Naturaleza y TECNOLOGÍA
Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

EVALUACIÓN DEL USO DE NUEVOS AGENTES DERIVATIZANTES PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Karla A. Villegas Vázquez [a], C. Denisse Colecio Ramírez [a], Michelle Romero Hernández [a], Alan A. González Ibarra [b], Missael A. Arroyo Negrete [a], Eunice Yáñez Barrientos [a,*]

[a] Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Cerro de la Venada s/n, Col. Pueblito de Rocha, CP 36040. Guanajuato, Gto., México.

[b] Department of Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Maria Curie Skłodowska University, ul. 8 Akademicka 19, 20-034, Lublin, Poland

Resumen

La cuantificación de azúcares reductores en matrices complejas sigue siendo un reto debido a las limitaciones de métodos espectrofotométricos ampliamente utilizados, como el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). En este trabajo se evaluó un procedimiento espectrofotométrico basado en la derivatización de azúcares mediante aminación reductiva con diferentes aminas aromáticas y heteroaromáticas, incluyendo ácido p-aminobenzoico (PABA), ácido antranílico (AA) y 3-aminopiridina (3AP). Entre los derivatizantes evaluados, el PABA presentó la respuesta analítica más favorable bajo las condiciones de reacción estudiadas. El procedimiento basado en PABA se aplicó a la determinación de azúcares reductores en muestras de mosto de cerveza y fue comparado con el método DNS, así como con cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV). El procedimiento con PABA presentó una respuesta lineal con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9989$, con un intervalo lineal de 0.21 a 6.75 mg mL^{-1} (0.781 a 25.0 mM de extremos reductores) correspondiente a una mezcla equimolar de glucosa–maltosa. En el análisis de muestras reales, los resultados obtenidos mediante el método PABA fueron más próximos a los obtenidos mediante HPLC-UV que los obtenidos mediante el método DNS. Asimismo, los procedimientos PABA y HPLC-UV presentaron intervalos de recuperación similares de 75.3–125.5 % y 77.6–123.5 %, respectivamente, mientras que DNS presentó recuperaciones menores de 54.7–76.2 %. En conjunto, estos resultados respaldan la factibilidad del uso de PABA para la determinación espectrofotométrica de azúcares reductores en matrices complejas, aunque el procedimiento requiere optimización y validación adicionales.

Palabras clave: azúcares reductores, aminación reductiva, PABA, DNS, HPLC-UV.

EVALUATION OF THE USE OF NEW DERIVATIZATION AGENTS FOR THE DETERMINATION OF SUGARS USING SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

Abstract

The development of new analytical methodologies for the rapid and accurate quantification of reducing sugars in complex matrices is necessary due to the limitations of established spectrophotometric methods, such as the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. In this study, a spectrophotometric method was developed based on the derivatization of sugars via reductive amination with various aromatic and heteroaromatic amines, including p-aminobenzoic acid (PABA), anthranilic acid (AA), and 3-aminopyridine (3AP). Among the derivatizing agents evaluated, PABA exhibited a favorable analytical response under the reaction conditions studied. The developed methodology was applied to the determination of reducing sugars in beer wort samples and was compared with the DNS method, as well as with high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). The PABA method exhibited high linearity $R^2 = 0.9989$, with a linear range of 0.21 to 6.75 mg mL^{-1} (0.781 to 25.0 mM of reducing ends) corresponding to an equimolar mixture of glucose and maltose. In the analysis of real samples, the results obtained using the PABA method showed greater agreement with HPLC-UV than those obtained using the DNS method. Furthermore, PABA and HPLC-UV exhibited similar recovery ranges of 75.3–125.5% and 77.6–123.5%, respectively, while DNS showed lower recoveries of 54.7–76.2%. These results support the feasibility of using PABA for the spectrophotometric determination of reducing sugars in complex matrices, although further optimization and analytical validation are required.

Keywords: reducing sugars, reductive amination, PABA, DNS, HPLC-UV.

1. Introducción

Los carbohidratos, también llamados sacáridos o azúcares, son algunos de los compuestos orgánicos más abundantes en los alimentos, y tienen un papel central en el metabolismo. Una forma habitual de clasificar los carbohidratos es de acuerdo con su grado de polimerización (DP), es decir, con el número de unidades monoméricas que los componen y el tipo de enlaces glucosídicos que los unen. De acuerdo con este criterio, se distinguen azúcares simples (monosacáridos y disacáridos, DP 1-2), oligosacáridos (DP 3-9), polisacáridos (DP ≥ 10) y nucleótidos (Cummings & Stephen, 2007). Los azúcares constituyen una de las principales fuentes de carbono y energía en los sistemas biológicos y participan en numerosos procesos metabólicos, industriales y biotecnológicos.

