotatoria de la molécula. Si la energía de la radiación es aún mayor, como en el caso de la luz ultravioleta, tendrán lugar cambios en la energía electrónica, vibratoria y rotatoria de la molécula. Dicho espectro resultante (ver fig. 9), se caracteriza por ser una

banda ancha de absorción continua. El tipo de enlace que se forma es el enlace  
que rodea a la molécula (disolución), formando una banda de absorción continua  
la banda de absorción. El resultado es que la molécula absorbe la luz de forma  
continua para todas las longitudes de onda, por lo que se produce una absorción  
de espectro continuo.

*Handwritten text*

1

*[Extensive handwritten notes, mostly illegible due to blurring and fading]*

banda ancha de absorción continua. Otros factores como el medio químico que rodea a la molécula (disolvente), pueden afectar la ubicación y forma de la banda de absorción. El resultado es que la espectroscopía UV-VIS posee relativamente poca información cualitativa, en comparación por ejemplo con la espectroscopía infrarroja.

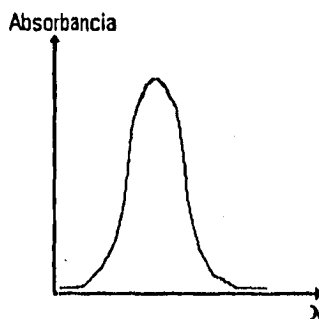


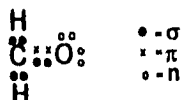
Figura 9. Espectro de absorción de característico, generado por la excitación tanto de los niveles energéticos como de los rotatorios y vibracionales.

Las especies químicas orgánicas que absorben la radiación ultravioleta o visible, pueden contener de manera general electrones  $\pi$ ,  $\sigma$  y/o  $n$  (orbitales moleculares); dichas especies comprenden moléculas e iones orgánicos.

Todos los compuestos orgánicos pueden absorber radiación electromagnética porque todos contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía más altos. Las energías de excitación asociadas con los electrones que forman la mayoría de los enlaces sencillos son altas; por tanto, la absorción por éste tipo de electrón se limita a la región llamada ultravioleta en el vacío ( $\lambda < 190$  nm), donde los componentes

de la atmósfera absorben también fuertemente. La absorción de radiación ultravioleta y visible de longitud de onda más larga se restringe a un número limitado de grupos funcionales llamados  *cromóforos*, que contienen electrones de valencia con energías de excitación relativamente bajas.

Los electrones que contribuyen a las características de absorción de una molécula orgánica son: 1) los que participan directamente en la formación de enlaces entre átomos y se asocian así con más de un átomo (electrones  $\sigma$  y  $\pi$ ); 2) electrones exteriores no enlazados o no compartidos, situados principalmente en átomos como oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno (electrones  $n$ ). En la figura 10, se muestra un ejemplo en el que pueden verse los tres tipos de electrones en una molécula orgánica simple.



**Figura 10.** Diferentes tipos de orbitales moleculares en la molécula del formaldehído.

Como se representa en la figura 11, las energías de los distintos tipos de orbitales moleculares difieren considerablemente.

Pueden obtenerse transiciones electrónicas entre ciertos niveles de energía por absorción de radiación. Como indica la figura 11, las transiciones comúnmente encontradas son cuatro tipos:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ .(42)

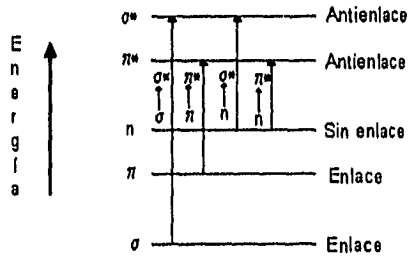
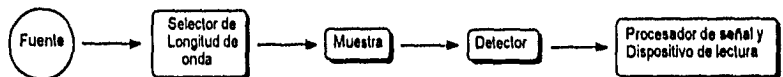


Figura 11. Niveles electrónicos de energía molecular.

### 3.3.2 INSTRUMENTACIÓN: (42)

Las partes fundamentales que constituyen básicamente los instrumentos para la medición de absorción en la región UV-VIS, son:



- **Fuente:** la mayoría de los espectrofotómetros registran la región visible como la ultravioleta, por lo que requieren de dos fuentes de radiación: una lámpara de hidrógeno o deuterio que genera radiación en la región de 200-370 nm y una lámpara de filamento de tungsteno que genera radiación en la región de 325-750 nm (42).

- **Selector de longitud de onda:** que puede ser un filtro (de absorción o de Interferencia) o un monocromador (de prisma o de rejilla). La función del selector de  $\lambda$ , es la dispersión de la radiación policromática en bandas que abarquen un intervalo de valores de longitud de onda restringido. La forma más común de producir estas bandas es por medio de un dispositivo llamado *monocromador*.

Todos los monocromadores poseen una ranura de entrada, una lente o espejo colimador para producir un haz de radiación paralela, un prisma o red de difracción como el elemento dispersor, y un elemento de enfoque que proyecte una serie de imágenes rectangulares de la ranura de entrada sobre la superficie plana (el plano focal).

Se utilizan también como ya se mencionó, filtros de absorción o de interferencia para la selección de la  $\lambda$ . Los primeros sirven solo para la región visible del espectro; en cambio existen filtros de Interferencia para las radiaciones infrarroja, visible y ultravioleta.

- **Recipientes para la muestra:** las celdas o cubetas que contienen a las muestras deben ser construidas de un material que permita el pasaje de la radiación de la región espectral que interesa. De ésta forma es necesario utilizar cuarzo o sílice fundida para el trabajo en la región ultravioleta; ambas sustancias son transparentes en la región visible.
- **Detección de la radiación:** un detector mide la cantidad de energía que fue absorbida por la muestra. Se emplea un tipo general de transductor de radiación que responde a los fotones, basado en la interacción de la radiación con una superficie reactiva que produce electrones

(fotoemisión) o promueve electrones a estados energéticos en los que pueden conducir la electricidad (fotoconducción).

Existen diferentes tipos de detectores de fotones que comprenden: 1) *Células fotovoltaicas*, en las cuales la energía radiante genera una corriente en la interfase entre una capa semiconductor y un metal; 2) *Fototubos*, en los que la radiación produce emisión de electrones a partir de una superficie sólida fotosensible, 3) *Tubos fotomultiplicadores*, que contienen una superficie fotoemisora así como varias superficies adicionales que emiten electrones en cascada cuando son alcanzadas por los electrones de la región fotosensible; 4) *Detectores semiconductores*, en los que la absorción de la radiación produce electrones y agujeros que dan lugar a un aumento en la conductividad, y 5) *Diodos de silicio*, en los que los fotones aumentan la conductancia a través de una unión pn de polaridad invertida.

- **Procesadores de señales:** el procesador de señal es, por lo general, un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica generada por un detector, puede además modificar la señal filtrándola para quitarle componentes indeseables, y ,mas aún puede realizar operaciones matemáticas sobre la señal, tales como la diferenciación, integración o conversión logarítmica.

Además del diseño anteriormente presentado, existe otro tipo de arreglo denominado espectrofotómetro de arreglo de diodos, en el cual, la luz policromática de la fuente pasa a través de la muestra y es enfocado a la apertura de entrada del policromador. El policromador dispersa la luz sobre

el arreglo de diodos; cada diodo se encarga de medir una banda estrecha del espectro. Las posiciones relativas de la muestra y el elemento dispersivo, en un espectrofotómetro de arreglo de diodos están invertidas en relación con el instrumento original.

Las principales ventajas que presenta un espectrofotómetro de arreglo de diodos son: a) rapidez, debida a la adquisición paralela de datos y el escaneado electrónico, b) excelente reproducibilidad de  $\lambda$ , c) alta confiabilidad (40).

Es importante mencionar que ambos tipos de arreglos de espectrofotómetros: el de diodos y el convencional, pueden ser igualmente confiables.

### 3.3.3 APLICACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ABSORCIÓN AL ANÁLISIS CUANTITATIVO:

La espectroscopía de absorción es uno de los medios mas útiles para llevar a cabo análisis cuantitativo, el cual se basa en la relación conocida comúnmente como Ley de Lambert y Beer, la cual indica que la absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie que produce la absorción, es decir:

$$A = \epsilon bc$$

Donde:

$\epsilon$  = constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absorptividad molar ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



**b = trayectoria a través de la celda (cm)**

**c = concentración (mol/L)**

### **3.3.4 DESVIACIONES DE LA LEY DE LAMBERT Y BEER:**

Debe remarcarse el hecho de que la ley de Beer deja de ser válida por razones instrumentales, químicas y físicas, por lo cual no se puede generalizar que la concentración sea siempre directamente proporcional a la absorbancia, especialmente cuando se manejan altas concentraciones y/o absorbancias.

Algunas de las causas químicas de la desviación de la ley de Lambert y Beer son, el efecto del pH sobre el compuesto, interacción química con el disolvente, descomposición y la presencia de impurezas; entre las causas físicas de desviación están los puentes de hidrógeno con el disolvente, la solvatación, la interacción molécula-molécula en altas concentraciones, la temperatura, la fluorescencia y la dispersión.

El resultado es que la ley de Lambert y Beer no puede ser utilizada sin realizar un examen previo. En el desarrollo de una metodología analítica debe realizarse un estudio del ajuste a la ley de Lambert y Beer del compuesto estándar en el intervalo de concentraciones esperado para el análisis. Si no se obtiene una relación lineal adecuada, se pueden variar algunas condiciones experimentales como la  $\lambda$  de estudio, con la finalidad de mejorar dicha relación o también se puede utilizar una curva de calibración no lineal. Deben estudiarse los efectos del pH y la temperatura y si es que existen deben minimizarse con el uso de buffers o celdas

termostatadas respectivamente. Finalmente debe ser examinado el efecto por impurezas o por productos de descomposición(40).

La ley de Lambert y Beer describe de manera adecuada, solo la absorción de las soluciones diluidas; en este sentido, es una ley límite. En altas concentraciones (generalmente  $> 0.01$  M), la distancia media entre las especies que causan absorción disminuye hasta el punto en que cada una afecta a la distribución de carga de sus vecinas. Esta interacción a su vez, puede alterar su capacidad para absorber una longitud de onda de radiación dada. Puesto que el grado de interacción depende de la concentración, esto causa desviaciones de la relación lineal entre absorbancia y concentración. A veces se encuentra un efecto similar en sustancias que contienen bajas concentraciones de soluciones absorbentes en presencia de altas concentraciones de otras especies, en especial, electrolitos. La gran proximidad de los iones y las moléculas capaces de absorber, altera el coeficiente de absorptividad molar de éstas por efecto de las interacciones electrostáticas; éste efecto se atenúa por dilución.

Por lo general, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo a concentraciones por debajo de  $0.01$  M, aunque se encuentran algunas excepciones entre ciertos iones o moléculas de gran tamaño.

Algunas desviaciones de la ley de Lambert y Beer, se producen debido a que el  $\epsilon$  depende del índice de refracción  $n$  de la solución. Así, si los cambios de concentración causan alteraciones importantes en el índice de refracción de la solución, se observan desviaciones de la ley de Lambert y Beer.

Otras desviaciones evidentes de la ley de Lambert y Beer se encuentran frecuentemente como consecuencia de asociación, disociación o reacción de la sustancia absorbente con el disolvente (42).

### **3.4 ANÁLISIS DE LOS ARTÍCULOS REVISADOS REFERENTES AL MÉTODO DEL DNS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS:**

Al realizar el análisis de la revisión bibliográfica obtenida para el método de determinación de azúcares reductores por reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se encontró que en su fundamento existían muchas interrogantes que no se habían considerado. Se realizó una revisión bibliográfica desde la fecha en que el método fue propuesto (1921), hasta la actualidad, con la finalidad de conocer, si es que existía, la justificación del uso de cada uno de los reactivos para así evaluar si el planteamiento del método era el adecuado.

