

## EXPERIMENTO 4

### METODOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS (MONOSACARIDOS, DISACÁRIDOS Y POLISACARIDOS)

#### REQUISITOS

Repasar las estructuras de los principales monosacáridos, disacáridos y polisacáridos

#### OBJETIVOS

Identificar por métodos colorimétricos cuantitativos los principales monosacáridos, disacáridos y polisacáridos

### 1. FUNDAMENTOS

Los carbohidratos están distribuidos ampliamente en vegetales y animales en los cuales tiene participación estructural, funcional y metabólica. Los carbohidratos se clasifican dependiendo del número de átomos de carbono que posee y la función aldehídica o cetónica, estas a su vez le confiere la base para la mayoría de las reacciones usadas para su identificación y cuantificación. Cuando el carbohidrato está formado por una sola molécula de carbohidrato, se denomina monosacárido, por dos, disacárido y por más de dos, polisacárido.

Los disacáridos son azúcares formados por la unión de dos monosacáridos mediante el enlace glucosídico. Si este enlace se efectúa entre dos carbonos anoméricos, el disacárido no tendrá el potencial aldehído o cetona libre, por lo tanto no dan positivas aquellas pruebas que involucren la participación de estos grupos, recibiendo el nombre de azúcar no reductor, la sacarosa y la trealosa son ejemplos de los disacáridos no reductores (ver anexos). Todos los disacáridos que posean un carbono anomérico libre, darán positivas estas reacciones, llamándose azúcares reductores, debido a que promueven la reducción del reactivo usado y ellos mismos se oxidan. Aunque la mayoría de los disacáridos carecen de importancia para el hombre, con algunas excepciones como la sacarosa, su estudio se debe a que disacáridos como la maltosa y la celubiosa, se originan como producto de la

hidrólisis de polisacáridos, la maltosa, por ejemplo, es el producto de la hidrólisis del glucógeno y el almidón. Los polisacáridos, si son abundantes y representan para el hombre la principal fuente de energía metabólica de fácil aprovechamiento, el almidón, constituido por solo moléculas de glucosa es sin lugar a dudas la base alimenticia del globo terrestre, especialmente en la población de bajos recursos.

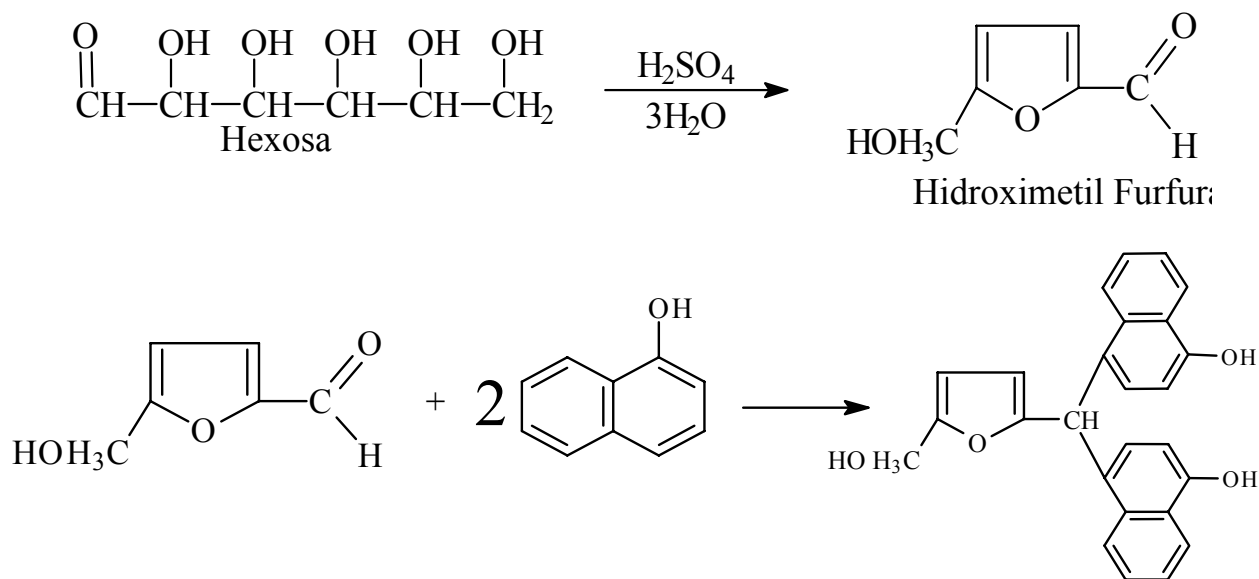
En el anexo, se muestran las estructuras de los principales mono, di y polisacáridos.