En particular, la cuantificación de azúcares reductores resulta relevante, debido a que su concentración puede reflejar el consumo, la formación o la transformación de carbohidratos en diferentes sistemas. Ejemplo de ello son los monosacáridos como la glucosa y la fructosa, así como también algunos disacáridos como la maltosa y la lactosa. Estos azúcares contienen en su estructura un carbono anomérico, el cual contiene un grupo carbonilo libre (aldehído o cetona) capaz de participar en reacciones químicas como la aminación reductiva.

La determinación es importante en el análisis de alimentos, el seguimiento de procesos fermentativos, el monitoreo del metabolismo microbiano en medios de cultivo, la evaluación de la actividad de los glucósidos hidrolasas y el análisis de muestras biológicas (Boshagh, 2021; Coddens et al., 2026). Para la determinación del perfil de azúcares, distintas técnicas analíticas han sido empleadas, siendo las técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de gases (GC) las más utilizadas (Boshagh, 2021). Sin embargo, a menudo es necesario llevar a cabo procedimientos de derivatización para modificar su retención cromatográfica e incorporar grupos cromóforos que permitan su detección mediante HPLC-UV (Alyuruk et al., 2021; Fischer et al., 2003; Meyer et al., 2001), así como generar compuestos volátiles y térmicamente estables para GC (Gao et al., 2011). Si bien estas técnicas cromatográficas proveen buena separación, detección y cuantificación de los derivados de azúcares, resultan en un consumo de tiempo

considerable para análisis rápidos, cuando no se requiere conocer el perfil individual de los azúcares, sino estimar su concentración global como azúcares reductores (Boshagh, 2021).

En este sentido, distintas técnicas espectrofotométricas y colorimétricas se utilizan habitualmente para la determinación de azúcares reductores. Entre ellas, el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es ampliamente utilizado por su fácil aplicación (Boshagh, 2021; Coddens et al., 2026; Wood et al., 2012). Este método se basa en la medición del cambio de color, a 540 nm, causado por la reducción del DNS en presencia de compuestos de carácter reductor, como la glucosa y la maltosa. Es decir, el método DNS ofrece una visión general del poder reductor del medio, siendo sensible a interferencias de matriz (Deshavath et al., 2020) causada por la presencia de otros reductores como los aminoácidos y polifenoles (Nyambe-Silavwe et al., 2015; Teixeira et al., 2012). En este sentido, surge la necesidad de contar con nuevos métodos espectrofotométricos capaces de analizar azúcares reductores en matrices complejas (Boshagh, 2021; Coddens et al., 2026).

La aminación reductiva de azúcares se ha empleado como un método de derivatización precolumna para su análisis mediante HPLC con detección UV o por fluorescencia. Esta reacción implica la condensación de la forma de anillo abierto del azúcar con una amina (generalmente aromática) lo que genera una base de Schiff. Debido a que este intermediario es inestable, debe reducirse para formar la amina secundaria correspondiente (Huang et al., 2000; Kakehi et al., 1999). Aunque se han empleado diferentes aminas aromáticas para este propósito (Bowman & Zaia, 2007; Fischer et al., 2003; Meyer et al., 2001) su aplicación en métodos espectrofotométricos directos puede verse limitada por la superposición de las contribuciones espectrales del agente derivatizante, los intermediarios y el producto de reacción (Cerdà et al., 2022).

En este estudio presentamos la evaluación de la factibilidad del uso de varias aminas en la determinación de azúcares reductores por espectrofotometría UV-Vis tras una derivatización por aminación reductiva, así como su posible aplicación en el desarrollo de metodologías HPLC.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y soluciones stock

Los distintos azúcares, las aminas primarias, AA, PABA, 3AP, ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico, sulfanilamida, ácido sulfanílico, 4-aminoantipiridina, así como el borohidruro de sodio ($NaBH_4$) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los disolventes utilizados fueron grado HPLC. El agua utilizada fue tipo Milli-Q.