A continuación se presenta el análisis de los artículos revisados:

El método para determinar azúcares reductores por su reacción con el DNS fue propuesto por Sumner en 1921 (43), quien reporta haber encontrado un reactivo capaz de ser reducido en presencia de glucosa para formar un compuesto nitroamino altamente colorido. En primera instancia, resulta importante mencionar que el método se plantea para determinar cualitativa y cuantitativamente azúcares reductores en orina tanto diabética como normal, ya que esto implica tomar en cuenta ciertos aspectos de la muestra que pudieran provocar interferencias en la determinación. Sumner plantea un problema para el análisis de azúcares reductores en orina: el

reactivo (DNS en presencia de carbonato de sodio), se reduce no solamente por los azúcares reductores presentes en la muestra sino también por otros constituyentes de la orina como el ácido úrico y el polifenol, por lo que encuentra necesario eliminar dichos compuestos, calentando la orina en presencia de una solución de NaOH al 3 %. Con éste tratamiento destruí a los azúcares presentes en la muestra, más no al polifenol o ácido úrico. Posteriormente añadía una cantidad conocida de glucosa a la muestra y realizaba la determinación de manera normal. Cualquier valor de reducción que excediera la cantidad de glucosa adicionada, era debida a sustancias reductoras que no eran azúcares reductores. El valor reductor de éstas sustancias era sustraído del valor total de reductores en orina con lo cual se obtenía por diferencia el valor de azúcares presentes en la muestra.

El procedimiento anterior era aplicado únicamente en el caso de orina normal, ya que al ser su contenido de azúcares mucho más bajo en comparación con la orina diabética, la interferencia por otros constituyentes de la orina (como ácido úrico y polifenol), se debe considerar.

El reactivo consta de dos disoluciones, que se preparan de manera independiente, la primera de ellas es una solución de dinitrosalicilato de sodio que se prepara con DNS (2 g en 70 mL de agua caliente) y carbonato de sodio (10 mL de disolución al 20 % [w/v]), aforando a 100 mL. La segunda es una disolución de NaOH al 1.5 % que proporciona el medio alcalino necesario para llevar a cabo la determinación, (en el caso de que se requiera darle un tratamiento previo a la muestra, se prepara una tercera disolución de NaOH al 3 % cuya función es la eliminación de posibles interferencias en la determinación "polifenoles, ácido úrico, etc.").

### OBSERVACIONES:

- Sumner introduce el método para determinar azúcares reductores en orina tanto diabética como normal, lo anterior no es tomado en cuenta por otros investigadores que aplican el método para otras muestras sin tomar en cuenta la matriz particular de cada una de ellas.
- Sumner asegura que la muestra de orina contiene de manera normal compuestos reductores diferentes a la glucosa capaces de reaccionar con el DNS; en particular menciona dos: ácido úrico y polifenol; acerca de lo anterior, es importante mencionar que según la bibliografía consultada (68, 69, 70, 71), la composición de la orina en condiciones normales carece de compuestos fenólicos como se puede observar en la Tabla 3. De los compuestos citados, aquellos que pueden considerarse con capacidad reductora son el ácido úrico, creatinina y el aminoácido cisteína (ver fig. 13); sin embargo pudiera ser que en la orina se pudieran encontrar compuestos fenólicos provenientes del metabolismo de algunos compuestos ingeridos bajo circunstancias especiales como es el caso del pesticida organofosforado paratión, cuyo metabolito fenólico es el metil paratión (72, 73), que puede encontrarse presente en la orina, pero en éste caso ya no se podría decir que se trata de orina normal.

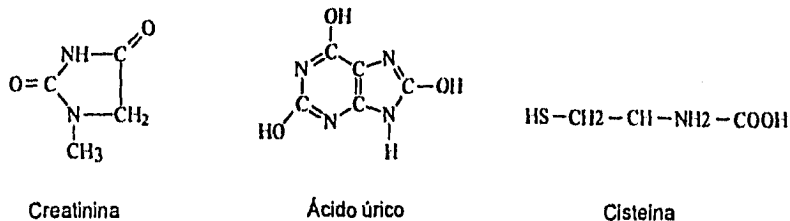


Figura 13. Estructuras de los principales compuestos con capacidad reductora en la orina.

Componente	Gramos	Relación Orina / Plasma
Glucosa	< 0.02	< 0.02
Aminoácidos	0.5	1.0
Amoniaco	0.8	100
Urea	25	70
Creatinina	1.5	70
Ácido úrico	0.7	20
H <sup>+</sup>	pH 5-8	Hasta 300
Na <sup>+</sup>	3.0	1.0
K <sup>+</sup>	1.7	15
Ca <sup>2+</sup>	0.2	5
Mg <sup>2+</sup>	0.15	2
Cl <sup>-</sup>	6.3	1.5
Fosfato	1.2 (de P)	25
Sulfato	1.4 (de S)	50
Bicarbonato	0-3	0-2

**Tabla 3.** Componentes principales de la orina humana. el volumen y la composición de la orina varían ampliamente según cuales sean el líquido ingerido y la dieta; estos datos se refieren a una muestra de 24 horas, con un volumen total de 1200 mL (69).

- Es importante mencionar que el DNS que utilizaban como reactivo era obtenido en el mismo laboratorio a partir de ácido salicílico y una mezcla de ácidos sulfúrico y clorhídrico concentrados, por lo que pudieron existir interferencias debido al mismo reactivo que no son consideradas.
- La medición del compuesto colorido, era llevada a cabo en un colorímetro, comparando las muestras con un estándar de glucosa (1 mg de glucosa más 1 mL de disolución de DNS más 2 mL de disolución de NaOH al 1.5 %; calentar durante 5 minutos a ebullición en tubos de ensaye perfectamente tapados con algodón y diluir a 25 mL). Las mediciones en el colorímetro eran llevadas a cabo en tubos de ensaye de 1.5 x 15 cm.

- Se utiliza carbonato de sodio para disolver al DNS y aparte se prepara una disolución de NaOH (1.5 %) para proporcionar el medio alcalino necesario para la determinación.

Sumner, en su segundo artículo publicado en el año de 1924 (44), propone algunas modificaciones importantes a su método, con la finalidad de mejorar la confiabilidad. La primera de ellas, es la adición de grandes cantidades de Sal de Rochelle (tartrato doble de sodio y potasio); con respecto a dicha modificación, Sumner menciona que uno de los principales errores en los métodos que se basan en la titulación de cobre, es la reoxidación del óxido de cobre formado, por la acción del oxígeno atmosférico, sin embargo, dice que en el caso del DNS, mientras que el oxígeno disuelto en la solución es incapaz de reoxidar al producto de reducción, en un medio alcalino actúa sobre el azúcar reductor degradándolo, con lo que se afecta de manera importante la determinación. Sumner encuentra que adicionando Sal de Rochelle en concentración de 30 %, se previene dicha acción destructiva, además de que se incrementa la cantidad de color dada por pequeñas concentraciones de glucosa.

Una segunda modificación propuesta por Sumner en éste artículo, es la combinación del álcali, el DNS y la Sal de Rochelle en un solo reactivo con lo que según el autor, el reactivo podría conservarse indefinidamente. Para llevar a cabo la determinación, se adicionan en tubos de ensaye de 25 mL con tapas que evitaren el intercambio con el medio ambiente, 3 mL de reactivo con 1 mL de orina, se calienta en baño de agua en ebullición durante 5 minutos, se enfría aproximadamente 3 minutos con agua corriente,

se diluye a 25 mL con agua destilada. Se toman las lecturas en colorímetro (tubos de 20 mm de espesor), contra un estándar permanente, preparado con 345 mg de alumbre de hierro más 1 g de DNS, llevado a aforo de 1 lt con agua destilada. Esta disolución era considerada equivalente a 1 mg de glucosa con el mismo tratamiento de la muestra.

#### OBSERVACIONES:

- Sumner introduce un nuevo componente al reactivo, se trata de la sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio), en una concentración de 30 % w/v, asegurando que en su presencia, la cantidad de color dada por pequeñas concentraciones de glucosa (<1 mg), se incrementa considerablemente (65 %), además asegura que éste compuesto en tal concentración, satura la disolución del reactivo con lo que al desplazar al oxígeno disuelto en la disolución, se previene su acción destructiva sobre la glucosa en medio alcalino.
- Es importante recalcar que las mediciones eran llevadas a cabo en un colorímetro (tubos de 20 mm de espesor), contra estándares permanentes de alumbre férrico con DNS. Esto indica que las mediciones que obtenían no pueden ser consideradas muy confiables.
- En cuanto a la preparación del reactivo\*, Sumner en éste artículo excluye ambas disoluciones de NaOH (1.5 % y 3 %) y no da una explicación química de lo anterior.
- \* Preparación del reactivo: A 300 mL de una disolución de carbonato de sodio al 4.5 %, adicionar 800 mL de una disolución de DNS al 1 % y 225 g de sal de Rochelle; mezclar hasta disolver y dejar tapado.



En el tercer artículo publicado por Sumner en 1925 (45), se propone una nueva modificación al método, al introducir dos compuestos más en la reacción: Fenol y Bisulfito de sodio, lo cual se justifica afirmando que el fenol a pesar de no tener efecto reductor en el ácido 3,5-dinitrosalicílico, incrementa en gran medida la cantidad de color dada por la glucosa; Sumner menciona que cuando existe un exceso de fenol en el reactivo, la cantidad de color dada por 1 mg de glucosa se incrementa al 300 %.

En cuanto al bisulfito de sodio, Sumner justifica su adición, afirmando que el color producido durante el calentamiento de la glucosa en presencia del reactivo que contiene fenol, resulta ser inestable y presenta cambios significativos al ponerse en contacto con el aire, sin embargo al adicionar pequeñas cantidades de este compuesto el cambio en el color se evitaba. Afirma además que el bisulfito de sodio ayuda a prevenir la destrucción del azúcar por el álcali.

#### OBSERVACIONES:

- Sumner adiciona dos compuestos más a la reacción: Fenol y Bisulfito de sodio, argumentando que ambos compuestos dan beneficios importantes a la reacción (el fenol incrementa la intensidad del compuesto formado por la reducción del DNS en presencia de glucosa, mientras que el bisulfito de sodio estabiliza el color de dicho compuesto); sin embargo no da una explicación química que justifique lo anterior; además es importante mencionar que en su primer artículo publicado (43), Sumner recalca la importancia de eliminar de la orina los compuestos fenólicos que pudieran interferir con la reacción de la glucosa con el DNS, mientras que en el presente artículo adiciona el fenol como parte del reactivo sin mencionar nada de lo que trató en dicho primer artículo.

- La medición del compuesto colorido formado, se lleva a cabo de la misma forma que en sus dos artículos anteriores, es decir con un colorímetro, pero ahora realizando la comparación contra estándares de glucosa (1.0, 0.5 y 0.25 mg de glucosa).
- Para la preparación del reactivo, Sumner en este tercer artículo, incluye nuevamente el hidróxido de sodio y elimina el carbonato de sodio, sin dar explicación.
- Esta forma de llevar a cabo la determinación de azúcares reductores en orina, presentada por Sumner en 1925, es la que hasta ahora se aplica. Desde entonces, no se han realizado modificaciones importantes al método, el cual ha sido utilizado de manera habitual para determinar azúcares reductores no sólo en orina que es para lo que Sumner optimizó el método, sino también en muy diversas muestras como alimentos, preparaciones enzimáticas, etc. En estos últimos casos la aplicación del método fue directa sin realizar un análisis serio del mismo.

En relación a la preparación del reactivo y a la forma de realizar la determinación, existen una serie de publicaciones posteriores a el último artículo publicado por Sumner en 1925, que hacen referencia de varios aspectos importantes de considerar y que a continuación se mencionan.

En cuanto a la Sal de Rochelle, Sumner en su segundo artículo publicado en 1924 (44), justifica su adición como parte esencial del reactivo en concentración tan elevada (30 %) mencionando que al desplazar el oxígeno disuelto en la solución, se previene su acción destructiva sobre los

azúcares reductores en medio alcalino; lo anterior se vuelve a tratar en un artículo posterior publicado por el mismo Sumner en conjunto con E. B. Sisler en el año de 1944 (46), en ésta ocasión presentan la determinación de azúcares en sangre por su reacción con el DNS y dicen que el reactivo propuesto en 1925 (45), no puede ser utilizado directamente en muestras de sangre ya que se oxida una cantidad apreciable de glucosa por acción del oxígeno disuelto en el filtrado de sangre; además mencionan que una parte importante de glucosa se carameliza por el álcali del reactivo antes de la reacción de reducción; esto lo concluyeron al realizar el experimento burbujeando nitrógeno en la disolución para remover así el oxígeno disuelto.