## 1.1 Fundamentos químicos de las pruebas.

### 1.1.1 Prueba de Molish

Es una reacción general para carbohidratos que contienen más de 5 átomos de carbono, la reacción se muestra en la siguiente figura:

**Figura 1 Reacción de Molish**



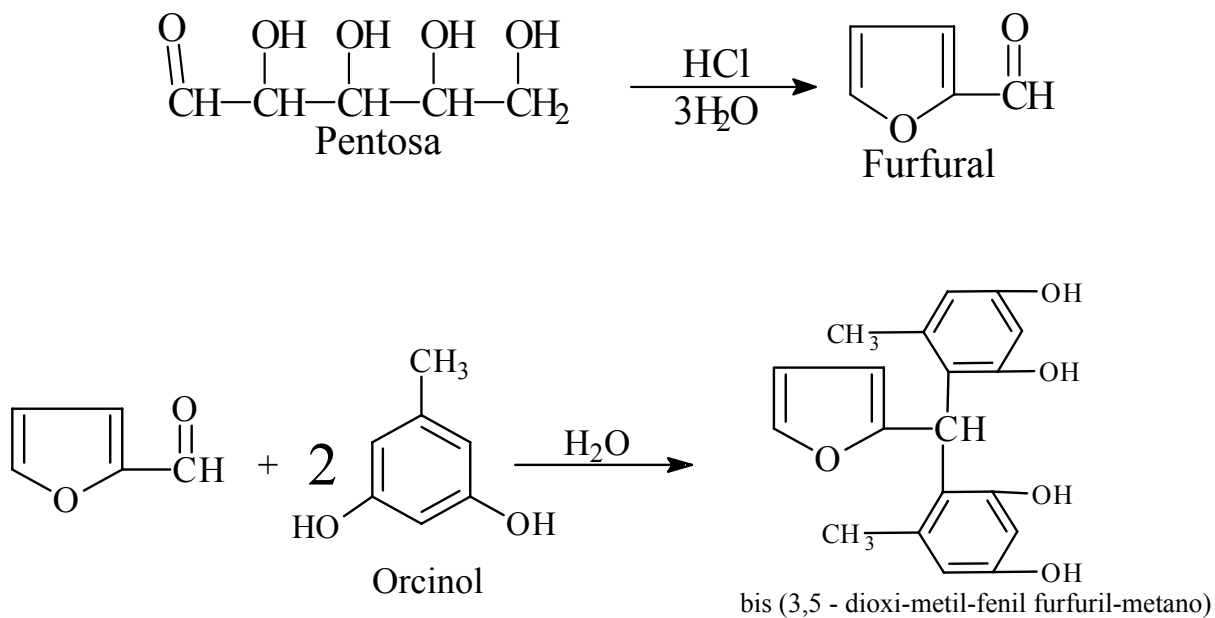
### 1.1.2 Prueba de Barfoed:

Es una reacción para identificar monosacáridos, aunque algunos disacáridos (los reductores) dan positiva la reacción, pero con mas tiempo de calentamiento, ya que así se hidroliza el disacárido. El fundamento radica en la reducción del acetato cúprico a oxido cuproso.

### 1.1.3 Prueba de Bial o de Orcinol-HCl

Es una prueba específica para pentosas la cual se muestra en la figura 2. La positividad se reconoce por la formación de una coloración verde botella brillante.

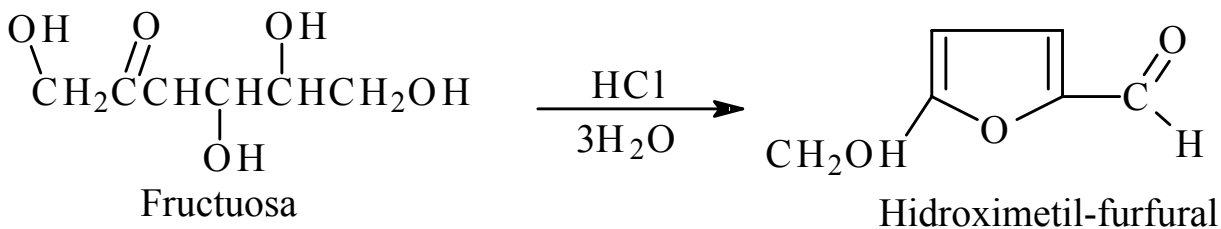
**Figura 2 Reacción de Bial**



#### 1.1.4 Prueba de Seliwanoff:

Es específica para cetosas que contengan 5 o más átomos de carbono, pero se usa casi exclusivamente para identificar fructosa. La reacción se presenta en la figura 3

**Figura 3 Reacción de Seliwanoff**



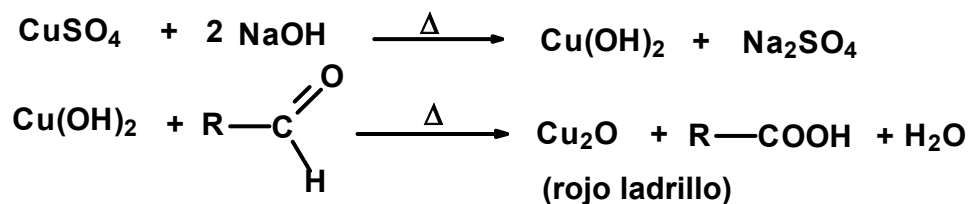
#### 1.1.5 Prueba de Lugol:

Es una prueba que se usa para identificar almidón. El color azul, se debe, posiblemente a la formación de un complejo: Ioduro de almidón.