Las soluciones madre de los diferentes azúcares fueron preparadas a una concentración de 50 mM disueltos en agua. Estas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

2.2 Instrumentación

La adquisición de los espectros de absorción se llevó a cabo en un espectrofotómetro Cary 50, el cual fue operado por el software CaryWinUV, en un intervalo de 600 a 200 nm, con una velocidad de escaneo de 600 nm min^{-1}. En el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 controlado por el software ChemStation. El cromatógrafo estaba equipado con un inyector manual Rheodyne, una bomba cuaternaria G1311A, una línea de desgasificación G1322A, un horno de columna Perkin Elmer serie 200 y un detector de longitud de onda variable VWD G1314B. La separación de los distintos derivados se llevó a cabo en una columna Luna C8(2) 100 Å, 100 x 4.6 mm, 3 μm a 25 °C. El volumen de inyección fue de 20 μL. Se utilizó una elución isocrática la cual se conformaba por ácido fórmico al 0.3% y acetonitrilo en una proporción 98:2 (v/v), a un flujo de 1.25 mL min^{-1}. Se utilizó 303 nm como longitud de onda para la detección.

2.3 Derivatización y evaluación UV

En la evaluación de la factibilidad de las distintas aminas primarias como agentes derivatizantes de azúcares reductores, se prepararon mezclas de reacción a un volumen final de 200 μL. En donde se añadieron 50 μL de la solución madre de glucosa 50 mM (9 mg mL^{-1}) a un tubo de centrífuga que contenía 140 μL de una solución del derivatizante a una concentración de 8.93 mM en metanol y 10 μL de ácido acético glacial. La mezcla presentó una relación molar azúcar:derivatizante de 2:1 y una composición final metanol:agua:ácido acético (70:25:5, v/v/v). Esta relación se empleó únicamente durante la evaluación inicial del comportamiento espectral, con el propósito de disminuir la contribución del derivatizante libre y facilitar la identificación

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

de las señales asociadas al derivado y a los intermediarios de reacción. Para la construcción de la curva de calibración y el análisis de las muestras reales, se empleó un exceso molar del derivatizante respecto a los azúcares.

La mezcla se incubó a 70 °C a diferentes tiempos. Posteriormente, los disolventes se evaporaron durante 20 min, a 60 °C, bajo una corriente de nitrógeno. La imina formada se redujo mediante la adición de 200 μL de una solución de $NaBH_4$ de 0.15 M (Harvey, 2000; Meyer et al., 2001) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, la solución resultante se diluyó con una solución acuosa de ácido fórmico al 5 % para su análisis espectrofotométrico, empleando un factor de dilución final de 42.5. Para el análisis cromatográfico, la solución se diluyó con la fase móvil, empleando un factor de dilución final de 125.

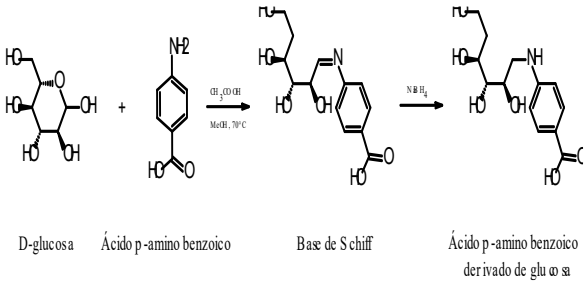


Figura 1 Esquema de la derivatización de glucosa con ácido p-aminobenzoico (PABA) mediante aminación reductiva.

2.4 Determinación de azúcares reductores mediante DNS

En la determinación de azúcares reductores por el método de DNS se utilizó la metodología descrita por Wood con modificaciones (Wood et al., 2012). Brevemente, el reactivo se preparó pesando 0.25 g de DNS, 1.60 g de hidróxido de sodio y 7.50 g de tartrato de sodio y potasio, y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua. Las muestras se diluyeron con agua en una proporción 1:10 (v/v), una alícuota de 30 μL fue añadida a un tubo de microcentrífuga que contenía 120 μL del reactivo DNS. La mezcla se incubó a 100 °C durante una hora y se dejó a enfriar durante 10 minutos. Finalmente, la mezcla se llevó a un volumen final de 1.5 mL. La absorbancia se midió a 540 nm. Los análisis se realizaron por triplicado.

2.5 Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración fue preparada utilizando una solución madre de mezcla equimolar de glucosa-maltosa a 50 mM de extremos reductores, a partir de esta, se realizaron diluciones seriadas 1:2 para obtener concentraciones de 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0 y 50.0 mM. Estas concentraciones correspondieron a una concentración total de azúcares de 0.0527 a

ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

13.5 mg mL^{-1} para una solución de glucosa y maltosa.

