

Práctica 2

Carbohidratos

Objetivo: que el estudiante refuerce los conocimientos adquiridos acerca de los carbohidratos mediante la demostración experimental de algunas de sus propiedades.

Fundamento

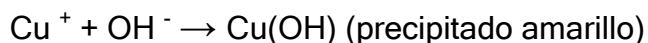
Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera. La mayoría pueden ser representados con la fórmula general $C_x(H_2O)_y$ por lo que son literalmente, hidratos de carbono. Gran parte de sus funciones biológicas dependen de esta estructura química tan particular y versátil. Ellos son componentes fundamentales de muchos alimentos y su degradación durante el proceso de digestión genera la energía necesaria para las funciones vitales del organismo. Cuando se encuentran combinados con otras biomoléculas, dan origen a moléculas más complejas cuyas funciones pueden ser estructurales o de soporte celular y tisular, de comunicación entre células, de reconocimiento o de señalización. Químicamente se definen como polihidroxialdehídos o polihidroxiacetonas cíclicas o sustancias que luego de hidrolizarse dan origen a los mismos. Un carbohidrato que no puede ser hidrolizado en uno más simple es llamado monosacárido. Los monosacáridos más comunes son la glucosa, la fructosa, la galactosa y la manosa. Un carbohidrato que puede ser hidrolizado en dos moléculas de monosacáridos es llamado disacárido. Los más importantes son la lactosa (presente en la leche), la sacarosa (presente en el azúcar común) y la maltosa. Por su parte, aquellos carbohidratos que pueden ser hidrolizados en varias moléculas de monosacáridos son llamados polisacáridos. Los más comunes son el almidón y la celulosa, este último es componente estructural de las plantas.

La determinación de glucosa es de importancia médica ya que niveles sanguíneos alterados pueden ser signo de una enfermedad metabólica común conocida como diabetes mellitus.

1. Prueba de Benedict

Algunos azúcares tienen la propiedad de oxidarse en presencia de agentes oxidantes suaves como el ion Fe^{3+} o Cu^{2+} . Esta característica radica en la presencia de un grupo carbonilo libre, el cual es oxidado y genera un grupo carboxilo. Por lo tanto, aquellos azúcares con un grupo carbonilo libre son llamados *azúcares reductores* y aquellos en los que el grupo carbonilo se encuentra combinado en unión glicosídica se conocen como *azúcares no reductores*. Existen varias reacciones químicas que permiten determinar si se está en presencia de un azúcar reductor o no. La prueba de Benedict es una de ellas y se basa precisamente en la reacción o no de un azúcar con el ion Cu^{2+} . El reactivo

de Benedict contiene soluciones de carbonato de sodio, sulfato de cobre, y citrato de sodio. El Na_2CO_3 confiere a la solución un pH alcalino necesario para que la reacción pueda llevarse a cabo. El citrato de sodio mantiene al ion Cu^{2+} en solución ya que tiene la propiedad de formar complejos coloreados poco ionizados con algunos de los metales pesados. Con el cobre produce un complejo de color azul. Si se le agrega al reactivo una solución de azúcar reductor y se calienta hasta llevar la mezcla a ebullición, el azúcar en solución alcalina a elevadas temperaturas se convertirá en D-gluconato y su ene-diol, rompiéndose luego en dos fragmentos altamente reductores, los cuales con sus electrones expuestos, reaccionarán con el Cu^{++} . Se obtiene entonces un azúcar oxidado y dos iones Cu^+ . Posteriormente el Cu^+ producido reacciona con los iones OH^- presentes en la solución para formar el hidróxido de cobre:



El hidróxido pierde agua



La aparición de un precipitado amarillo, anaranjado, o rojo ladrillo evidencia la presencia de un azúcar reductor.

Materiales y reactivos

-Reactivo de Benedict: consta de 3 soluciones:

Pesar 100 g de Na_2CO_3 anhidro y disolver en 200 ml de agua destilada hervida.

Pesar 173 g citrato de sodio y disolverlo en 200 ml de agua destilada hervida.

Pesar 17.3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y disolverlo en 300 ml de agua destilada hervida.

Mezclar las tres soluciones cuando estén frías. Aforar a 1 l con agua destilada hervida.

-Soluciones de carbohidratos 0.1 mol/l. Pesar la cantidad requerida de cada uno de los carbohidratos a ensayar y disolverlos en 100 ml de agua destilada. La solución de almidón se prepara al 1%: pesar 1 g de almidón y llevar a 100 ml con agua destilada caliente.