El procedimiento que proponen para llevar a acabo la reacción, consiste en colocar 2 mL del filtrado de sangre en una cápsula de porcelana y llevarlo a sequedad; adicionar 1 mL del reactivo e incorporarlo al material residual, cubrir el vidrio de reloj y calentar durante 5 minutos. Diluir el material de la cápsula hasta 25 mL en un matraz aforado y tomar la lectura en un colorímetro fotoeléctrico, utilizando un filtro verde; realizar una curva patrón con diferentes concentraciones de glucosa (0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.04, 0.50 y 0.60 mg glucosa) tomando como blanco DNS con el mismo tratamiento que la muestra.

Mencionan que la principal razón para justificar la efectividad de este procedimiento es que la disolución de DNS, (que debido a la elevada cantidad de Sal de Rochelle, contiene muy poco oxígeno disuelto), es el único reactivo empleado y por ello no resulta ser diluido al adicionarle la muestra (que previamente ha sido evaporada); en consecuencia, afirman que la concentración del dinitrosalicilato es lo suficientemente elevada para oxidar a la glucosa antes de que pueda ser caramelizada.

2022/10/10

In the world of today, it is difficult to find a job that is both interesting and challenging. Many people are looking for a job that is not only a source of income but also a source of personal growth and development.

The first step in finding a job is to identify your own strengths and weaknesses. This will help you to determine what kind of job you are best suited for. It is also important to research the job market and to identify the companies that are looking for people with your skills and experience.

Once you have identified your strengths and weaknesses and researched the job market, you can begin to apply for jobs. It is important to tailor your resume and cover letter to each job you apply for.

When you are interviewing for a job, it is important to be prepared. You should research the company and the job, and you should be able to answer questions about your skills and experience. It is also important to ask questions of the interviewer, as this will show that you are interested in the job and the company.

#### **OBSERVACIONES:**

- En este artículo se remarca la importancia de adicionar sal de Rochelle al reactivo para desplazar al oxígeno presente en la solución y evitar así su acción oxidante sobre la glucosa en presencia del álcali.
- Se aplica el mismo método en muestras de sangre sin considerar los efectos que pudiera tener la matriz de la muestra sobre la reacción de reducción; el único cambio que realizan al procedimiento es el llevar a sequedad la muestra con la finalidad de eliminar el oxígeno presente para evitar que pueda haber pérdida del efecto reductor de la glucosa; sin embargo, no realizan un análisis adecuado de los posibles efectos que puede tener el calentamiento sobre los constituyentes de la propia muestra.
- Las mediciones del compuesto colorido, son obtenidas en un colorímetro fotoeléctrico de marca Fisher con filtro verde.

En 1954 (47), Bottle y Gilbert publican un artículo en el que apoyan la afirmación de Sumner que se refería a la prevención de la acción destructiva del oxígeno sobre los azúcares reductores, ellos aplican la determinación de azúcares reductores en muestras de almidón de papa con la finalidad de determinar su peso molecular, afirmando que para llevar a cabo la determinación resulta esencial remover el oxígeno disuelto en la solución ya que éste compete con el reactivo y disminuye la sensibilidad por lo cual proponen su eliminación total por medio de una corriente de nitrógeno, antes del calentamiento con la glucosa.

#### **OBSERVACIONES:**

- En este artículo es importante remarcar que se utilizó una muestra diferente (almidón de papa) a la que Sumner utilizó (orina), sin estudiar los efectos que pudiera tener la matriz de dicha muestra, sobre la reacción de reducción.

Posteriormente en 1958 (48), Bottle y Gilbert en otro estudio realizado, afirman que la remoción del oxígeno produce un incremento significativo en la sensibilidad y linealidad de la gráfica de absorbancia contra concentración de azúcar bajo las condiciones de temperatura y alcalinidad normalmente utilizadas, a bajas concentraciones de glucosa. En este artículo, nuevamente afirman que el álcali y el oxígeno compiten con el ion 3,5-dinitrosalicilato, mientras que la glucosa pierde su poder reductor al ser calentada por algunos minutos en una solución que contenga álcali en presencia de aire, por lo que al adicionar sal de Rochelle al 30 % (w/v) se reduce la concentración de oxígeno en la solución antes del calentamiento. Estos autores apoyan dicha afirmación basados también en el trabajo realizado por Benedict en 1907 (49), quien previamente a Sumner realiza estudios del efecto del álcali sobre los azúcares reductores y asegura que el álcali ejerce sobre la glucosa cierta acción destructiva que puede ser disminuida al sustituir el hidróxido de amonio por hidróxido de sodio o de potasio y manteniendo la temperatura abajo del punto de ebullición durante la reacción.

#### OBSERVACIONES:

- Apoyan la afirmación dada por Sumner en su segundo artículo, mencionando que la remoción del aire presente en la muestra aumenta la sensibilidad y linealidad del método; por lo cual apoyan la adición de sal de Rochelle en tal concentración (30 % [w/v]) para reducir la concentración de oxígeno en la solución.
- Para afirmar lo anterior, se basan no solamente en las suposiciones dadas por Sumner, sino también en un estudio realizado por Benedict en el año de 1907, lo que no resulta muy confiable debido a la época en que se realizó dicho estudio.
- Las absorbancias de las soluciones fueron llevadas a cabo en celdas de 4 cm con un absorclómetro Spekker a una  $\lambda$  de 520 nm.

De entre toda la bibliografía revisada, existe únicamente un artículo publicado en 1959 por Miller (50), en el que se expone una crítica al método propuesto por Sumner, cuestionando la verdadera utilidad de algunos de los componentes que forman parte importante del reactivo original y en la cual afirma que uno de los principales defectos del método es la pérdida de parte del azúcar reductor que es analizada. Miller afirma que la Sal de Rochelle, normalmente presente en el reactivo del DNS para la determinación de azúcares reductores, interfiere con la acción protectora del bisulfito sin embargo es esencial para la estabilidad del color, con esto, se refiere al hecho de que el componente responsable de la remoción del oxígeno disuelto en las soluciones acuosas es el sulfito y no la sal de Rochelle como Sumner suponía; Miller dice que la sal de Rochelle resulta ser un factor de

interferencia para la acción del bisulfito, sin embargo encuentra que en su ausencia, el color obtenido con el reactivo modificado era inestable. Por lo anterior, propone la eliminación de la Sal de Rochelle como parte integral del reactivo y menciona que debe ser adicionada a la mezcla de reacción (azúcar reductor y reactivo), después de que ha sido desarrollado el color y previamente al enfriamiento.

En cuanto a la adición del fenol al reactivo, Miller coincide con Sumner en cuanto a que su función es el incremento de la cantidad de color producida al balancear el efecto del "fenol" encontrado en la orina.

Miller asegura que la equivalencia entre el producto de reducción (afirmando que es el ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico) y el azúcar reductor no es exacta por lo que menciona que la química del método es apreciablemente más complicada. Lo anterior lo atribuye a las posibles reacciones de descomposición del azúcar en disolución alcalina, afirma que la reacción entre el azúcar con el ácido 3,5-dinitrosalicílico cumple con reacciones simultáneas que implican descomposición del azúcar.

#### OBSERVACIONES:

- Miller al igual que Sumner, afirman que el azúcar presente en la muestra es afectado por la acción del oxígeno en presencia del álcali; sin embargo dice que el compuesto responsable de eliminar el oxígeno en la disolución del reactivo no es la sal de Rochelle, sino el bisulfito y además asegura que la sal de Rochelle interfiere con la acción protectora del bisulfito sobre la glucosa. Por lo anterior propone la eliminación de la sal de Rochelle en el reactivo y su sustitución por el bisulfito de sodio.
- Miller invierte los papeles de la sal de Rochelle y bisulfito de sodio, más no da una explicación química satisfactoria de sus afirmaciones.



- En relación al fenol adicionado al reactivo, Miller apoya la justificación dada por Sumner (45), diciendo que su función es incrementar la cantidad de color producido y balancear el efecto del fenol en la orina. De lo anterior se cuestionan dos cosas, la primera de ellas es que Miller aplica el método para muestras diferentes a la orina, las cuales posiblemente carezcan de fenol y aún así adiciona este compuesto; la segunda es que Miller menciona al igual que Sumner que la orina contiene de manera normal fenol, lo cual no es apoyado con bibliografía apropiada, que mencione cuales son y en que concentraciones se encuentran los fenoles a los que se refieren. (La orina en condiciones normales carece de compuestos fenólicos, ver tabla 3)
- Afirma que el compuesto reducido es el ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico; sin embargo no justifica dicha afirmación con estudios experimentales.
- Éste resulta ser el único artículo revisado que critica algunos fundamentos del método; sin embargo no fue lo suficientemente convincente, ya que la mayoría de los autores que utilizan el método del DNS, se basan en los reportes originales de Sumner, a excepción de Marsden, L.W. y cols. (64), quienes se basan en este procedimiento modificado para realizar sus estudios.

Por último resulta importante mencionar que otro de los aspectos discutidos ampliamente por quienes han revisado el método es el notable efecto termocrómico que presenta el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

En relación a lo anterior, Brodersen y Ricketts, en 1949 (51), realizaron una revisión del método encontrando que el color del reactivo es

fuertemente dependiente de la temperatura y que su absorbancia incrementa un 20 % al aumentar la temperatura de 20 a 30 °C, mientras que la absorbancia de una solución fuertemente colorida resultante de un elevado contenido de azúcar, incrementa únicamente un 9 % con el mismo cambio en la temperatura, por lo cual afirma la necesidad de mantener tanto el blanco de la reacción como la mezcla del reactivo y la muestra, a la misma temperatura, con la finalidad de obtener medidas confiables.

Posteriormente en 1956 (52), Bottle y Gilbert, observan también que una fuente importante de error en la determinación de azúcares reductores por su reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, es atribuible al efecto termocrómico, por lo cual proponen un experimento en el que determinan la absorbancia del blanco de reacción a diferentes temperaturas con respecto al agua, tomando las lecturas a 520 nm, encontrando que la absorbancia del ion DNS, se incrementa a más del 50 % entre los 10 y los 30 °C; sin embargo al evaluar si el producto de la reducción del DNS presentaba también dicho efecto termocrómico, se vio que éste era muy moderado, lo que se podía atribuir a que en el caso del DNS la interacción entre el ion carboxilo y el grupo o-nitro es muy fuerte, mientras que en el caso del producto de reducción del DNS, no se da dicha interacción. Ellos afirman también que el error producido por dicho efecto termocrómico del reactivo, puede ser evitado al mantener la solución del producto de reacción y el blanco a la misma temperatura, pero ésta no debe fijarse a menos que una apreciable proporción del reactivo haya reaccionado.

Por último, Huntington y Schellman en 1972 (53), y Stott en 1973 (54), encuentran aplicaciones interesantes para el efecto termocrómico tan

marcado que presenta el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Los primeros autores se basaron en esta propiedad para diseñar un sistema de medición de temperatura en un sistema en flujo, mientras que el segundo la utiliza para diseñar un termómetro óptico.

#### OBSERVACIONES:

- La propiedad termocrómica presentada por el DNS, es un factor que fue estudiado por primera vez por Brodersen y Ricketts en 1949; sin embargo, es un factor poco conocido y sobre todo poco considerado por quienes aplican el método de manera habitual, esto puede introducir una importante fuente de error en los estudios, que debe ser importante de considerar.
- Un procedimiento que puede ser utilizado para evitar el error que puede ser introducido por efecto termocrómico del reactivo, consiste en tomar las lecturas de absorbancia tanto del blanco como de la muestra a la misma temperatura.

Existen muchos autores que han utilizado el método del DNS propuesto por Sumner para determinar carbohidratos reductores en muy diversas muestras; en particular es importante hacer mención de dos autores: P. Bernfeld y G. Noelling (55, 56, 67), que fueron los primeros en aplicar el método del DNS para la medición de grupos reductores finales, liberados por la acción de enzimas amilasas.

Basándose en estos trabajos, se han desarrollado muchos estudios que se basan en el método del DNS, tanto para el estudio de la estructura

del almidón (55, 58, 61), como para el estudio de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas encargadas de su degradación (56, 57, 59, 60, 62, 63, 65, 66).

Además, el método del DNS también ha sido utilizado para medir el contenido de azúcares reductores en materiales derivados de la celulosa (64), en donde además del método clásico de determinación, se propone un método automatizado de flujo segmentado.

Es importante hacer notar que dos de los artículos citados presentan un estudio más profundo de las posibles interferencias debido al  $\text{Ca}^{2+}$  (65, 66) y otros metales como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ , y  $\text{Ba}^{2+}$  (62).