La identificación de glucosa y maltosa en HPLC-UV se realizó mediante comparación de los tiempos de retención con estándares individuales analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. La cuantificación se efectuó mediante calibración externa utilizando curvas individuales para cada analito. Para glucosa se emplearon ocho niveles de concentración entre 0.0352 y 4.50 mg mL^{-1}, mientras que para maltosa se utilizaron nueve niveles entre 0.0352 y 9.00 mg mL^{-1}

3. Resultados

3.1 Evaluación espectrofotométrica de los agentes derivatizantes

Para evaluar la factibilidad de las distintas aminas como agentes derivatizantes de azúcares reductores, se utilizó glucosa como azúcar modelo. Generalmente, en los métodos cromatográficos, esta clase de derivatizaciones se realizan habitualmente con un exceso de derivatizante con el propósito de favorecer la generación de derivados (Alyuruk et al., 2021; Fischer et al., 2003). Sin embargo, para una determinación espectrofotométrica, el exceso de derivatizante podría aumentar la sobreposición espectral, especialmente si la reacción es incompleta (Cerdà et al., 2022). De este modo, se utilizó un exceso de glucosa y el procedimiento de reacción se dividió en dos etapas, como se muestra en la Figura 1. De esta manera fue posible la exploración de la sobreposición espectral causada por el derivatizante y las iminas formadas antes de la etapa de reducción, así como identificar la región espectral adecuada para la detección de los derivados.

En la Figura 2, se muestran los espectros de absorción adquiridos para el AA, PABA y el 3AP durante las distintas etapas de reacción. Entre los derivatizantes evaluados, AA, PABA y 3AP produjeron los mayores desplazamientos de las bandas de absorción hacia longitudes de onda mayores y presentaron bandas bien definidas, con máximos de absorción de 303 nm para el derivado de PABA, 355 nm para el derivado de AA y 330 nm para el derivado de 3AP. Además, fue posible la identificación de regiones espectrales con menor superposición entre el derivatizante, los intermediarios y los derivados de glucosa.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

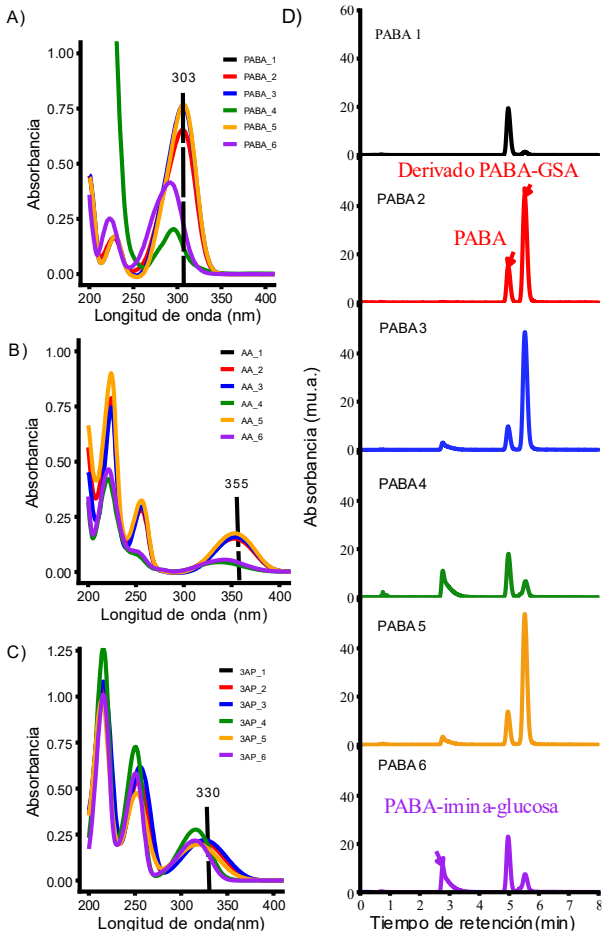


Figura 2 Espectros UV-Vis obtenidos durante las diferentes etapas de derivatización de glucosa con (A) PABA, (B) AA y (C) 3AP. (D) Cromatogramas HPLC-UV obtenidos para las distintas condiciones de reacción con PABA. Condiciones evaluadas: (1) blanco del derivatizante, 2 h, reducción; (2) glucosa, 1 h, reducción; (3) glucosa, 2 h, reducción; (4) glucosa, 2 h, sin reducción; (5) glucosa, sin calentamiento, reducción; y (6) glucosa, sin calentamiento ni reducción.

El análisis cromatográfico de las soluciones de distintas condiciones de reacción con PABA (Figura 2D) evidenció la formación de una señal atribuida al derivado de glucosa y permitió la formación de la imina correspondiente en la primera etapa de la reacción.