#### 1.1.6 Prueba de Benedict:

Es una prueba específica para las sustancias reductoras con grupos carboxilos libres.

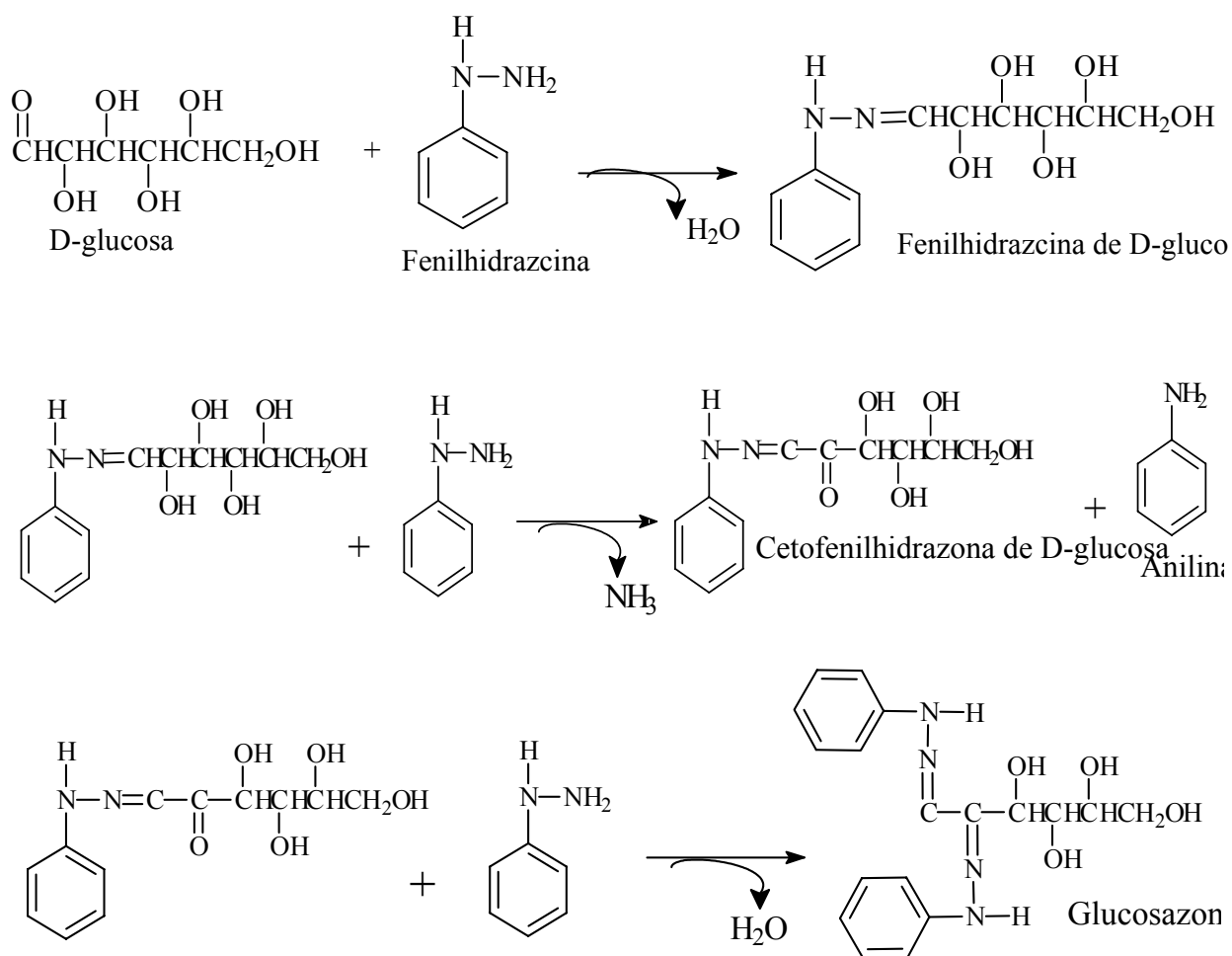
**Figura 4** Reacción de la prueba de Benedict cualitativo



### 1.1.6 Prueba Fenilhidrazina

Es una prueba para distinguir azúcares (y oligosacáridos). Los carbohidratos que solo se diferencian en sus átomos de carbono 1 y/o 2 darán la misma osazona, como es el caso de la glucosa y la fructosa, que son isómeros de función. La figura 5 muestra la reacción.