#### **OBSERVACIONES GENERALES:**

- En cuanto a la preparación del reactivo, la mayoría de los estudios se basan en el método del DNS propuesto por Sumner (44, 45); algunos de ellos incluyen al fenol y bisulfito de sodio, pero la mayoría incluyen únicamente al DNS, NaOH y sal de Rochelle. Es importante mencionar que quienes aplican el método del DNS, no conocen cuál es la función de la sal de Rochelle, sin embargo, la adicionan de manera normal cada vez que lo utilizan.
- Uno de los errores más comunes que se presenta en los artículos revisados, es el hecho de ignorar la matriz de la muestra en estudio, con lo que la determinación puede estar sujeta a errores introducidos por los constituyentes de la matriz que puedan interferir con la reacción de reducción del DNS.
- Es importante remarcar que en los tres primeros artículos publicados por Sumner (43, 44, 45), la medición del compuesto colorido se lleva a cabo

con colorímetros, comparando las muestras con estándares (de concentraciones conocidas de glucosa o de alumbre férrico), con lo cual podemos justificar que Sumner, limitado por la tecnología con la que contaba, pudiera haber obtenido datos poco confiables, a partir de la lectura en una longitud de onda que no era la óptima; sin embargo esto no es justificable para quienes en la actualidad aplican el método ya que se cuenta con equipos y condiciones mucho más confiables para realizar estas mediciones.

- Es importante remarcar que en la actualidad aún con los modernos equipos UV-VIS con los que se cuenta en los laboratorios tanto de Investigación como de licenciatura, las mediciones de absorbancia se sigan llevando a cabo a una  $\lambda$  máxima de absorción de 540 nm que no resulta ser la óptima (480 nm), con lo cual la sensibilidad del método disminuye significativamente; lo cual se puede observar en algunas de las prácticas que se realizan en los laboratorios de Productos Vegetales, Productos de Cereales y Análisis de Alimentos de la carrera de química en alimentos, entre otros, en los cuales se aplica inadecuadamente dicho método.

## **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**

### **4.1 REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL:**

#### **4.1.1 Reactivos:**

- Glucosa R.A. (J.T. Baker)
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico R.A. (SIGMA)
- Tartrato de sodio y potasio "Sal de Rochelle" R.A. (Mallinckrodt)
- Fenol R.A. (Técnico Química SA.)
- Bisulfito de sodio R.A. (T.J. Baker)
- NaOH R.A. (Mallinckrodt)

#### **4.1.2 Equipo:**

- Los espectros de absorción fueron obtenidos con un espectrofotómetro CARY 1/3, UV-VIS, VARIAN, equipado con una computadora EPSON EL2, monitor a color EPIX VGA y una impresora EPSON LX 810.

#### **4.1.3 Material:**

- Material de vidrio calibrado.
- Para la toma de mediciones de absorbancia en el espectrofotómetro visible CARY 1/3, las muestras se colocaron en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud del paso óptico.
- Los volúmenes de reactivos y muestras, fueron medidos con micropipetas Gilson (50-200  $\mu$ l) y Finnipipette (50-200  $\mu$ l y 1-5 mL).

## **4.2 METODOLOGÍA:**

### **4.2.1 MÉTODO ORIGINAL PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR SU REACCIÓN CON EL DNS:**

A continuación se presenta la metodología propuesta por Sumner para la determinación de azúcares reductores (3), que resulta ser aplicada en la actualidad:

#### **A. REACTIVO:\***

- DNS (1 %)
- Fenol (0.7 %)
- NaOH (1.6 %)
- Bisulfito de sodio (0.7 %)
- Sal de Rochelle (30 %)

\*Concentraciones finales en el reactivo.

• Para la curva de calibración se requiere una solución patrón de glucosa (1 mg/mL), a partir de la cual se realizarán las diluciones necesarias.

#### **B. PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**

- Disolución de DNS + NaOH + Sal de Rochelle + Fenol + Bisulfito de sodio:

Pesar y disolver en un pequeño volumen de agua (aproximadamente 5 mL), el DNS y por separado, pesar y disolver la NaOH, sal de Rochelle, fenol y bisulfito de sodio; mezclar las disoluciones en matraz aforado de 100 mL, adicionar agua hasta el aforo.

- **Disolución de Glucosa:**

Pesar y disolver la glucosa en un pequeño volumen de agua (aproximadamente 5 mL), llevar al aforo de 100 mL con agua destilada.

**C. PROCEDIMIENTO:**

Colocar en tubos de ensaye, 1.0 mL de muestra + 1.0 mL de reactivo del DNS, tapar los tubos con canicas de vidrio y calentar durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, enfriar por 3 minutos con agua fría o hielo, añadir 5 mL de agua a temperatura ambiente, dejar en reposo 5 minutos y leer la absorbancia en espectrofotómetro visible a 540 nm, tomando como blanco el DNS con el mismo tratamiento que la muestra.

Realizar una curva de calibración con 5 puntos de concentraciones de glucosa conocidas (0.1-1.0 mg/mL)

**4.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL:**

El método original, como ya se discutió, presenta anomalías y se requiere de la demostración experimental de las mismas. A continuación se menciona la secuencia de experimentos que se llevaron a cabo y que posteriormente se explicarán con más detalle:

**4.3.1 Evaluación de la  $\lambda$  máxima de absorción del compuesto colorido formado.** Se evaluará la  $\lambda$  óptima a la cual se deben tomar las lecturas de absorbancia.



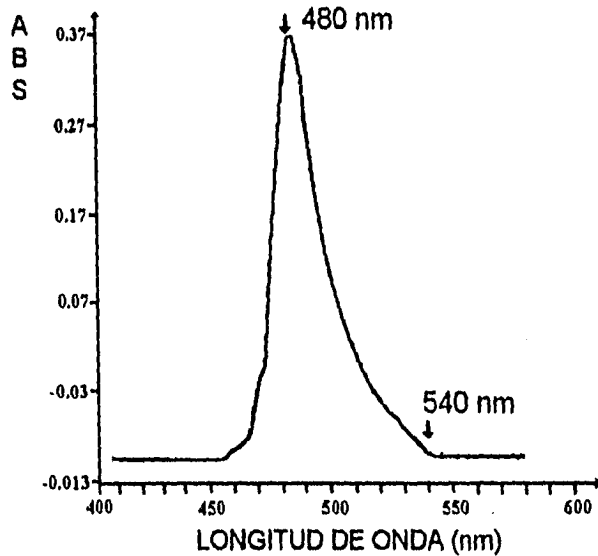
- 4.3.2 Estudio del mecanismo de reacción.** Se llevará a cabo una curva de valoración espectrofotométrica para determinar la relación molar entre el DNS y la glucosa y se expondrá un posible mecanismo de reacción que explique dicha relación.
- 4.3.3 Justificación del uso de cada uno de los reactivos.** En este apartado se discutirá la adición de la sal de Rochelle y la del fenol y bisulfito de sodio, y se plantearán diversos experimentos que muestren si intervienen o no en la determinación.
- 4.3.4 Evaluación del tiempo de calentamiento.** Se determinará cual es el tiempo óptimo de calentamiento para llevar a cabo de manera exitosa la reducción del DNS.
- 4.3.5. Protocolo de trabajo.** Se expondrá un protocolo de trabajo en el cual se detallará tanto la preparación de reactivos como el procedimiento para determinar azúcares reductores por su reacción con el DNS.

#### **4.3.1 EVALUACIÓN DE LA $\lambda$ MÁXIMA DE ABSORCIÓN DEL COMPUESTO COLORIDO FORMADO:**

El primer error importante encontrado al estudiar el método del DNS propuesto por Sumner, fue que la longitud máxima de absorción a la cual se tomaban las lecturas de las muestras era incorrecta, (el máximo de absorción se presenta en 480 nm y no en 540 como se indicaba), (ver figura 14); esto es justificable en el caso de Sumner, quien se basó en un colorímetro (que era el equipo más avanzado de su época), para obtener sus medidas de concentración, lo cual implica equipos en los que la selección de  $\lambda$ , se realizaba con filtros que abarcaban un intervalo muy

amplio de longitudes de onda, e inclusive, en algunos la diferenciación de colores se realizaba a simple vista, por lo que las medidas obtenidas con estos equipos no eran confiables; sin embargo esto no es justificable para quienes aplican el método del DNS en la actualidad ya que ahora se cuenta con equipos de mayor resolución capaces de medir el espectro de absorción de un compuesto de manera muy confiable (en ordenes mínimo de 1 nm de resolución).

A continuación se presenta el espectro visible del compuesto formado por acción de la glucosa (0.2 mg/mL) sobre el DNS (1 %) en medio alcalino (NaOH 0.4 M). Tomando como blanco el reactivo de DNS con el mismo tratamiento que la muestra.



**Figura 14.** Espectro de absorción del compuesto reducido, formado por reacción de la glucosa con el DNS en medio alcalino.

En todos los experimentos que a continuación se presentan, las mediciones de absorbancia fueron tomadas en ambas longitudes de onda (480 y 540 nm), con la finalidad de verificar cual es la diferencia entre ambas condiciones.

#### 4.3.2 ESTUDIO DEL MECANISMO DE REACCIÓN:

En relación al estudio del mecanismo de reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico con glucosa, basados en experimentos espectrofotométricos, se planeó la realización de una curva de valoración espectrofotométrica, con la finalidad de evaluar la relación molar entre el DNS y la glucosa, según el número de electrones intercambiados.

Esta curva de valoración se planeó de manera que la glucosa se mantuviera constante en cada caso y el DNS fuera el que cambiara de concentración de manera que al inicio de la curva éste fuera el reactivo limitante de la reacción, mientras que al final, éste se debía mantener en exceso, con la finalidad de encontrar el punto de equivalencia de la reacción y así poder conocer la relación molar entre el DNS y la glucosa.

Para la curva de valoración se graficó absorbancia en el eje de las ordenadas y la relación de concentración de DNS (M)/Concentración de glucosa (M) en el eje de las abscisas (ver figura 15); los datos de las concentraciones así como las absorbancias en cada punto se reportan a continuación (Tabla 4):

- Concentración de solución madre de glucosa:  $5.5 \times 10^{-3}$  M.
- Concentración de solución madre de DNS:  $4.3 \times 10^{-3}$  M. y  $4.3 \times 10^{-2}$  M.

Glucosa $5.5 \times 10^{-3}$ M (mL)	Conc. Glucosa (M)	DNS $4.3 \times 10^{-2}$ M (mL)	Conc. DNS (M)	Vol. Total (mL)	ABS	Conc. DNS (M) / Conc. Gluc (M)
0.5	$4.91 \times 10^{-4}$	0.1	$7.67 \times 10^{-4}$	5.6	1.1450	1.5621
0.5	$4.86 \times 10^{-4}$	0.15	$11.4 \times 10^{-4}$	5.65	1.6723	2.3456
0.5	$4.82 \times 10^{-4}$	0.2	$15.08 \times 10^{-4}$	5.7	2.2171	3.1286
0.5	$4.78 \times 10^{-4}$	0.25	$18.6 \times 10^{-4}$	5.75	2.5686	3.8912
0.5	$4.74 \times 10^{-4}$	0.3	$22.2 \times 10^{-4}$	5.8	2.9728	4.6835
0.5	$4.66 \times 10^{-4}$	0.4	$29.1 \times 10^{-4}$	5.9	3.4824	6.2446
0.5	$4.5 \times 10^{-4}$	0.6	$42.2 \times 10^{-4}$	6.1	4.1262	9.3777
0.5	$4.36 \times 10^{-4}$	0.8	$54.6 \times 10^{-4}$	6.3	4.2087	12.5229
0.5	$4.33 \times 10^{-4}$	0.85	$57.5 \times 10^{-4}$	6.35	4.2911	13.2794
0.5	$4.29 \times 10^{-4}$	0.9	$60.4 \times 10^{-4}$	6.4	4.2911	14.6792

Tabla 4. Condiciones experimentales para la realización de la curva de valoración espectrofotométrica. Las lecturas de absorbancia fueron obtenidas en una  $\lambda$  480 nm.