El análisis de los cromatogramas obtenidos bajo las distintas condiciones evaluadas mostró que una incubación a 70 °C por una hora fue suficiente para promover la reacción hacia la formación del derivado de glucosa. Asimismo, la comparación entre las condiciones con y sin adición de $NaBH_4$ evidenció la importancia de controlar la etapa de reducción para obtener predominantemente el derivado de azúcar reducido. En el análisis de la condición 5, la muestra que no fue sometida a la etapa de incubación, pero si a la etapa de reducción, generó una señal analítica considerable. Este resultado sugiere que el calentamiento durante la evaporación de los disolventes contribuyó a la formación del derivado de glucosa y de los intermediarios de reacción. Del mismo modo, para la condición 6, en la cual no se realizó ninguna de las dos etapas de reacción, se identificó una señal atribuible al intermediario de reacción. Se identificó una señal atribuible al intermediario de reacción. De esta manera, estos resultados indican que el tiempo y la temperatura de incubación, así como las condiciones de evaporación y reducción, deben controlarse y ser

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

optimizadas para disminuir el tiempo total del procedimiento.

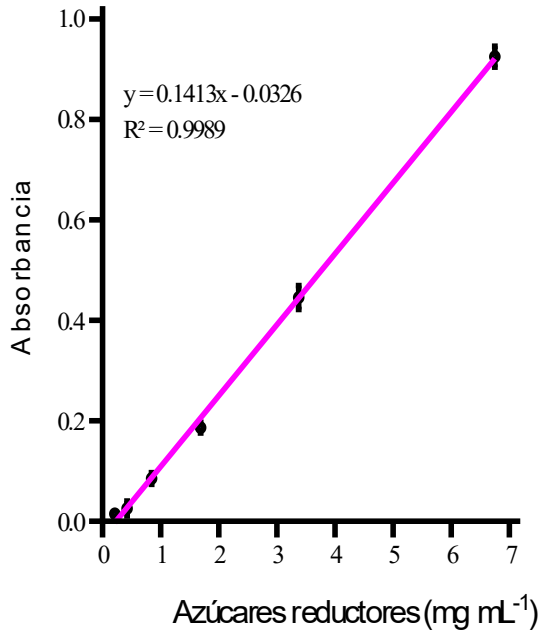


Figura 3 Curva de calibración espectrofotométrica obtenida a 325 nm mediante el procedimiento basado en PABA para una mezcla equimolar de glucosa–maltosa. Los puntos representan la media de tres determinaciones (n = 3), las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Las respuestas de glucosa y maltosa fueron evaluadas individualmente bajo las mismas condiciones experimentales, obteniéndose pendientes de 0.0340 y 0.0408 Abs mM^{-1}, respectivamente, lo que indica respuestas molares comparables bajo las condiciones estudiadas. De esta manera, para evaluar la linealidad de la respuesta espectral en la región sin interferencia determinada previamente, se preparó una curva de calibración de una mezcla equimolar de glucosa y maltosa en el intervalo de 0.195 a 50 mM de extremos reductores, equivalente a una concentración total de azúcares de 0.0527 a 13.5 mg mL^{-1}. Se evaluó la pendiente y el coeficiente de determinación de las curvas obtenidas entre 310 y 330 nm, para seleccionar la longitud de onda adecuada para llevar a cabo mediciones a punto fijo. La longitud de onda de 325 nm proporcionó una respuesta adecuada para la cuantificación. La curva de calibración correspondiente se muestra en la Figura 3, mientras que los principales parámetros de desempeño analítico del procedimiento se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 Parámetros analíticos evaluados para el procedimiento espectrofotométrico utilizando PABA como agente derivatizante.

Parámetro	**Resultado**
Intervalo lineal	0.21–6.75 mg mL^{-1}
R^2	0.9989
LOD	0.13 mg mL^{-1}
LOQ	0.38 mg mL^{-1}
% RSD, n = 3	2.34–21.46 %
Recuperación	75.3–125.5 %

LOD, límite de detección, LOQ, límite de cuantificación.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

3.2 Análisis de muestras reales

Las curvas de calibración individuales empleadas para la cuantificación mediante HPLC-UV presentaron coeficientes de determinación de $R^2 = 0.9964$ para glucosa y $R^2 = 0.9960$ para maltosa.