**Figura 5** reacción de la Prueba de Fenilhidrazina



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

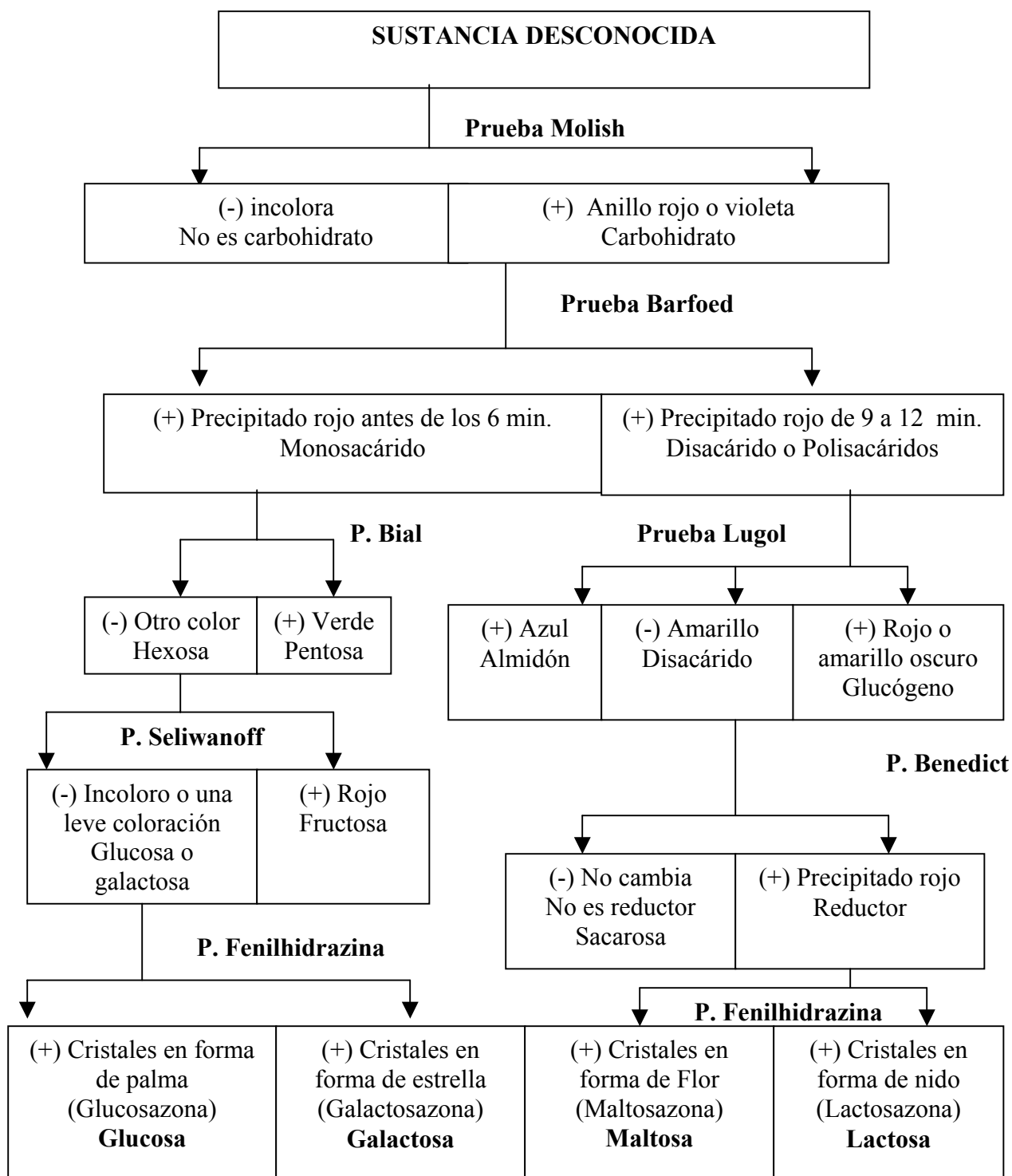
### 2.1 Materiales Tubos de ensayo, mechero, pinzas de madera