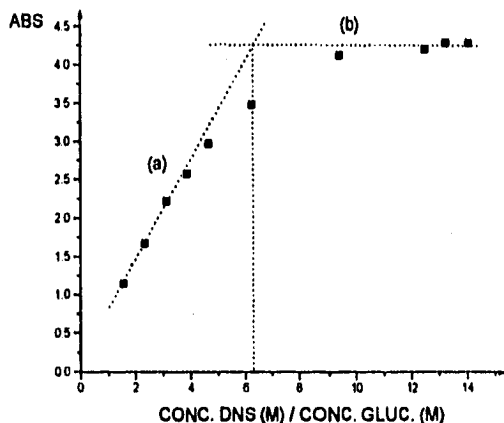


Figura 15. Curva de valoración espectrofotométrica. Longitud de onda 480 nm. Blanco agua:

- a) Ec. de la recta:  $Y = 0.2901 + 0.5845X$   
b) Ec. de la recta:  $Y = 3.8130 + 0.0334X$

Para obtener numéricamente el punto de equivalencia de la reacción, se calculó el punto de intersección entre las dos rectas que forman la curva de valoración:

$$\text{Ecuación de la recta a): } Y = 0.2901 + 0.5845X$$

$$\text{Ecuación de la recta b): } Y = 3.8130 + 0.0334X$$

$$\text{Punto de intersección: } 0.2901 + 0.5845X = 3.8130 + 0.0334X$$

$$X = 6.39$$

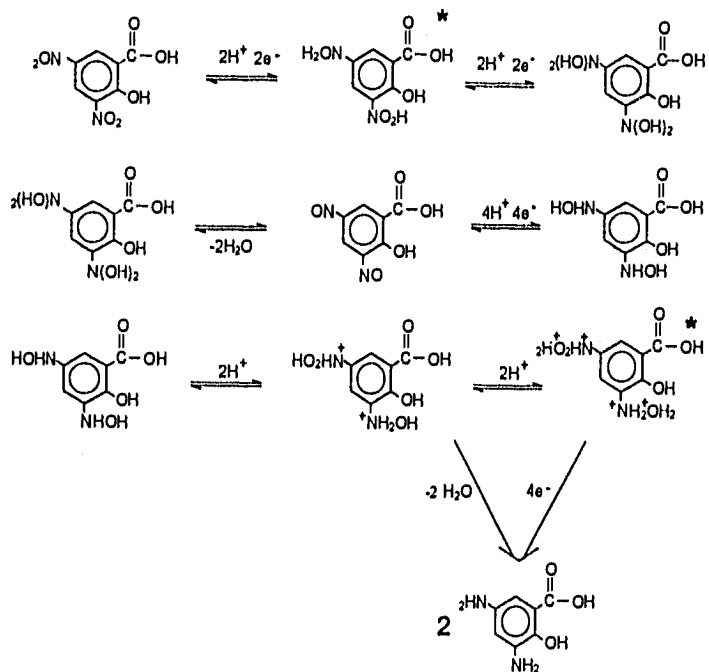
La curva de valoración espectrofotométrica, nos muestra que la relación entre el DNS y la glucosa es 1 a 6, lo cual involucra 12 electrones intercambiados, esto implica que se reduzcan los dos grupos nitro hasta el amino, ya que por cada uno se intercambian 6 electrones.

**Nota:** El blanco del experimento, fue una disolución de NaOH (0.4 M), por lo que es de suponerse que la señal de absorbancia tiende a saturarse por efecto de concentración del reactivo, sin embargo, a la  $\lambda$  de 480 nm, se obtuvieron señales de absorbancia adecuadas para determinar la relación molar entre el DNS y la glucosa.

A partir de la curva de valoración llevada a cabo así como del estudio teórico realizado, a continuación se presenta el mecanismo de reacción propuesto:

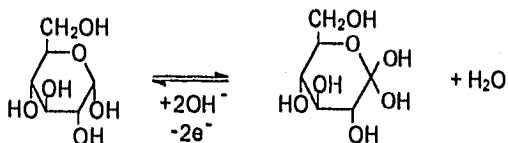
• MECANISMO DE REACCIÓN:

1. REDUCCIÓN DEL DNS:

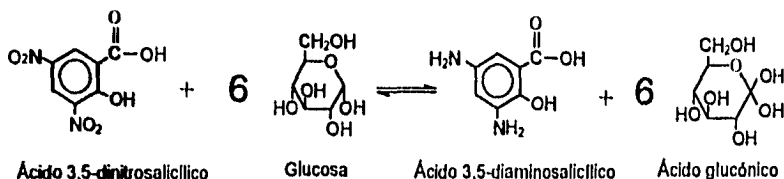


\* Compuestos de transición

2. OXIDACIÓN DE LA GLUCOSA.



### 3. REACCIÓN GLOBAL:



NOTA: En la reacción presentada, no se incluyen la Sal de Rochelle, el Fenol y el Bisulfito de sodio, puesto que no intervienen en la reacción.

#### 4.3.3 JUSTIFICACIÓN DEL USO DE CADA UNO DE LOS REACTIVOS

Uno de los puntos importantes a tratar, en el estudio del método para la determinación de azúcares reductores por su reacción con el DNS, fue la justificación del uso de cada uno de los reactivos que intervenían en dicha determinación, para lo cual se planearon una serie de experimentos que permitieron definir si los componentes del reactivo: Sal de Rochelle, Fenol y Bisulfito de sodio, eran o no de utilidad.

##### 4.3.3.1 JUSTIFICACIÓN DE LA SAL DE ROCHELLE

a) Con el objeto de demostrar que la sal de Rochelle no tenía efecto alguno en la reacción entre el DNS y el azúcar se realizó un estudio de la variación de la concentración de glucosa (concentraciones de 0.1-1.0 mg/mL) con DNS (1 %) en ausencia y presencia de la sal de Rochelle. Los resultados obtenidos son idénticos (ver figuras 16, 17, 18 y 19):

• Reactivo DNS (1 %) + NaOH(0.4 M)

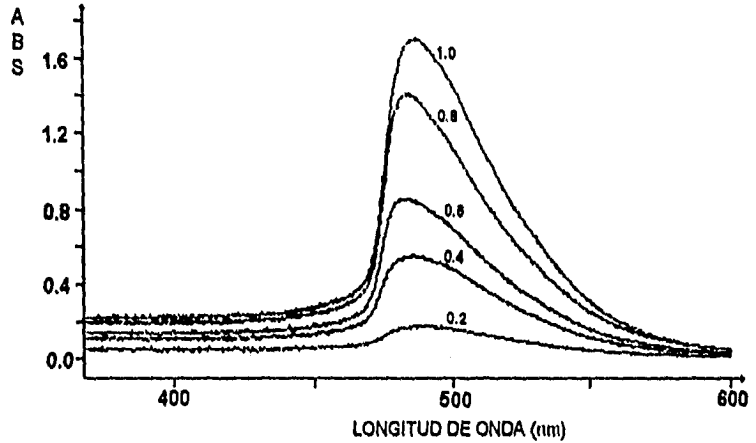


Figura 16. Espectros de absorción referentes al estudio de la variación de la concentración de glucosa (0.1-1.0 mg/mL), con respecto al reactivo: DNS (1 %) + NaOH (0.4 M); en ausencia de Sal de Rochelle.

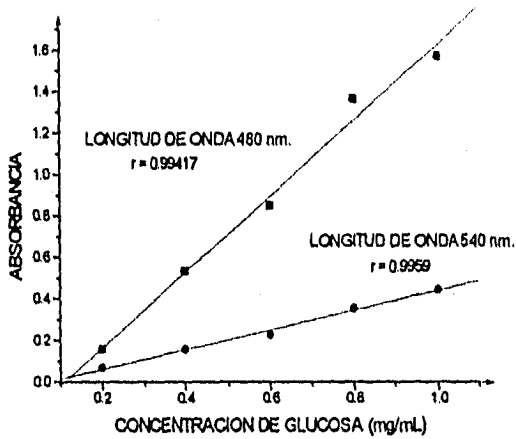
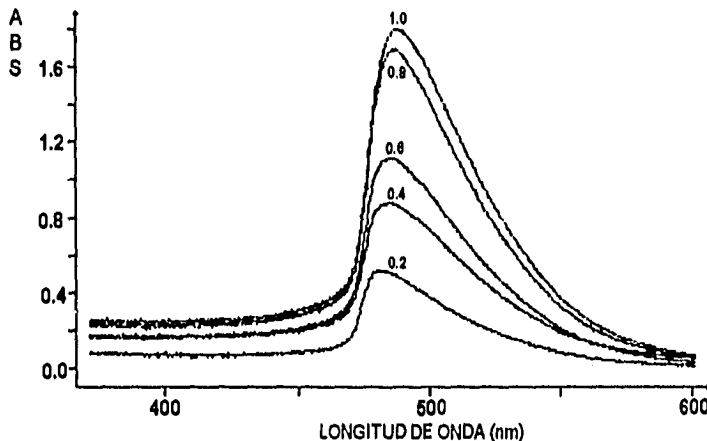


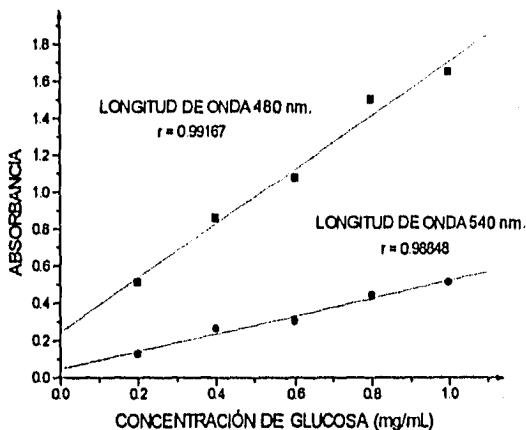
Figura 17. Curva que representa la variación de la concentración de glucosa (0.1-1.0 mg/mL), con respecto al reactivo: DNS (1 %) + NaOH (0.4 M); en ausencia de Sal de Rochelle.



- Reactivo: DNS(1 %) + NaOH(0.4 M) + Sal de Rochelle (30 %)

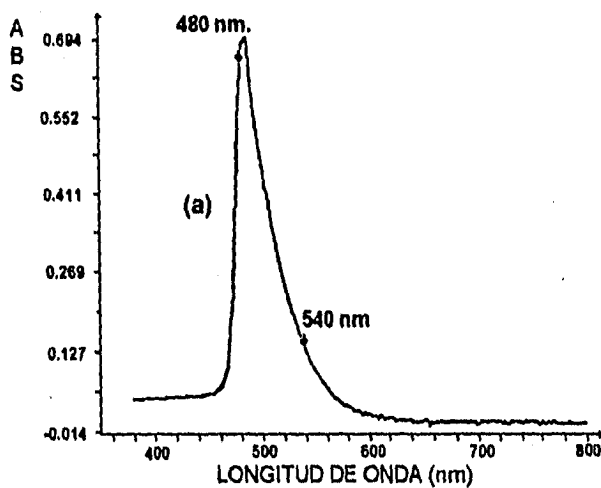


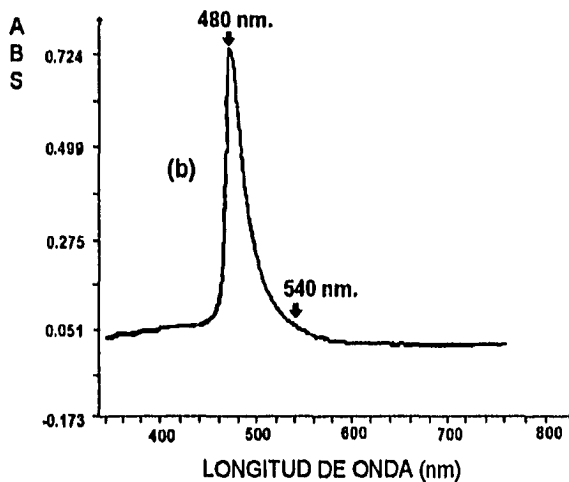
**Figura 18.** Espectros de absorción referentes al estudio de la variación de la concentración de glucosa (0.1-1.0 mg/mL), con respecto al reactivo: DNS (1 %) + NaOH (0.4 M) en presencia de Sal de Rochelle (30 %).



**Figura 19.** Curva que representa la variación de la concentración de glucosa (0.1-1.0 mg/mL), con respecto al reactivo: DNS (1 %) + NaOH (0.4 M); en presencia de Sal de Rochelle (30 %).