Se analizaron ocho muestras de mosto correspondientes a dos series, denominadas E0–E3 y B0–B3. En el análisis cromatográfico de las muestras se observó que estaban constituidas principalmente de maltosa y contenían glucosa en distintas proporciones. De igual manera, pudo observarse un tercer pico cromatográfico correspondiente a un compuesto no identificado. Debido a que no se contó con el estándar correspondiente, su concentración aparente se estimó utilizando la curva de calibración de glucosa y se expresó como equivalentes de glucosa. Estos valores deben interpretarse únicamente como una estimación semicuantitativa de la respuesta del compuesto no identificado y no como una concentración absoluta ni como evidencia de su identificación como glucosa.

El compuesto no identificado representó aproximadamente 3–4% del total de azúcares reductores y su contribución aumentó en las series de muestras B (1–3) y E (1–3) hasta un 10–13%. En general la serie B presentó concentraciones considerablemente mayores que la serie E, de manera consistentes con lo observado en los tres métodos. El panel superior de la Figura 4 muestra los resultados obtenidos para las muestras B (0–3). La muestra B0 presentó determinaciones similares en un rango de 40 a 45 mg mL^{-1} para los tres métodos. Las muestras B1–B3 presentaron concentraciones mayores en el rango de 100–160 mg mL^{-1}; el método de DNS mostró valores superiores y una mayor variabilidad en las mediciones en comparación con los métodos HPLC y PABA. Por otro lado, las determinaciones mediante el método PABA mostraron mayor concordancia con lo determinado por HPLC-UV. Para la serie E también se observó una diferencia importante entre los tres métodos. El método HPLC presentó valores entre 3–7 mg mL^{-1}, en tanto el método PABA arrojó concentraciones de 5–13 mg mL^{-1} y DNS de 6–18 mg mL^{-1}. En general, ambos métodos espectrofotométricos proporcionaron valores superiores a los obtenidos mediante HPLC-UV para las muestras reales, aunque el método DNS presentó una mayor discrepancia, lo que sugiere que la composición de las muestras influyó

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

claramente en la respuesta de los métodos (Deshavath et al., 2020; Teixeira et al., 2012).

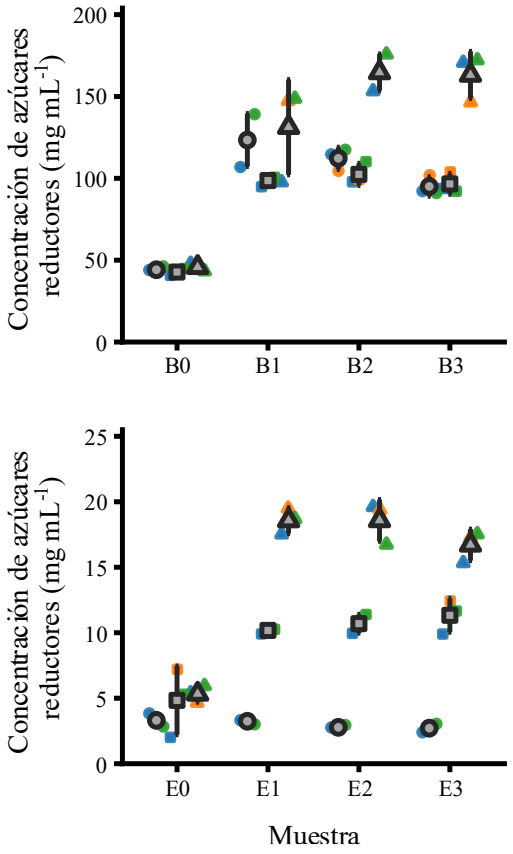


Figura 4 Concentración de azúcares reductores determinada en las muestras de mosto B0–B3 y E0–E3 mediante HPLC-UV, PABA y DNS. Los símbolos representan la media de tres determinaciones (n = 3), los puntos individuales corresponden a cada réplica y las barras de error representan la desviación estándar. HPLC-UV (○), PABA (□) y DNS (△).

El incremento relativo de la tercera señal cromatográfica del posible derivado de azúcar no identificado coincidió con una mayor variabilidad entre los métodos DNS y HPLC. Sin embargo, aunque se sugiere que este efecto se encuentra relacionado con la composición de azúcares, con los resultados actuales, las diferencias encontradas entre los métodos espectrofotométricos no pueden atribuirse directamente al compuesto no identificado, ya que no se puede descartar la presencia de otros compuestos reductores en las muestras.