-1 gradilla con tubos de ensayo

-pipetas de varios volúmenes

-baño maría en ebullición

Procedimiento

Seleccione la pipeta más conveniente y deposite 2.5 ml de reactivo de Benedict en un tubo de ensayo mediano (los tubos de ensayo grandes se usan en la prueba de hidrólisis del almidón). Repita este paso en 6 tubos más. Luego, a cada tubo,

añada 6 gotas de una y solo una de las siguientes soluciones de carbohidratos: glucosa, galactosa, lactosa, xilosa, fructosa, sacarosa al 0.1M y almidón al 1% según el siguiente cuadro:

Nombre del tubo	Reactivo de Benedict (ml)	Carbohidrato (gotas)
Glucosa	2.5	6
Galactosa	2.5	6
Lactosa	2.5	6
Xilosa	2.5	6
Fructosa	2.5	6
Sacarosa	2.5	6
Almidón	2.5	6

Coloque los tubos en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. *Tenga cuidado de no quemarse.*

Observe cualquier cambio de color durante el calentamiento. Saque el tubo y póngalo en una gradilla y después de un corto tiempo observe si se ha formado un precipitado, el cual puede ser rojo, anaranjado o verdoso.

Resultados

1) Elabore un cuadro con los carbohidratos que utilizó en esta prueba, si se formó un precipitado y de qué color es el mismo.

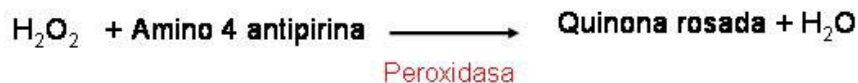
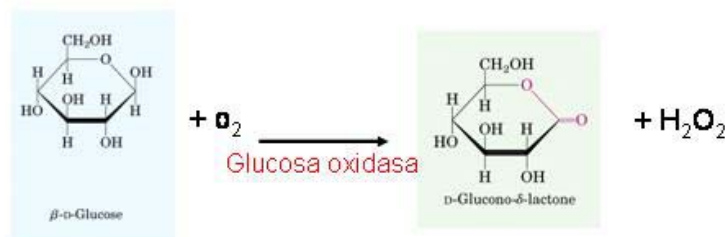
2) Concuerdan sus resultados con lo esperado teóricamente sobre carbohidratos reductores? Explique.

3) Qué otro reactivo se puede usar para análisis de azúcares reductores?

4) Por qué es necesario el citrato de sodio en el reactivo de Benedict?

2. Prueba cualitativa de glucosa oxidasa

Este método es utilizado hoy en día para la determinación y cuantificación de glucosa en sangre y orina y vino a reemplazar a otros como la prueba de Benedict, debido a su mayor especificidad y sensibilidad. La prueba se basa el uso de una enzima llamada glucosa oxidasa que reconoce específicamente a una de las formas anoméricas de la D-glucosa, la forma beta glucopiranosica. Esta enzima, en presencia de glucosa, oxígeno y un amortiguador de pH, genera gluconolactona y peróxido de hidrógeno.



El peróxido de hidrógeno es a su vez sustrato de otra enzima, la peroxidasa, la cual en presencia de fenol y una amina aromática (en nuestro caso, la amino-4-antipirina) genera un compuesto de color rosado y agua. Por lo tanto, cuando el reactivo vira de incoloro a rosado, se demuestra la presencia de glucosa en la muestra.

Materiales y reactivos

- 1 placa de aglutinación
- Solución de glucosa oxidasa/ peroxidasa: Contiene glucosa oxidasa, peroxidasa, amortiguador y amino 4 antipirina.
- Soluciones de carbohidratos 0.1M utilizados en la práctica de la prueba de Benedict y almidón al 1%.

Procedimiento

Coloque 3 gotas de solución de glucosa oxidasa/peroxidasa en siete depresiones de la placa de ensayos. Añada una gota de glucosa a una depresión, una gota de fructosa a otra, etc. Observe las depresiones *inmediatamente* y anote los resultados. Vuelva a observar las depresiones y revise si existe algún cambio.

Resultados

1) Qué coloración es una prueba positiva para la glucosa oxidasa?