## 2.2 Métodos

Prueba	Procedimiento	Volumen
	En un tubo de ensayo colocar:	
<b>2.2.1</b> <b>P. de Molish</b>	Sustancia problema	1 ml
	R. de Molish: $\alpha$ -naftol al 10% en etanol	2 gotas
	Mezclar	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado Dejar caer lentamente de por las paredes del tubo. La aparición de un anillo violeta-rojizo en el sitio de contacto de los dos líquidos, indica que la muestra contiene carbohidratos.	0,50 ml
<b>2.2.2.</b> <b>P. de Barfoed</b>	Sustancia problema	1 ml
	Reactivo de Barfoed Acetato de cobre cristalizado 13,3 g en 200 ml de H <sub>2</sub> O destilada. Filtrar si es necesario. Añadir 1.8 ml de ácido acético glacial (CH <sub>3</sub> COOH).	2,5 ml
	Mezclar y calentar en baño de agua hirviente, contando los minutos y sacar del baño cada tubo inmediatamente después que haya aparecido el precipitado rojo ladrillo de Cu <sub>2</sub> O. Anotar el tiempo que corresponda a cada carbohidrato. La aparición de un precipitado rojo, antes de los 6 min. indica la presencia de un monosacárido. La aparición de un escaso precipitado rojo, entre 9 y 12 min indica la presencia de Lactosa o Maltosa.	
<b>2.2.3</b> <b>P. de Bial</b>	Sustancia problema	1 ml
	Reactivo de Bial 300 ml de HCl concentrado en 250 ml de H <sub>2</sub> O destilada, añadir 1,5 g de orcinol y 8 gotas de cloruro férrico al 1% (Cl <sub>3</sub> Fe.6H <sub>2</sub> O)	1.5 ml
	Mezclar	1 ml
	Llevar a baño de maría hirviente durante 3 min. La aparición de un color verde botella, brillante y totalmente transparente, indica la presencia de una pentosa. Algunos azucars dan con el Bial una coloración verde, pero está es opaca.	

<b>Prueba</b>	<b>Procedimiento</b> En un tubo de ensayo colocar:	<b>Volumen</b>
<b>2.2.4.</b> <b>P. de Seliwanoff</b>	Sustancia problema	1 ml
	Reactivo de Seliwanoff: Resorcinol al 0.5 % en H <sub>2</sub> O, tomar 3 ml añadir 12 ml HCl concentrado, añadir H <sub>2</sub> O c.s.p. 35ml.	2 ml
	Llevar a baño de María hirviendo durante 10min. La formación de un color rojo cereza, indica la presencia de fructosa.	
<b>2.2.5.</b> <b>P. de Lugol</b>	Sustancia problema	2 ml
	Reactivo de Lugol: A 5 g de Iodo y 10 g de K añadir H <sub>2</sub> O c.s.p 100 ml	1 gota
	Mezclar y observar. La aparición de una coloración azul indica la presencia del almidón y una coloración roja, indica el glucógeno o eritrodextrina. Si el color no cambia, el carbohidrato es un monosacárido o un disacárido.	
<b>2.2.6.</b> <b>P. de Benedict</b>	Sustancia problema	0.5 ml
	Reactivo de Benedict cualitativo Sulfato cúprico + Citrato de sodio + Carbonato de sodio	2 ml
	Mezclar	
	Llevar a baño de María hirviendo por 5 min. La aparición de un precipitado verde, amarillo o rojo indica la presencia de un azúcar reductor.	
<b>2.2.7.</b> <b>P. de Fenilhidrazina</b>	Sustancia problema	2 ml
	Reactivo de fenilhidrazina. Se mezclan fenilhidrazina, ácido acético glacial y agua destilada en una proporción de 1:1:4	0.5 ml
	Mezclar bien	
	Coloque los tubos en agua de baño hirviendo durante 10 min.	
	Al final del período de calentamiento, enfríe los tubos en chorro de agua	
	Dejar en reposo durante 5 min	
	Examinar al microscopio la forma característica de los cristales de osazona, colocando con mucho cuidado una gota en el portaobjeto. Cubrir con la laminilla cubreobjeto evitando dañar los cristales con movimientos bruscos o exceso de muestra.	

2.3 **Marcha analítica para monosacáridos, disacáridos y polisacáridos**



2.4 Preparación del almidón de diversas especies de granos para observar los gránulos al microscopio.

Suspenda algunas partículas del almidón comercial (Papa, yuca y frijón) en dos gotas de agua sobre un portaobjeto. Cubra con la laminilla y examine al microscopio. Dibuje dos o tres gránulos en el cuadro que tiene en su informe, anote sus observaciones.

2.4.1 Hidrólisis ácida de disacáridos.

Tome cuatro tubos de ensayo y siga el siguiente procedimiento:

Tubo	Solución del disacárido	Volumen de la solución del disacárido (ml)	HCl 1 N (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)
1	Maltosa	1	1	0
2	Sacarosa	1	1	0
3	Maltosa	1	0	1
4	Sacarosa	1	0	1

Seguidamente:

1. Hervir simultáneamente todos los tubos en baño de María durante 1 min.
2. Neutralizar los tubos 1 y 2 añadiendo 7 gotas de NaOH 1 N y 7 gotas de agua a los tubos 3 y 4
3. A cada tubo añada 0.5 ml de Benedict y lleve a baño de María por 2 min.
4. Observe los resultados y anote en su informe.