Al aplicarse a muestras de mosto, el procedimiento basado en PABA mostró mayor concordancia con los resultados obtenidos mediante HPLC-UV que el método DNS, tendencia respaldada por el análisis estadístico. Para esto se utilizó una solución equimolar de glucosa-maltosa a una concentración de 1.35 mg mL^{-1}, correspondientes a 5.0 mM de extremos reductores. Esta solución se mezcló con la matriz en una proporción volumétrica de 40:60 (muestra:estándar), obteniéndose una concentración final adicionada de 0.810 mg mL^{-1} equivalentes a 3.0 mM de extremos reductores. Los valores medios, la desviación estándar y el %RSD correspondientes a las tres determinaciones realizadas mediante cada procedimiento se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 Concentración de azúcares reductores determinada mediante HPLC-UV, PABA y DNS en las muestras de mosto evaluadas (n = 3).

Muestra	HPLC-UV (mg mL⁻¹, media ± DE)	%RSD	PABA (mg mL⁻¹, media ± DE)	%RSD	DNS (mg mL⁻¹, media ± DE)	%RSD
B0	44.2 ± 2.0	4.4	42.8 ± 2.1	4.8	45.7 ± 2.3	5.0
B1	123 ± 16	13.1	98.6 ± 3.3	3.3	131 ± 29	22.2
B2	112.2 ± 6.8	6.0	102.4 ± 6.8	6.6	165 ± 11	6.8
B3	95.1 ± 6.0	6.3	96.6 ± 6.4	6.6	163 ± 14	8.9
E0	3.31 ± 0.51	15.3	4.8 ± 2.6	54.3	5.33 ± 0.64	11.9
E1	3.24 ± 0.20	6.2	10.18 ± 0.24	2.3	18.57 ± 0.99	5.4
E2	2.77 ± 0.16	5.9	10.69 ± 0.72	6.8	18.6 ± 1.6	8.6
E3	2.71 ± 0.32	11.9	11.3 ± 1.3	11.4	16.7 ± 1.2	7.2

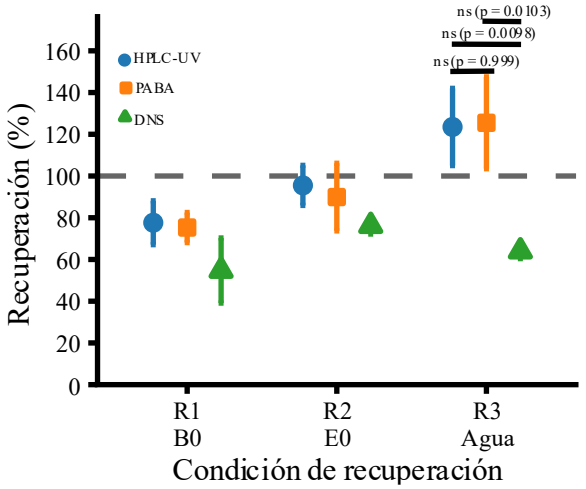


Figura 5 Porcentaje de recuperación de una mezcla equimolar de glucosa–maltosa adicionada a una concentración final de 0.810 mg mL⁻¹ (3.0 mM de extremos reductores) en las condiciones R1 (B0), R2 (E0) y R3 (agua). Los símbolos representan la media de tres determinaciones (n = 3) y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Las diferencias entre procedimientos dentro de cada condición fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía seguido

La Figura 5 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para los tres métodos. Las diferencias entre los procedimientos fueron evaluadas estadísticamente y los valores de significancia correspondientes se indican en la figura. Se observó que los métodos HPLC-UV y PABA presentaron mayor concordancia en los porcentajes de recuperación evaluados, mientras que DNS mostró valores de recuperación menores en las tres condiciones.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los procedimientos para R1 y R2 ($p > 0.05$). En R3 se observaron diferencias significativas entre los métodos (ANOVA, $p = 0.0062$); el análisis post hoc de Tukey mostró diferencias entre DNS y HPLC-UV ($p = 0.0098$) y entre DNS y PABA

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

(p = 0.0103), mientras que PABA y HPLC-UV no mostraron diferencias significativas (p = 0.9986).

Los resultados sugieren diferencias en la influencia de la matriz sobre la respuesta de los procedimientos evaluados, observándose una mayor concordancia entre PABA y HPLC-UV que con DNS bajo las condiciones estudiadas (Coddens et al., 2026; Deshavath et al., 2020). Sin embargo, esta sobrestimación no se observó en los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras B0 y E0. De esta manera, el procedimiento espectrofotométrico desarrollado representa una alternativa potencial para el análisis de azúcares reductores en matrices complejas, al basarse en la medición de la señal del cromóforo incorporado al grupo carbonilo del extremo reductor de los azúcares, en lugar de medir la capacidad reductora global del medio, como ocurre con el método DNS (Meyer et al., 2001; Coddens et al., 2026).