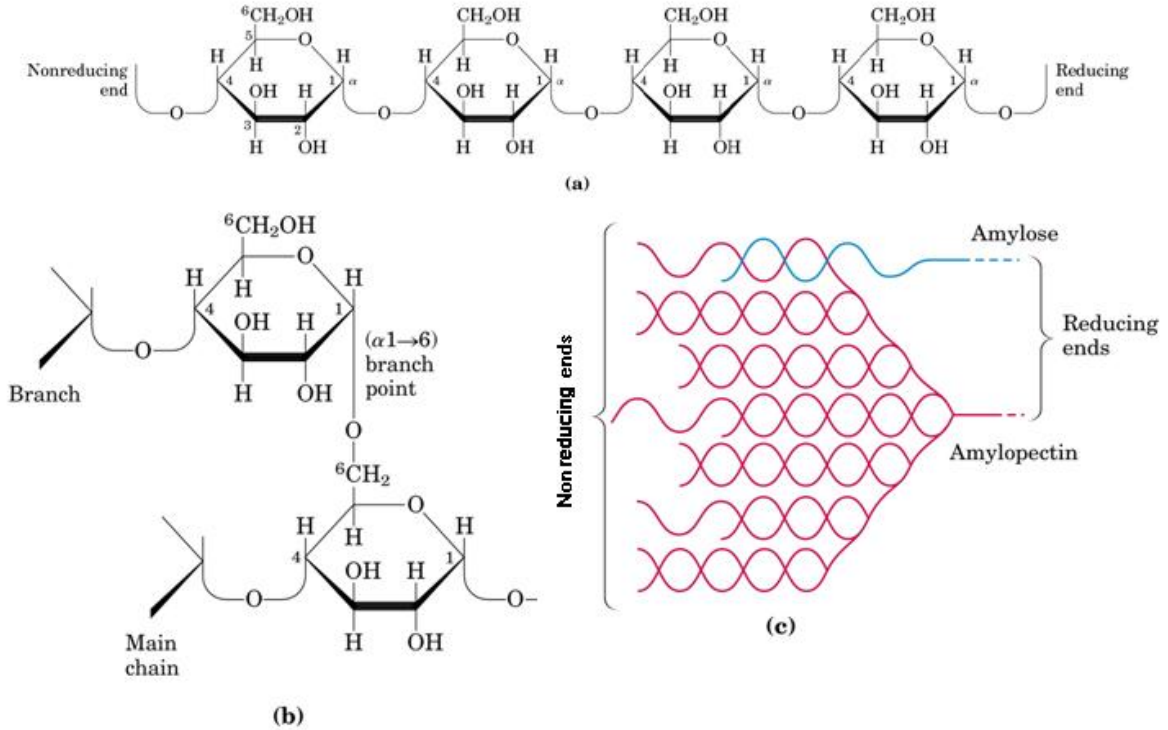
2) Porqué la prueba es específica para la determinación de glucosa?

3) Observó algún cambio luego de incubar por más tiempo las diferentes reacciones? Si es así, a qué cree usted que se debe este cambio?

3. Prueba de yodo para Almidón

El polisacárido almidón está constituido de dos polímeros, amilosa y amilopeptina. La amilosa está constituida de largas cadenas lineales de glucosa unidas en enlace glicosídico alfa 1,4 (Figura 1). Estas cadenas no poseen un tamaño determinado sino que pueden variar desde unos miles de unidades de glucosa hasta un millón. Por otro lado, la amilopeptina posee, al igual que la

amilosa, cadenas lineales de glucosa unidas en enlace alfa 1,4 pero además posee una gran cantidad de ramificaciones, las cuales se presentan cada 24 a 30 residuos de glucosa y en enlace glicosídico alfa 1,6.



Tomado de: Nelson D.L y Cox M.M. 2005. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman and Company, NY. Cuarta edición.

El almidón es la molécula de reserva energética en las plantas por excelencia. Debido a que muchos organismos superiores poseen las enzimas necesarias para su degradación, este polímero puede ser convertido durante el proceso de digestión en diferentes intermediarios metabólicos que generan energía. El glucógeno a su vez es la contraparte del almidón en el reino animal, con la diferencia de que esta molécula posee una mayor cantidad de ramificaciones que el almidón y es más compacta. La conformación de los enlaces alfa 1,4 presentes en estas moléculas causa que estos polímeros asuman una estructura helicoidal muy estrecha. La prueba del almidón es una prueba muy sencilla pero que todavía se utiliza para determinar la presencia de almidón en algunos alimentos. La prueba se basa en una reacción física y no química, en la cual el almidón reacciona con el yodo para formar un complejo de color azul intenso. Bajo las mismas condiciones, el glucógeno da una coloración café.

Materiales y reactivos

- 1 gradilla con tubos de ensayo medianos
- pipetas de varios volúmenes
- Solución de almidón 1 % que se utiliza también para la prueba de Benedict
- Solución de yodo: Disolver un gramo de yodo en una solución de KI 2%.

Procedimiento

En tres tubos medianos y utilizando la pipeta que más se ajuste, distribuya los reactivos indicados según el siguiente cuadro:

Tubo número	Reactivo		
	Agua (ml)	Almidón 1% (gotas)	Solución de yodo (gotas)
1	5	5	1
2	5	1	1
3	5	0	1

Agite muy bien los tubos y note la diferencia de color que se atribuye a la formación de un complejo entre el almidón y el yodo. Anote el resultado. Posteriormente coloque los tres tubos en un baño de agua caliente (70° C) *con cuidado* por 10 minutos y observe cualquier cambio de color. Anote el resultado. Enfríe los tubos y observe nuevamente. Anote el resultado.