**3. AUTO-EVALUACIÓN.**

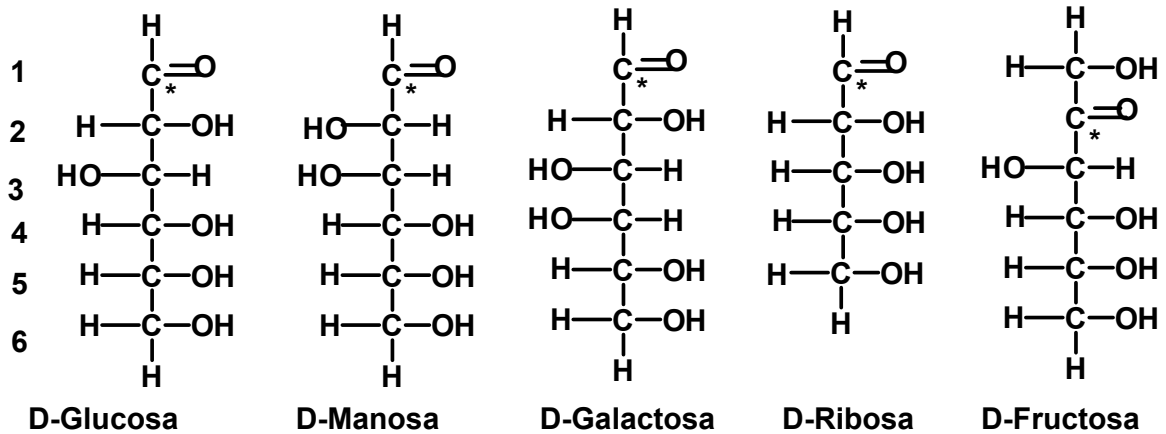
1. Explique por qué el monosacárido gliceraldehído da negativa la P. Molish.
2. Cuales son las aplicaciones prácticas de las pruebas estudiadas.
3. Escriba la glucosa en forma de silla.
4. Defina los siguientes términos: carbono anomérico, centro quiral, levorrotatorio.
5. Dibuje los monosacáridos glucosa, galactosa, ribosa y fructosa, clasifíquelos según el número de átomos de carbono y la función principal
6. Efectué un enlace hemiacetalico y uno hemicetalico, escriba las diferencias entre ambos enlaces.
7. Escriba las funciones: aldehídica, cetónica, alcohólica, ácida, colóquelas en orden de reactividad y explique el por qué de ese orden.
8. Explique en que consiste la hidrólisis ácida de disacáridos.
9. Escriba y compare las fórmulas de la maltosa y la trealosa.
10. Defina los siguientes términos: azúcar reductor y azúcar no reductor, cite ejemplos.
11. Cuál es la importancia energética del almidón.
12. Efectué un enlace glucosídico.



## 4. ANEXO

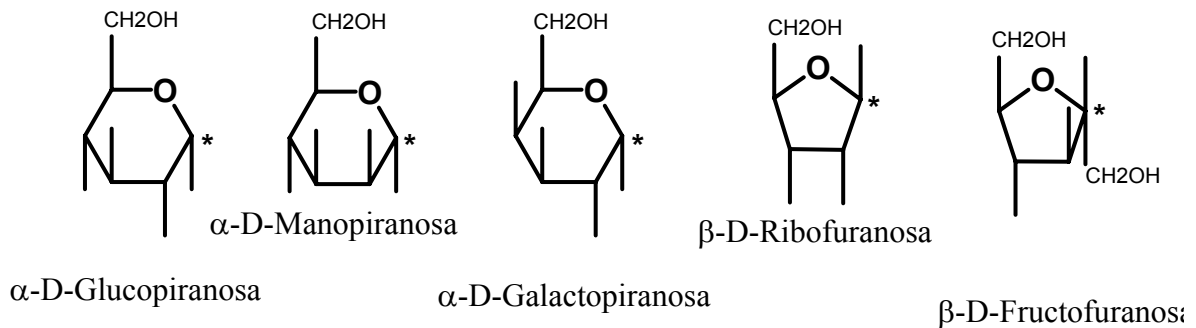
### 4.1 REPRESENTACIÓN DE FISCHER DE MONOSACÁRIDOS

Representación de Fischer de los monosacáridos mas frecuentes en la naturaleza  
carbonos



### 4.2 REPRESENTACIÓN DE HAWORTH

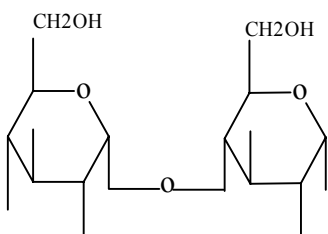
Representación en estructuras de Haworth