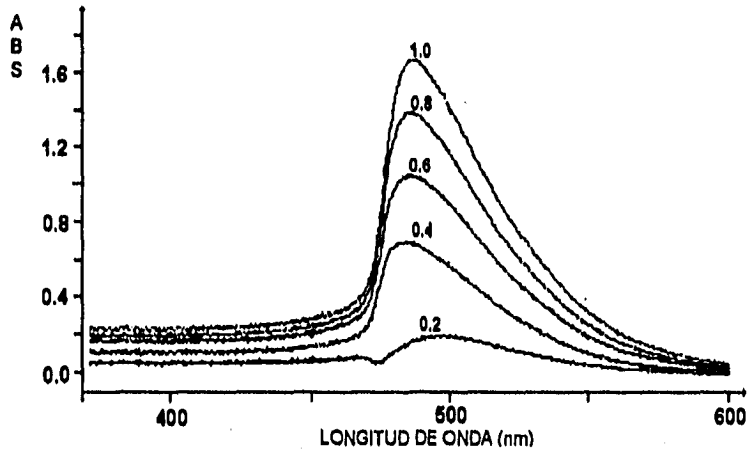
Al observar los espectros visibles de las curvas de calibración (figura 20) resulta importante remarcar que el espectro del producto de la reacción entre el DNS y la glucosa, en medio alcalino, con y sin sal de Rochelle es el mismo; por lo cual, con más seguridad se puede afirmar que este compuesto no tiene efecto alguno en el desarrollo de la reacción.



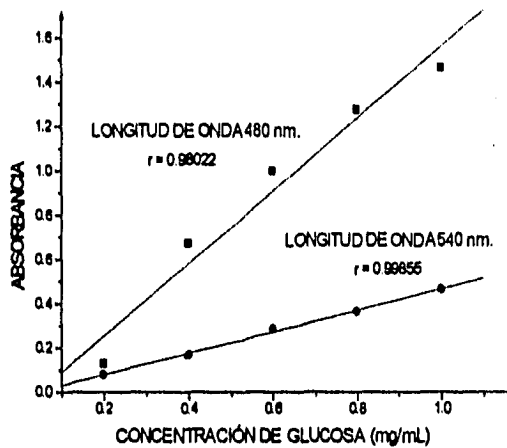


**Figura 20.** Espectros visuales del producto de la reacción entre el DNS y la glucosa, en medio alcalino a) con sal de Rochelle, b) sin sal de Rochelle.

b) Para estudiar el efecto que pudiera tener la sal de Rochelle en el desplazamiento del oxígeno (y el efecto de éste en la reacción) se realizó un experimento en el que se hizo pasar una corriente de nitrógeno, tanto a la muestra como al reactivo, durante 3 minutos, para desplazar el oxígeno disuelto, y se comparó con un experimento sin eliminar oxígeno, obteniéndose los mismos resultados (figuras 21 y 22), comparar con figura 16.



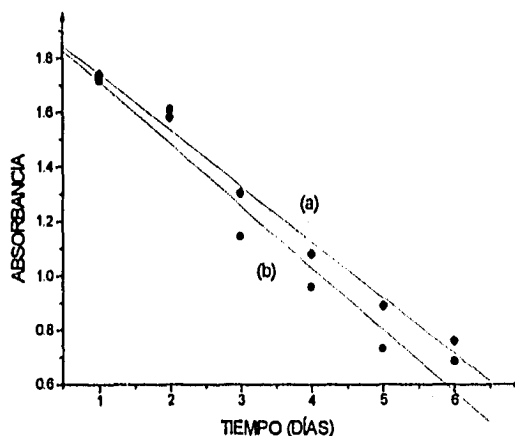
**Figura 21.** Espectros de absorción referentes al estudio del efecto que puede tener el tratar tanto el reactivo como la muestra con una corriente de nitrógeno, con la finalidad de eliminar el oxígeno disuelto en la solución.



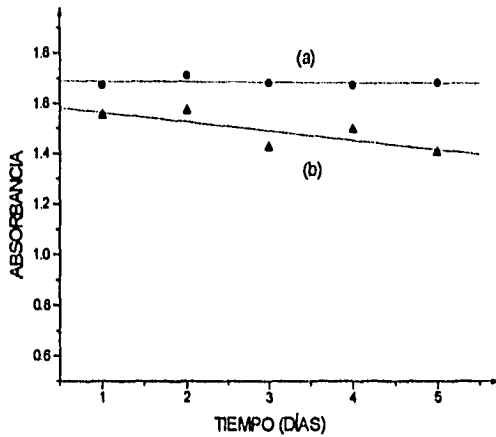
**Figura 22.** Curva de absorbancia con respecto a concentración de glucosa referente al estudio del efecto que puede tener el tratar tanto el reactivo como la muestra con una corriente de nitrógeno, con la finalidad de eliminar el oxígeno disuelto en la solución.

c) Para demostrar que la sal de Rochelle no le confería estabilidad al producto colorido se realizó un experimento en el cuál se estudia la descomposición del reactivo bajo diferentes condiciones ambientales (figuras 23, 24 y 25). Se determinó una disminución en la señal del producto de la reacción en presencia de luz y aire, tanto con el reactivo en presencia de sal de Rochelle como en su ausencia.

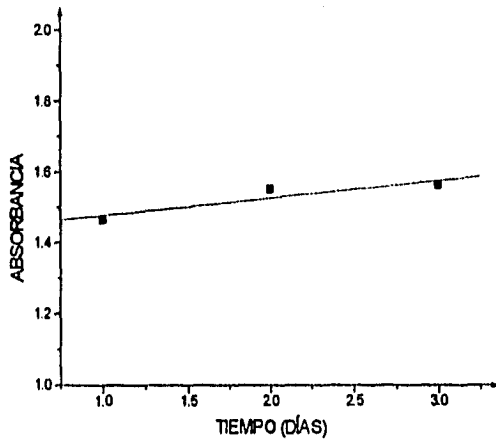
Es por esto que se puede asegurar que el tartrato de sodio y potasio no mejora la estabilidad del producto de reacción como originalmente se había planteado. La luz afecta al producto de reducción y por lo tanto existe una disminución en la Intensidad de la señal con el tiempo. Al conservar los reactivos en ausencia de luz, el color se mantiene estable mucho mas tiempo.



**Figura 23.** Efecto del tiempo sobre el producto de la reacción en presencia de luz y aire a) reactivo sin sal de Rochelle, b) reactivo con sal de Rochelle. Longitud de onda 480 nm.



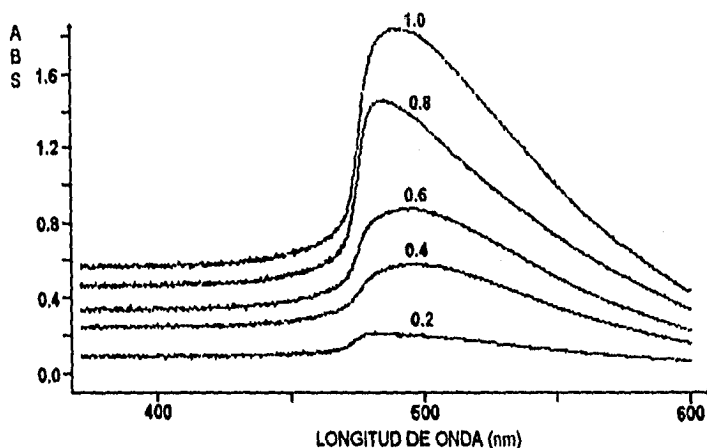
**Figura 24.** Efecto del tiempo sobre el producto de la reacción en ausencia de luz y aire a) reactivo sin sal de Rochelle, b) reactivo con sal de Rochelle. Longitud de onda 480 nm.



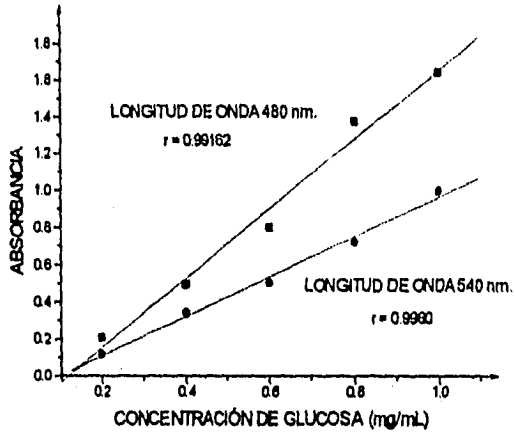
**Figura 25.** Efecto del tiempo sobre el producto de la reacción en ausencia de luz y con atmósfera de nitrógeno reactivo sin sal de Rochelle. Longitud de onda 480 nm.

#### 4.3.3.2 JUSTIFICACIÓN DEL FENOL Y BISULFITO DE SODIO.

Para comprobar que el fenol y el bisulfito no tenían ningún efecto sobre la reacción, se realizó de la variación de la concentración de glucosa (concentraciones de 0.1-1.0 mg/mL), en presencia de fenol (0.7 %) y bisulfito de sodio (0.7 %), además del DNS y NaOH y se compararon contra otra en la que el reactivo consta únicamente de DNS y NaOH (figuras 26 y 27).



**Figura 26.** Espectros de absorción referentes al estudio de la variación de la concentración de glucosa (0.1-1.0 mg/mL), con respecto al reactivo: DNS (1 %) + NaOH (0.4 M); en presencia de Fenol (0.7 %) y Bisulfito de sodio (0.7 %)



**Figura 27.** Curva que representa la variación de la concentración de glucosa (0.1-1.0 mg/mL), con respecto al reactivo: DNS (1 %) + NaOH (0.4 M); en presencia de Fenol (0.7 %) y Bisulfito de sodio (0.7 %).

#### 4.3.4 EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CALENTAMIENTO:

Se llevó a cabo la reacción entre el DNS (1 %) con la glucosa (1 mg/mL) en medio alcalino (NaOH 0.4 M), variando el tiempo de calentamiento: 3, 5, 7, 10 y 15 minutos respectivamente, manteniendo en cada uno de los casos la temperatura del baño de agua constante (85 °C). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 28 y 29.



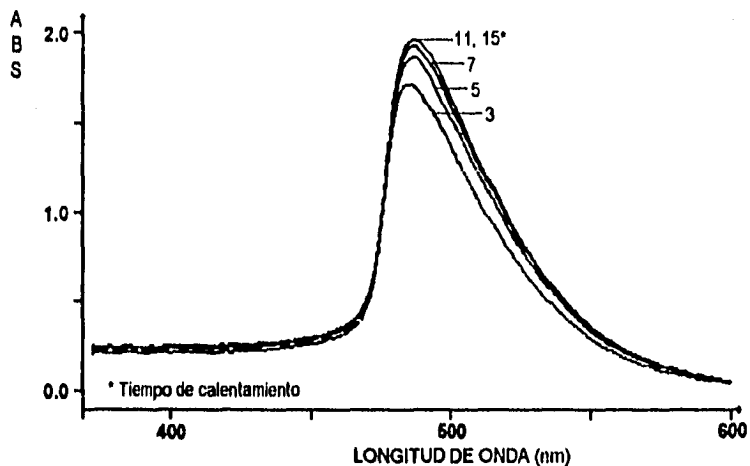


Figura 28. Espectros de absorción del compuesto formado, con diferentes tiempos de calentamiento. Longitud de onda 480 nm.

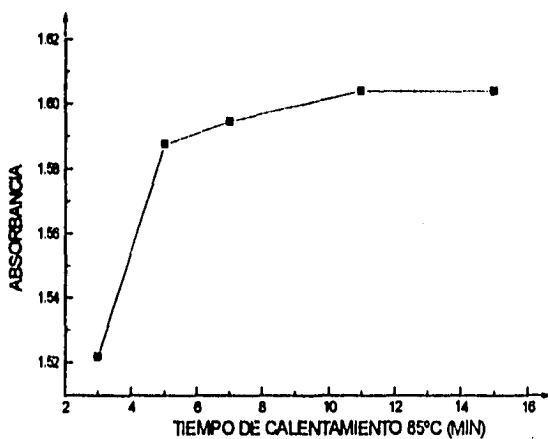


Figura 29. Evaluación del tiempo de calentamiento. Longitud de onda 480 nm.

En estas figuras, se puede observar que a partir de los diez minutos de calentamiento, la señal obtenida por el compuesto reducido no aumenta significativamente, por lo cual se estableció dicho tiempo como el óptimo para la reacción.

Por último, en relación a la temperatura de calentamiento, se estableció que se debía mantener constante (85 °C), en un baño de agua, para poder llevar a cabo la reducción del DNS; al igual, el tiempo de reposo y la temperatura a la que se debían tomar las lecturas tanto del compuesto reducido como del blanco, deberían mantenerse constantes durante todos los experimentos con el fin de estandarizar lo más posible dichas condiciones que afectan al método.