Resultados

- 1) Describa el resultado obtenido en los diferentes tubos luego de incubar a temperatura ambiente.

2) Describa el resultado obtenido en los diferentes tubos luego de incubar a alta temperatura.

3) Qué sucede cuando los tubos se enfrían de nuevo?

4) Tomando en cuenta la estructura helicoidal del almidón, explique qué tipo de reacción se lleva a cabo cuando se mezcla el yodo con el almidón?

5) Cómo explica los fenómenos descritos en las respuestas a las preguntas 1 y 2?

6) Cómo cree usted que daría el resultado de esta prueba si se utiliza celulosa?

4. Hidrólisis del almidón

Esta práctica tiene como objetivo demostrar que efectivamente los polisacáridos como el almidón están compuestos de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos. Como se mencionó anteriormente, el almidón está constituido de un solo monosacárido, la glucosa. Las propiedades del almidón son diferentes a las de la glucosa como se evidenciará mediante la hidrólisis del almidón para generar glucosa. Todos los polisacáridos son hidrolizados en sus constituyentes monosacáridos, por la acción de ácidos diluidos. Esta es una reacción gradual que puede observarse durante el tiempo de la sesión de laboratorio. Es por tanto recomendable que usted inicie el proceso de hidrólisis al comenzar la sesión de laboratorio y luego proceda con el resto de las pruebas. La hidrólisis del almidón se puede evidenciar con dos pruebas:

- a. Desaparición del color azul característico de la prueba del yodo.
- b. Aparición de glucosa, un azúcar reductor. La aparición de glucosa se evidenciará mediante la prueba de Benedict.

Materiales y reactivos

- 1 gradilla con 4 tubos de ensayo grandes (10ml)
- baño María en ebullición
- Pipetas de varios volúmenes
- Solución de almidón 1 %: pesar 1 g de almidón y llevar a 100 ml con agua destilada caliente. Preparar fresco.
- HCl concentrado: *será manipulado únicamente por los instructores. Tenga cuidado a la hora de manipular y agitar sus tubos que contengan este ácido.*
- Solución de yodo: Disolver un gramo de yodo en una solución de KI 2%.
- Reactivo de Benedict
- NaOH 0.4 mol/l: Pesar 16.0 g de NaOH y llevar a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento

Coloque 10 ml de una solución de almidón al 1% en un tubo de ensayo **grande**. Pida a su instructor que le añada 1 ml de HCl concentrado al tubo. Agite bien y luego coloque el tubo en un baño de agua hirviendo *con cuidado de no quemarse*. Mientras el almidón se está hidrolizando (tarda de 1:30 h a 2 h aproximadamente), efectúe la prueba de coloración del yodo. Para ello, añada en otro tubo 5 ml de agua, una gota de la solución de yodo y 0.5 ml de la solución de almidón que tiene hidrolizando en el baño maría a ebullición. Anote el resultado de la prueba del yodo.

Después de que la hidrólisis del almidón se haya llevado a cabo por 15 minutos, saque 0.5 ml del almidón que se está hidrolizando en el baño maría y repita la prueba del yodo. Continúe la hidrólisis hasta obtener una prueba de yodo negativa.

Posteriormente y para confirmar la presencia de glucosa, efectúe la prueba de Benedict. Para ello, añada en un tubo 0.5 ml del almidón hidrolizado, 1 ml de NaOH 0.4 mol/l (para neutralizar el ácido) y 2.5 ml de reactivo de Benedict. Incubar por 8 minutos en agua hirviendo. Anote y analice los resultados. Utilice sus resultados del punto 1 (Prueba de Benedict) y del punto 2 (Prueba de yodo para almidón) para interpretar sus resultados.

Resultados

- 1) Haga un cuadro con los resultados de la prueba del yodo a diferentes tiempos y anote el tiempo que tardó la prueba de Benedict en dar positiva para la presencia de glucosa.

2) Según los resultados del cuadro 1, cuánto tiempo tardó la solución de almidón en hidrolizarse?

- 3) Qué tipo de enlaces es capaz de romper el HCl? Porqué?

Bibliografía

- Angulo Ugalde, Y. Bioquímica Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. 1999
- ELITECH Diagnostics. Instrucciones de uso del reactivo Glucosa PAP, versión 12/2006
- Nelson D.L y Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, NY. Quinta edición, 2008.