### 4.3 Y FURANO

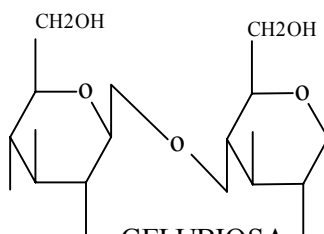
## DISACÁRIDOS MAS IMPORTANTES Y ESTRUCTURAS DEL PIRANO

### DISACARIDOS MAS IMPORTANTES



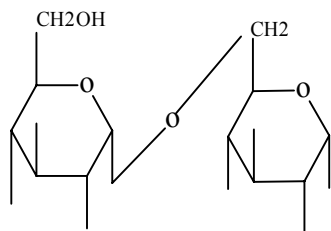
MALTOSA

$\alpha$ -D-glucopiranosil(1-4)  $\alpha$ -D-glucopiranososa



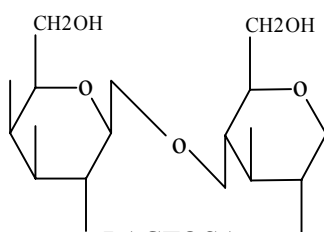
CELUBIOSA

$\beta$ -D-glucopiranosil (1-4)  $\beta$ -D-glucopiranososa



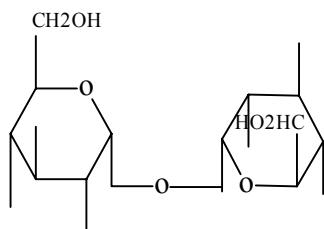
ISOMALTOSA

$\alpha$ -D-glucopiranosil (1-6)  $\alpha$ -D-glucopiranososa



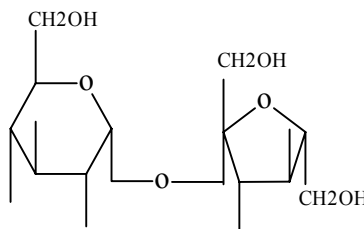
LACTOSA

$\beta$ -D-galactopiranosil (1-4)  $\alpha$ -D-glucopiranososa



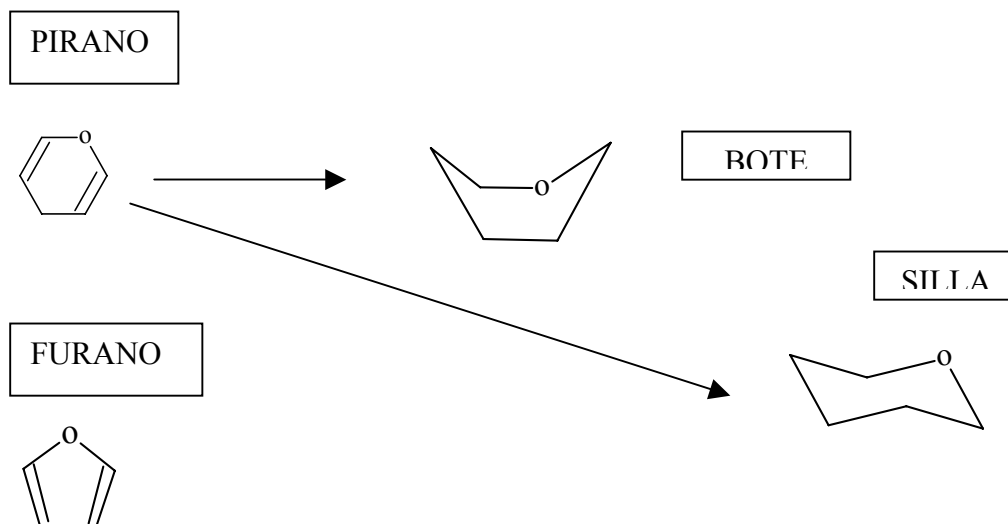
TREALOSA

$\alpha$ -D-glucopiranosil(1-2)  $\alpha$ -D-glucopiranosido

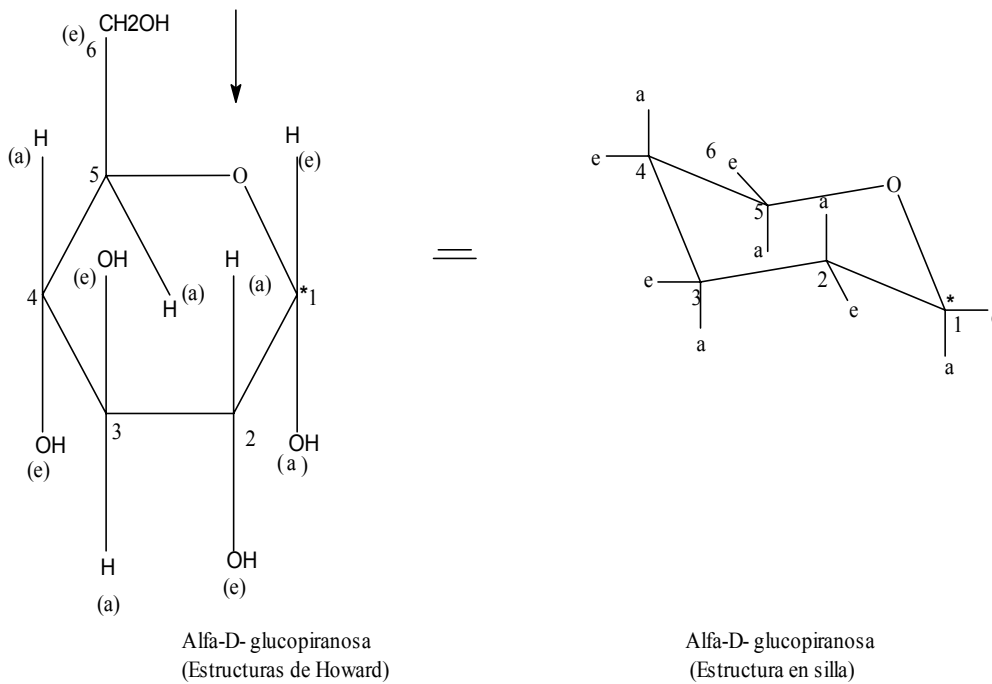
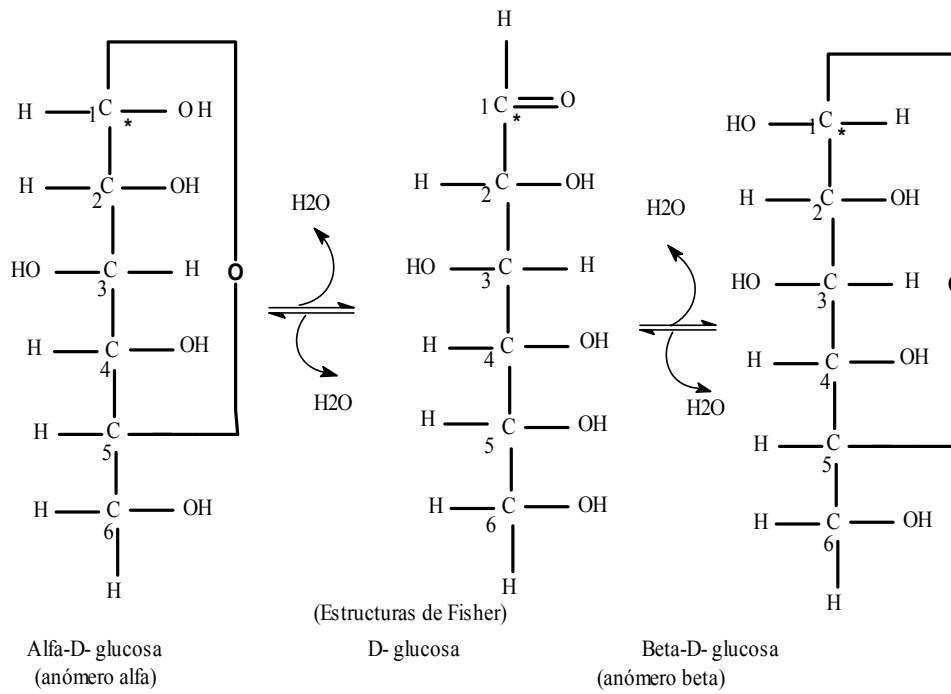


SACAROSA

$\alpha$ -D-glucopiranosil (1-2)  $\beta$ -D-fructofuranosido



## 4.4 ANÓMEROS DE LA GLUCOSA Y REPRESENTACIÓN EN SILLA D-GLUCOSA



**clave:** \* = Carbono anomérico, a = eje axial, e = eje ecuatorial

## 5. INFORME 4 (CARBOHIDRATOS)

**Apellidos**

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

**Nombres**

N° del mesón

