

DNS: una técnica de cuantificación de azúcares reductores

Utilizada en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE

Mtra. Aurora Martínez Trujillo*

Como ingenieros bioquímicos, irremediablemente llegamos a enfrentarnos con el montaje de técnicas que nos permitan analizar las muestras resultantes de los experimentos que realizamos, y poder así generar las conclusiones adecuadas a ese respecto. Una de las técnicas analíticas que aprendemos desde que estamos estudiando, es la desarrollada por Miller (1959). Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática.

Con el paso del tiempo y el vertiginoso desarrollo de la tecnología, después de casi 50 años, esta técnica ha sufrido algunas modificaciones, sin embargo, en esencia sigue siendo lo mismo. Cada laboratorio que la emplea, debe respetar la composición del reactivo DNS, aunque puede modificar las cantidades de reactivo y de muestra que empleará. Es importante recordar que siempre que hagamos una modificación, debemos comprobar que no se está afectando la linealidad del método. El presente trabajo describe detalladamente la técnica utilizada por el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE, para la cuantificación de azúcares reductores de las muestras generadas durante el desarrollo de los diversos proyectos de investigación que se trabajan.

Preparación del reactivo DNS

La composición de este reactivo, en g/l es: Es importante recalcar que, para po-

der disolver el ácido dini-trosalicílico, el hidróxido de sodio deberá estar completamente disuelto.

Una vez preparado, el reactivo deberá almacenarse en un recipiente color ámbar, a temperatura ambiente. Este reactivo dura aproximadamente un mes antes de mostrar precipitación de los reactivos o vestigios de descomposición. Debido a lo anterior, se recomienda hacer los cálculos adecuados para preparar sólo la cantidad requerida de reactivos y evitar el desperdicio.

Elaboración de la curva patrón

Según la ley de Lambert y Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del material que absorbe la luz, al que generalmente conocemos como analito (Rubinson y Rubinson, 2000). Siempre que se utiliza un método espectrofotométrico para cuantificar la concentración de analito presente en una muestra proble-



*Profesora investigadora del Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.

ma, es necesario relacionar la concentración de dicho analito con la cantidad de luz que absorbe del haz que le incide. Sabiendo que ésta es una relación aproximada-

Hidróxido de sodio granular	10
Ácido dinitrosalicílico	10
Sulfito de sodio anhidro	0.5
Fenol	0.2

mente lineal, lo más recomendable es preparar una solución estándar, con una concentración conocida de analito y hacer diversas diluciones de la misma, para poder obtener dicha relación y expresarla matemáticamente con la ayuda de la ecuación de la recta, $Y = mX + b$. En este caso, m será la pendiente de esta recta, b la ordenada al origen, X será la concentración de analito, y Y la absorbancia observada para cada concentración. La técnica de DNS cuantifica, como máximo, una concentración de azúcar de un mg/ml. Por lo tanto, la solución estándar deberá tener esa concentración.

A partir de esta solución se deberán realizar las diluciones correspondientes para construir una curva patrón, con la que se determinará la concentración del analito en la muestra problema, a partir de la ecuación de la recta antes mencionada. Las diluciones que servirán para la construcción de la curva deberán realizarse por duplicado, a fin de construir la curva con los promedios de las dos lecturas obtenidas por cada dilución. Además, deberá indicarse dentro de la gráfica la desviación estándar de las lecturas, para poder así validar la precisión en el trabajo del analista. Por tal razón, cada vez que se prepare el reactivo DNS es necesario construir una curva patrón, con la que se cuantificará el analito de las muestras tratadas con ese reactivo en específico.

Es importante mencionar que, si se tiene la sospecha de que la muestra problema posee una concentración mayor a un mg/ml, será necesario realizar una dilución de la misma, previa a la determinación, para asegurar que las lecturas podrán ser interpoladas en la curva patrón.

Reacción del azúcar con el DNS

Todas las muestras, tanto las que componen a la curva patrón como las que constituyen el problema, deberán tratarse utilizando el procedimiento que se describe a continuación:

Paso 1. Se deberá tener un ml total de muestra. Cuando se requiera de una dilución, se pondrá una cantidad ade-

cuada (menor a un ml) de la muestra que contiene el azúcar, y se completará a un ml utilizando agua destilada. De tal forma que, si se utilizan 0.5 ml de muestra, se deberá agregar 0.5 ml de agua, para completar a un ml.

Paso 2. Una vez completado el volumen, se agregarán tres ml del reactivo DNS y se someterán a ebullición durante cinco minutos. Los tubos se podrán enfriar al chorro del agua o bien podrán dejarse enfriar por sí solos hasta que alcancen la temperatura ambiente.

Paso 3. Se deberán agregar seis ml de agua, para completar un volumen final de 10 ml, y se agitarán en el vórtex.

Paso 4. Los tubos deberán leerse a 550 nm, calibrando con el blanco, el cual contiene todos los reactivos, excepto el problema. Es decir, contiene un ml de agua, tres ml de DNS y seis ml de agua.

Se propone un ejemplo

En el Laboratorio de Catálisis Enzimática se montó una práctica en la que se requería conocer el comportamiento de una levadura durante una fermentación aerobia, con respecto a su crecimiento y consumo de sustrato. El azúcar utilizado en el medio de cultivo fue glucosa, en una concentración de dos g/l. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se analizó la cantidad de azúcar presente.