Lo anterior resulta muy importante de considerar, debido al efecto termocrómico del DNS, ya que se sabe, (52, 53, 54), que la absorbancia del DNS se incrementa a más del 50 % entre los 10 y los 30°C, al contrario del efecto presentado por el DNS reducido, el cual resulta ser muy moderado, debido tal vez a que en el caso del DNS, la interacción entre el ion carboxilo y el grupo  $o\text{-NO}_2$  es muy fuerte, mientras que en el caso del DNS reducido, supuestamente no se presenta dicha interacción. Por lo anterior, con la finalidad de evitar el error proporcionado por dicho efecto termocrómico, se deben mantener tanto la solución del compuesto reducido como el blanco a la misma temperatura.

#### **4.3.5 PROTOCOLO DE TRABAJO:**

De todo lo anterior se logra establecer un procedimiento optimizado en todos sus parámetros (tiempo de desarrollo de color, temperatura de reacción, condiciones de enfriamiento y calentamiento, longitud de onda apropiada para la toma de lecturas de manera más precisa y reproducible). Las condiciones óptimas son las siguientes, planteadas dentro de un protocolo de trabajo.

#### **EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS:**

##### **A. EQUIPO:**

- Balanza Analítica
- Baño de agua (85 °C)
- Termómetro
- Cronómetro
- Espectrofotómetro
- Dos celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico

##### **B. MATERIAL:**

- 3 vasos de precipitados de 50 mL
- 1 espátula
- 2 matraces aforados de 100 mL
- 2 matraces aforados de 10 mL
- 2 matraces aforados de 5 mL
- 5 tubos de ensaye de 16x150 mm, con rosca y tapa
- 1 gradilla
- 1 pipeta volumétrica de 10 mL
- 1 pipeta Pasteur para aforar

- pipetas volumétricas (1, 2, 3 y 4, mL)
- 1 propipeta

### C. REACTIVOS:

- Disolución de DNS y NaOH ( $4.38 \times 10^{-2}$  M y 0.4 M respectivamente "Concentraciones finales en el reactivo")
- Disolución patrón de glucosa ( $5.55 \times 10^{-3}$  M)
- Agua destilada

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Los reactivos indicados, deben ser de grado reactivo analítico; cuando se mencione agua, debe entenderse agua destilada.

- **Disolución de DNS + NaOH:**

Pesar 1.0 g de DNS en un vaso de precipitados de 25 mL y disolver en un pequeño volumen de agua (aproximadamente 5 mL); en otro vaso de precipitados, pesar y disolver 1.6 g de NaOH y mezclar ambas disoluciones en matraz aforado de 100 mL, adicionar agua hasta el aforo. Guardar en frasco ámbar perfectamente tapado. (De preferencia esta disolución debe ser recién preparada para cada determinación).

- **Disolución de glucosa de concentración conocida:**

Pesar 0.1 g de glucosa en un vaso de precipitados de 25 mL y disolver en un pequeño volumen de agua, transferir a un matraz y llevar hasta el aforo de 100 mL (concentración final  $5.55 \times 10^{-3}$  M).

- Disoluciones de la curva de calibración:

La curva de calibración consta de 5 puntos que corresponden a las concentraciones de:  $1.1 \times 10^{-3}$ ,  $2.2 \times 10^{-3}$ ,  $3.3 \times 10^{-3}$ ,  $4.4 \times 10^{-3}$ , y  $5.5 \times 10^{-3}$  M. Rotular 2 matraces aforados de 10 mL y 2 matraces aforados de 5 mL, con las concentraciones indicadas y adicionar el volumen indicado de disolución de glucosa  $5.5 \times 10^{-3}$  M. Aforar a 10 ó 5 mL, según sea el caso, con agua destilada.

No. de Matraz(AFORO mL)	Matraz Aforado (Concentración M)	Disol. Glucosa $5.5 \times 10^{-3}$ M (mL)
1 (10)	$1.1 \times 10^{-3}$	2
2 (10)	$2.2 \times 10^{-3}$	4
3 (5)	$3.3 \times 10^{-3}$	3
4 (5)	$4.4 \times 10^{-3}$	4

#### PROCEDIMIENTO:

Colocar en tubos de ensaye (con tapa de rosca), 1.0 mL de muestra + 1.0 mL de reactivo del DNS, tapar perfectamente los tubos y calentar durante 10 minutos a  $85^\circ\text{C}$ , enfriar por 3 minutos con agua corriente ( $20^\circ\text{C}$ ), añadir 10 mL de agua a temperatura ambiente, dejar en reposo 30 minutos y leer la absorbancia en espectrofotómetro visible a 480 nm, tomando como blanco el DNS con el mismo tratamiento que la muestra.

**Nota:** Resulta muy importante mantener las mismas condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento para todas las muestras y blanco ya

que el color de la solución es dependiente sobre todo de la temperatura; esto es debido a que el ácido 3,5-dinitrosalicílico tiene un notable efecto termocrómico lo cuál se puede controlar fácilmente al tomar la lectura de las muestras y blanco a la misma temperatura.

#### **RESULTADOS:**

- Registrar las lecturas obtenidas (absorbancia) con respecto a las concentraciones respectivas de glucosa.
- Trazar una curva en donde se grafiquen las absorbancias contra concentración de glucosa en concentración M.

## 5. RESUMEN DE RESULTADOS:

### 5.1 CURVAS DE VARIACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA CON RESPECTO AL DNS EN DIFERENTES CONDICIONES:

\* Concentraciones de glucosa: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL.

LONGITUD DE ONDA 480 nm.

REACTIVO	b	m	r	$\epsilon$	Figura No.
DNS+ NaOH	0.2029	1.8317	0.9942	333.0363	17
DNS+ NaOH+ SAL DE ROCHELLE	0.2456	1.4604	0.9917	265.5273	19
DNS+ NaOH+ FENOL+ BISULFITO DE SODIO	0.2208	1.8752	0.9916	340.9545	22
DNS+ NaOH (en atmósfera de nitrógeno)	0.0753	1.6386	0.9802	297.9364	26

b = ordenada al origen, m = pendiente, r = coeficiente de correlación  
 $\epsilon$  = coeficiente de absortividad molar ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )

LONGITUD DE ONDA 540 nm.

REACTIVO	b	m	r	$\epsilon$	Figura No.
DNS+ NaOH	0.0347	0.4753	0.9959	86.4182	17
DNS+ NaOH+ SAL DE ROCHELLE	0.0467	0.4754	0.9885	86.4277	19
DNS+ NaOH+ FENOL+ BISULFITO DE SODIO	0.1039	1.0693	0.9960	194.4273	22
DNS+ NaOH (en atmósfera de nitrógeno)	0.0189	0.4852	0.9985	88.2182	26

b = ordenada al origen, m = pendiente, r = coeficiente de correlación  
 $\epsilon$  = coeficiente de absortividad molar ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )

• ESTUDIO DE DESCOMPOSICIÓN DEL REACTIVO:

CONDICIÓN AMBIENTE	REACTIVO	SEÑAL OBTENIDA	PENDIENTE $\lambda$ 480 nm	Figura No.
En presencia de luz y aire	DNS+NaOH	disminuye	-0.1374	23a
En presencia de luz y aire	DNS+ NaOH+ Sal de Rochelle	disminuye	-0.1566	23b
En ausencia de luz y aire	DNS+ NaOH	se mantiene constante	-0.0020	24a
En ausencia de luz y aire	DNS+ NaOH+ Sal de Rochelle	se mantiene constante	-0.0370	24b
En ausencia de luz con atmósfera de Nitrógeno	DNS+ NaOH	se mantiene constante	0.0495	25

## 5.2 ANÁLISIS DE COSTOS:

### COSTO DEL REACTIVO PROPUESTO ORIGINALMENTE:

Compuesto	Conc. Final en el Reactivo (%)	Costo por 100 g de Compuesto (USD*)	Costo (USD)	Costo (PESOS**)
DNS	1	37.5	0.712	5.340
NaOH	1.6	3.24	0.098	0.735
Sal de Rochelle	30	212.6	20.197	151.477
Fenol	0.7	2.86	0.040	0.300
Bisulfito de sodio	0.7	9.0	0.120	0.900
<b>TOTAL:</b>			<b>21.167</b>	<b>158.760</b>

\* El costo de cada compuesto proveniente de un catálogo de Productos Químicos, está multiplicado por 1.9, que es el costo aproximado de comisión que cobra la compañía por distribuir sus productos en México.

\*\*Considerando un tipo de cambio de 7.5 pesos por 1 USD.



**COSTO DEL REACTIVO MODIFICADO:**

Compuesto	Conc. Final en el Reactivo (%)	Costo por 100 g de Compuesto (USD*)	Costo (USD)	Costo (PESOS**)
DNS	1	37.5	0.712	5.340
NaOH	1.6	3.24	0.098	0.735
<b>TOTAL:</b>			<b>0.810</b>	<b>6.080</b>

\* El costo de cada compuesto proveniente de un catálogo de Productos Químicos, está multiplicado por 1.9, que es el costo aproximado de comisión que cobra la compañía por distribuir sus productos en México.

\*\*Considerando un tipo de cambio de 7.5 pesos por 1 USD.

**COSTO DE LA GLUCOSA:**

Compuesto	Conc. Final en el Reactivo (%)	Costo por 100 g de Compuesto (USD*)	Costo (USD)	Costo (PESOS**)
Glucosa	0.1	72.96	0.073	0.54
<b>TOTAL:</b>			<b>0.073</b>	<b>0.54</b>

\* El costo de cada compuesto proveniente de un catálogo de Productos Químicos, está multiplicado por 1.9, que es el costo aproximado de comisión que cobra la compañía por distribuir sus productos en México.

\*\*Considerando un tipo de cambio de 7.5 pesos por 1 USD.

- El costo por curva Incluye cinco puntos, lo que implica la adición a cada punto de 1.0 mL de reactivo más 1.0 mL de solución estándar.
- El costo por análisis se refiere al costo de la curva más el costo referente a una muestra por duplicado.
- El costo por muestra adicional se refiere al costo de 1.0 mL de reactivo necesario para llevar a cabo la determinación en la muestra a estudiar.

<b>COSTOS</b>	<b>MÉTODO ORIGINAL</b>	<b>MÉTODO MODIFICADO</b>
POR CURVA	\$ 11.087	\$ 0.447
POR ANÁLISIS	\$ 14.247	\$ 0.567
POR MUESTRA ADICIONAL.	\$ 1.587	\$ 0.06

**% DE REDUCCIÓN DE COSTOS:**

<b>COSTOS</b>	<b>MÉTODO MODIFICADO</b>
POR CURVA	95.96 %
POR ANÁLISIS	96.02 %
POR MUESTRA ADICIONAL	96.22 %

## **6. DISCUSIÓN FINAL DE RESULTADOS:**

De los datos experimentales obtenidos, se pueden distinguir varios aspectos importantes de considerar; el primero de ellos y el más importante, es que para llevar a cabo la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico, únicamente es necesaria la presencia del agente reductor, en este caso la glucosa.

Al realizar los experimentos de variación de concentración de glucosa con respecto al reactivo (DNS en medio alcalino), en presencia y ausencia de la Sal de Rochelle, pudimos verificar que éste último compuesto no interviene en la reacción, ya que dichos espectros visibles, resultan ser muy similares; ver figuras 16, 18 y 20.

Sumner justifica la adición de la Sal de Rochelle en concentración tan elevada (30 %), aduciendo que el oxígeno disuelto en la solución es desplazado por efecto salino, evitándose así la acción destructiva de éste en presencia del álcali sobre el azúcar reductor, además de un supuesto incremento en la intensidad del color formado por efecto de la reducción. Sin embargo, al realizar un experimento en el que se introducía una corriente de nitrógeno durante tres minutos, con la finalidad de provocar el desplazamiento del oxígeno, se observó que no existían variaciones significativas con respecto al experimento en el que se hacía reaccionar la glucosa, en presencia de oxígeno con el mismo reactivo, formado por DNS y NaOH. Con lo anterior se puede asegurar que de existir dicha acción destructiva del oxígeno sobre la glucosa, no es lo suficientemente fuerte como para afectar la reacción.