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran la factibilidad del uso de aminas aromáticas y heteroaromáticas como agentes derivatizantes para la determinación espectrofotométrica de azúcares reductores mediante aminación reductiva. Entre los compuestos evaluados, el PABA presentó el comportamiento espectral más favorable bajo las condiciones estudiadas, lo que permitió desarrollar un procedimiento espectrofotométrico con respuesta lineal y aplicarlo al análisis de muestras de mosto.

Al aplicarse a muestras de mosto, el procedimiento basado en PABA mostró mayor concordancia con los resultados obtenidos mediante HPLC-UV que el método DNS, tendencia respaldada por el análisis estadístico y por los ensayos preliminares de recuperación. En conjunto, estos resultados respaldan la factibilidad de esta estrategia espectrofotométrica, aunque todavía será necesario optimizar las condiciones de derivatización y evaluar con mayor profundidad su desempeño analítico.

Referencias bibliográficas

Alyuruk, H., Kontas, A., & Altay, O. (2021). A comparative study of two HPLC methods for dissolved monosaccharide analysis in seawater using 2-amino benzamide and 2-amino pyrazine as pre-column derivatization reagents. *TALANTA*, *234*, Article 122629. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122629

Boshagh, F. (2021). Measurement methods of carbohydrates in dark fermentative hydrogen production- A review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY*, *46*(47), 24028-24050. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.04.204

Bowman, M., & Zaia, J. (2007). Tags for the stable isotopic labeling of carbohydrates and quantitative analysis by mass spectrometry. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, *79*(15), 5777-5784. https://doi.org/10.1021/ac070581b

Cerdà, V., Phansi, P., & Ferreira, S. (2022). From mono- to multicomponent methods in UV-VIS spectrophotometric and fluorimetric quantitative analysis e A review. *TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, *157*, Article 116772. https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116772

Coddens, L., De Schepper, C., Brijs, K., & Courtin, C. (2026). Comparative evaluation of DNS, PAHBAH, and BCA colourimetric assays for quantifying reducing sugars. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, *560*, Article 109770. https://doi.org/10.1016/j.carres.2025.109770

Cummings, J., & Stephen, A. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION*, *61*, S5-S18. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602936

Deshavath, N., Mukherjee, G., Goud, V., Veeranki, V., & Sastri, C. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, *156*, 180-185. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045

Fischer, K., Wacht, M., & Meyer, A. (2003). Simultaneous and sensitive HPLC determination of mono- and disaccharides, uronic acids, and amino sugars after derivatization by reductive amination. *ACTA HYDROCHIMICA ET HYDROBIOLOGICA*, *31*(2), 134-144. https://doi.org/10.1002/aheh.200300484

Gao, Q., Nilsson, U., Ilag, L., & Leck, C. (2011). Monosaccharide compositional analysis of marine polysaccharides by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, *399*(7), 2517-2529. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4638-z

Harvey, D. (2000). Electrospray mass spectrometry and fragmentation of N-linked

carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY*, *11*(10), 900-915. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00156-2

Huang, Z., Prickett, T., Potts, M., & Helm, R. (2000). The use of the 2-aminobenzoic acid tag for oligosaccharide gel electrophoresis. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, *328*(1), 77-83. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00045-8

Kakehi, K., Funakubo, T., Suzuki, S., Oda, Y., & Kitada, Y. (1999). 3-aminobenzamide and 3-aminobenzoic acid, tags for capillary electrophoresis of complex carbohydrates with laser-induced fluorescent detection. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, *863*(2), 205-218. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00978-4

Meyer, A., Raba, C., & Fischer, K. (2001). Ion-pair RP-HPLC determination of sugars, amino sugars, and uronic acids after derivatization with p-aminobenzoic acid. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, *73*(11), 2377-2382. https://doi.org/10.1021/ac001402s

Nyambe-Silavwe, H., Villa-Rodriguez, J., Ifie, I., Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J., & Williamson, G. (2015). Inhibition of human α-amylase by dietary polyphenols. *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS*, *19*, 723-732. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.003

Teixeira, R., da Silva, A., Ferreira-Leitao, V., & Bon, E. (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, *363*, 33-37. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.024

Wood, I., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I., & Waldron, K. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *BIOMASS & BIOENERGY*, *44*, 117-121. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003