Lo primero que se elaboró fue la curva patrón, para ello se preparó una solución de glucosa anhidra con una concentración de cuatro mg/ml, y por duplicado se hicieron las diluciones indicadas en la tabla 1.

A cada uno de estos tubos se les agregó tres ml del reactivo DNS y se sometieron a ebullición durante cinco minutos. Cuando los tubos alcanzaron la temperatura ambiente, se les agregó seis ml de agua y se leyeron en el espectro a 550 nm. La figura 1 nos muestra la relación lineal que existe entre la concentración de la glucosa en las muestras y la absorbancia obtenida. Como puede observarse, la gráfica es lineal en todo el rango probado, y la desviación estándar es pequeña en cada concentración, lo que nos indica un buen trabajo del analista.

Tubo	Solución patrón (ml)	Agua (ml)	Concentración de glucosa (mg/ml)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

Tabla 1. Preparación de la curva patrón para cuantificación de azúcares utilizando el reactivo DNS

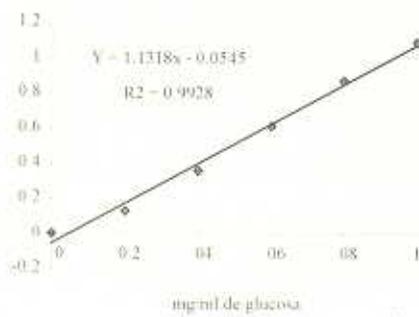


Figura 1. Curva patrón de glucosa

Debido a la concentración de glucosa en el medio de cultivo, fue necesario hacer una dilución 1:10 de las muestras tomadas, antes de determinarles su contenido de azúcar. Para ello se tomó un ml de la muestra y se agregó 0.9 ml de agua, para completar un ml. Una vez hecha la dilución, a cada muestra se añadió el DNS (tres ml). Los tubos se dejaron en ebullición durante cinco minutos, inmediatamente se dejaron enfriar para agregarles seis ml de agua, completando así el volumen a 10 ml. Estos tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 550 nm, calibrando el equipo con un blanco, preparado con todos los reactivos, excepto el problema.

La tabla 2 muestra las lecturas obtenidas después del tratamiento con DNS.

Tiempo (h)	Lectura 1	Lectura 2
0	0.444	0.385
2	0.355	0.387
4	0.323	0.315
6	0.298	0.275
8	0.256	0.262
10	0.243	0.256
22	0.131	0.163
24	0.102	0.105
26	0.014	0.015
28	0.013	0.017

Tabla 2. Lecturas de las muestras de azúcar de la cinética

Las lecturas obtenidas al analizar las muestras en el espectro (Abs), se sustituyeron en la siguiente ecuación:

$$X = \frac{Y - b}{m} = \frac{\text{Abs} + 0.0545}{1.1318}$$

Con esta ecuación, se tenía la cantidad de azúcar, en g/l. Considerando la dilución, era necesario multiplicar por 10 todos los resultados, y así se obtuvo la concentración de glucosa en cada tiempo de la fermentación. La tabla 3 muestra la concentración por cada lectura, así como los promedios y la desviación estándar de los azúcares.

Al graficar el promedio de las lecturas (Figura 2), observamos el consumo de sustrato de la levadura durante la fermentación.

Tiempo	Azúcares 1 (g/l)	Azúcares 2 (g/l)	Azúcares promedio (g/l)	Desviación estándar
0	4.404	3.887	4.146	0.365
2	3.618	3.905	3.761	0.203
4	3.339	3.264	3.302	0.053
6	3.118	2.911	3.015	0.146
8	2.750	2.801	2.776	0.036
10	2.632	2.743	2.688	0.078
22	1.643	1.926	1.784	0.199
24	1.389	1.412	1.400	0.016
26	0.610	0.609	0.610	0.0006
28	0.602	0.636	0.619	0.024

Tabla 3. Cálculos de la glucosa contenida en el medio de cultivo a diferentes tiempos de la cinética

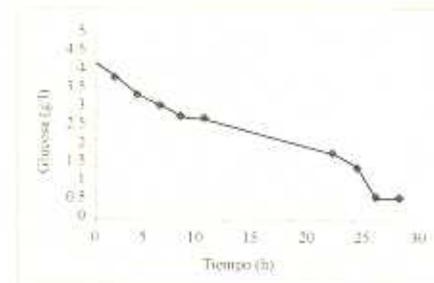


Figura 2. Cinética del consumo de sustrato de *Saccharomyces cerevisiae* durante una fermentación aerobia

Agradecimientos

A los alumnos: María del Carmen Domínguez Reyes, Martha Elena Escalona Domínguez, Noemí Negrete Valenzuela, Ernesto Rocha López y Nancy Aurora Rosales Toledo, estudiantes del sexto semestre de Ingeniería Bioquímica, quienes participaron en el desarrollo del trabajo que se presentó como ejemplo en este artículo.

Bibliografía

- Miller, G. L. 1959. "Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.*, Vol. 31, No. 3, 426-428.
- Rubinson, J. F. y Rubinson, K. A., 2000, *Química Analítica Contemporánea*, Edit. Prentice Hall Hispanoamericana, 1ª edición, México, D. F., pp. 331-333.