La adición de Sal de Rochelle, también era justificada ya que mejoraba la estabilidad del color producido por la reducción; sin embargo, al estudiar la descomposición del reactivo bajo diferentes condiciones ambientales, se observó que el producto de la reacción en presencia de luz y aire, presentaba una disminución en la señal, tanto con el reactivo en presencia de Sal de Rochelle como en su ausencia, por lo que se puede asegurar que la Sal de Rochelle no mejora la estabilidad del producto de reacción como originalmente se había planteado.

La luz degrada el color producido por la reducción. Esto se pudo comprobar al realizar el experimento en ausencia de luz y aire y con atmósfera de nitrógeno, ya que en ambos casos, el color se mantuvo constante a lo largo del tiempo. Es debido a lo anterior que se recomienda preparar el reactivo fresco cada vez que se va a utilizar o en su defecto, mantenerlo en condiciones de oscuridad y perfectamente tapado.

Otro de los aspectos que resulta importante resaltar es la longitud de onda a la cual se deben tomar las lecturas; según los experimentos llevados a cabo, se observó que el máximo de absorción se presentaba en 480 nm y no en 540, como se encuentra reportado en el método original y con la cual se lleva a cabo la determinación en la actualidad.

Se obtuvo una mejora del método en cuanto a tiempo y temperatura de calentamiento, así como en las condiciones para llevar a cabo la reducción. Resulta muy importante mantener las mismas condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento para todas las muestras y el blanco, ya que el color de la solución es dependiente de la temperatura debido al notable efecto termocrómico del DNS, lo cual se puede controlar fácilmente al tomar las lecturas de las muestras y el blanco a la misma temperatura.

La optimización del método, permitió obtener una reducción muy significativa en los costos de análisis, tanto en relación a la curva de calibración espectrofotométrica (95.96 %), como por análisis completo (curva más muestras: 96.02 %) y por muestra adicional (96.22 %). \*Esto es muy importante de considerar si pensamos que en la actualidad existen un gran número de personas que aplican este método de manera rutinaria sin cuestionarse la utilidad de cada uno de los reactivos y sin pensar que el método que están aplicando fue desarrollado en una época en la que las bases técnicas no eran del todo satisfactorias.

Por otra parte, en cuanto al mecanismo de reacción propuesto, podemos decir que está basado en información teórica, así como en la relación molar dada por la curva de valoración espectrofotométrica llevada a cabo; sin embargo, para conocer con seguridad cual es la especie de reducción que se forma a partir de la reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico con la glucosa, sería adecuado realizar un estudio electroquímico.

Por último se debe mencionar que las muestras con las que se trabajó en el presente trabajo, no eran muestras reales, por lo que los resultados obtenidos no deben ser generalizados para cualquier muestra; para lo cual habría que evaluar la manera en que los constituyentes de la matriz de cada muestra en particular pudieran interferir en la determinación.

## **7. CONCLUSIONES:**

El tartrato de sodio y potasio, fenol y bisulfito de sodio, resultan ser reactivos sin ninguna utilidad para la determinación de azúcares reductores por su reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, por lo que se puede prescindir de ellos para llevar a cabo la determinación. De ésta manera, el método mejora en sensibilidad y sobre todo en costos.

La longitud de onda adecuada para realizar las mediciones de absorbancia, es 480 nm y no 540, longitud a la cuál se encuentra reportado el método original.

Del estudio teórico así como de la curva de valoración espectrofotométrica, llevada a cabo, se puede decir que la relación molar entre el DNS y la glucosa es 1 a 6, respectivamente, lo cual implica que se reducen los dos grupos nitro hasta el amino.

El tiempo óptimo de calentamiento es 10 minutos a 85°C, la temperatura tanto de las muestras como del blanco debe ser la misma en el momento de tomar las lecturas de absorbancia (correspondiente a la temperatura ambiente).

La optimización del método a través de establecer un protocolo detallado y sustentado teóricamente permitió optimizar no solo la respuesta, sino los costos y tiempos de análisis.

Es muy importante tomar en cuenta la matriz de cada muestra en particular, ya que la reacción entre el DNS y la glucosa, puede verse afectada por los constituyentes de dicha matriz con lo que el método no resultaría muy confiable.

#### **8. BIBLIOGRAFÍA:**

1. Badui, S., "Química de los alimentos", 2ª Edición, Editorial Alhambra Mexicana, México (1990).
2. Morrison y Boyd, "Química Orgánica", 5ª Edición, Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, México (1990).
3. Pine, S. H. et al., "Química Orgánica", 2ª Edición, Editorial Mc. Graw Hill, México (1988).
4. Caserio, S., "Química Orgánica", Editorial Fondo Educativo Interamericano S.A., EUA (1974).
5. Egan, H., "Análisis Químico de los Alimentos", 5ª Edición, Compañía Editorial Continental SA de CV, México (1993).
6. Belitz, W.G., "Food Chemistry", Editorial, Springer-Verlag, Germany (1987).
7. Pigman, W., "The Carbohydrates: Chemistry, Biochemistry, Physiology", Academic Press Inc. Publishers, EUA (1957).
8. Browne, "Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis", 3ª. Edición, John Wiley & Sons Inc., London (1941).
9. Furniss, B.S. y cols., "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry" 5ª. Edición, Longman Scientific & Technical, USA (1989).
10. Macrae, R. y cols., "Encyclopaedia of Food Science, Food Technology & Nutrition", Editorial Academic Press, Londres (1993).

11. Hart, F.L., "Análisis moderno de los alimentos", Editorial Acribia, España (1990).
12. Dubois, M. y cols., Anal. Chem., Vol. 28, 350-356, (1956).
13. Fernandez-Romero, M. y Luque de Castro, M. D., Anal. Chem., Vol. 65, 3048-3052, (1993).
14. Amerine, "Methods of Analysis of Mosts and Wines", 2ª Edición, Editorial Wiley Interscience Publication, USA (1980).
15. Ruzicka, J., "Flow Injection Analysis", 2ª Edición, Editorial Wiley-Interscience Publication, John Wiley and sons, Nueva York (1988).
16. Marko-Varga, G. y Dominguez, E., Trends in Anal. Chem., Vol 10, 290-297, (1991).
17. Masoom, y Townshend, Analytica Chimica Acta, Vol. 166, 111-118, (1984).
18. Toshio Yao\*, y cols., Analytica Chimica Acta, Vol. 165, 291-296, (1984).
19. Murakami, Y. y cols., Anal. Chem., Vol. 65, 2731-2735, (1993).
20. Wang, J. y cols., Anal. Chem., Vol 66, 3600-3603, (1994).
21. Wen, X. y cols., Anal. Chim. Acta, Vol. 249, 451-460, (1991).
22. Narang, U. y cols., Anal. Chem., Vol. 63, 3139-3144, (1994).
23. Toei, J., Talanta, Vol 36, 1233-1236, (1989).
24. Brown, D.S. y Jenke, D.R., Analyst, Vol 112, 899-902, (1987).
25. Matsubara, C. y cols., Anal. Chem., Vol. 57, 1107-1109, (1985).
26. Gulbaut, G. y cols., Anal. Chem., Vol 40, 1256-1263, (1968).
27. Fernandez Romero, M., Luque de Castro, M. D. y Valcárcel, M., Anal. Chim. Acta, Vol. 274, 99-107, (1993).
28. Johnson, D.C. y La Course, W.R., Anal. Chem., Vol. 62, 589A-597A, (1990).
29. Santos, L.M. y Baldwin, R.P., Anal. Chem., Vol. 59, 1766-1770, (1987).



30. O'Shea, T.J. y Lunte, M.S., Anal. Chem., Vol. 65, 948-951, (1993).
31. Colón, L.A. y cols., Anal. Chem., Vol. 65, 476-481, (1993).
32. Garner, T.W. y Yeung, E.S., J. Chromatogr., Vol. 515, 639-644, (1990).
33. Sawardeker, S.J. y cols., Anal. Chem., Vol. 37, 1602-1604, (1965).
34. Schäffler, K.J. y Morel Du Boll, G., J. Chromatogr., Vol. 207, 221-229, (1981).
35. Sweeley, C.C. y cols., J. Amer. Chem. Soc., Vol. 85, 2497-2507, (1963).
36. Higgins, M.K. y cols., Anal. Chem., Vol. 66, 2656-2668, (1994).
37. Wilton, R.S. y cols., J. Chromatogr., Vol. 347, 109-120, (1985).
38. Reinhold, V.N. y cols., Anal. Chem., Vol. 60, 2719-2722, (1988).
39. Fifield, R.W. y Kealey, D. "Principles and practices of analytical chemistry", 3ª Edición, Editorial Blackie, Gran Bretaña, (1990).
40. Owen, A.J., "The diode-array advantage in UV-Visible spectroscopy", Editorial Hewlett-Packard Company, Netherlands, (1988).
41. Rao, R.N.C., "Espectroscopía ultravioleta y visible", 1ª Edición española, Editorial Alhambra, S.A., España, (1970).
42. Skoog, D.A. y West, D.M., "Análisis Instrumental", 2ª Edición, Editorial Mc Graw Hill, México, (1989).
43. Sumner, B. J., J. Biol. Chem., 5-9 (1921).
44. Sumner, B. J., J. Biol. Chem., 287-290, (1924).
45. Sumner, B. J., J. Biol. Chem., 393-395, (1925).
46. Sumner, J. B. y Slesler, E.B., J. Biol.Chem., 333-336, (1944).
47. Bottle, R.T. y Gilbert, G.A., Chem, Ind., 1201-1202, (1954).
48. Bottle, R.T. y Gilbert, G.A., Analyst, 403-406, (1958).
49. Benedict, S. R., J. Biol.Chem., 101-117, (1907).
50. Miller, G.L., Anal. Chem., 426-428, (1959).
51. Brodersen, R. y Ricketts, H.T., J. Lab. Clin. Med., 1447-1456, (1949).

52. Bottle, R.T. y Gilbert, G.A., *Chem. Ind.*, 575-576, (1956).
53. Huntinton, S. y Shellman, J., *Anal. Biochem.*, Vol. 49, 527-533, (1972).
54. Oliver, R.W.A. y Stott, A., *J. Phys. E*, Vol.7, 275-280, (1974).
55. Meyer, K.H., Noelling, G., Bernfeld, P., *Helv. Chim. Acta*, Vol. XXXI, 103-105, (1948).
56. Noelling, G., Bernfeld, P., *Helv. Chim. Acta*, Vol. XII, 286-290, (1948).
57. Smith, G.N. y Stocker, C., *Arch. Biochem.*, Vol. 21, 95-102, (1949).
58. Meyer, K.H., van der Wik, A.J.A., y Chen-Piao, F., *Helv. Chim. Acta*, Vol. XXXVII, 1619-1627, (1954).
59. Bernfeld, P., *Methods Enzymol.*, Vol I, 149-158, (1955).
60. Fischer, E.H. y Stein, E.A., *Biochem. Prep.*, Vol 8, 27-33, (1961).
61. Robyt, J.F., y Whelan, W.J., *Anal Biochem.*, Vol. 45, 510-516, (1972).
62. Shinke, R. y cols., *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 42, 2393-2394, (1978).
63. Haissig, B.E. y Dockson, R.E., *Physiol. Plant.*, Vol. 54, 244-248, (1982).
64. Marsden, W.L. y cols., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Vol. 32, 1016-1032, (1982).
65. Leung, D.W.M. y Thorpe, T.A., *Phytochemistry*, Vol. 23, 2949-2950, (1984).
66. Robyt, J.F., y Whelan, W.J., *Proceedings of the Biochem. Soc.*, Vol. 65, 10P-11P, (1965).
67. Bernfeld, P., *Adv. Enzymol.*, Vol 12, 385, (1951).
68. Lehninger, A.L., "Bioquímica", 2ª Edición, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España, (1991).
69. Maravilla, J.M., "Bioquímica Humana", Editorial Reverté, Barcelona España, (1985).

70. Schottelius, B.A., "Fisiología", 18ª Edición, Nueva Editorial Interamericana, México, D.F., (1982)
71. Farias-Martínez, G., "Química Clínica", 9ª Edición, Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México, D.F., (1988).
72. Elliott, J. W., Walter, K.C., Penick, A.E., y Durham, F.W., J. Agr. Food Chem., Vol 8, 111, (1960).
73. Bradway, D.E., Moseman, R. y May, R., Bull. Environm. Contam., Vol 26, 520-523, (1981).
74. Pomeranz, Y., Meloan, C.E., "Food Analysis" Theory and Practice", 2ª Edición, Editorial AVI Book, Nueva York, (1987).