N° del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		<b>Definitiva</b>	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Complete el siguiente cuadro con la información deseada. En la casilla “N° Muestra”, coloque el numero de cada tubo de las muestras problemas que se le entrego. Use los signos (+) o (-), para reportar la positividad o negatividad de la reacción. Sobre la base de los resultados de sus pruebas, Ud. puede identificar la muestra problema.

<b>N° Muestra</b>									
<b>P. Molish</b>									
<b>P. Barfoed</b>									
<b>P. Bial</b>									
<b>P. Seliwanoff</b>									
<b>P. Lugol</b>									
<b>P. Benedict</b>									
<b>P. Fenilhidrazina</b>									
<b>Nombre de la muestra problema</b>									

2. Dibuje y anote y sus observaciones sobre los cristales identificados en el microscopio

<b>Dibujo de los cristales de osazonas</b>				
<b>Observaciones</b>				

**3. Dibuje en el siguiente cuadro los gránulos de almidón, anote sus observaciones**

<b>Almidón</b>	<b>Yuca</b>	<b>Papa</b>	<b>fríjol</b>
<b>Dibujo</b>			
<b>Observaciones</b>			

**4. Anote sus resultados y la explicación sobre la hidrólisis ácida de disacáridos**

<b>Tubo</b>	<b>Resultado</b>	<b>Explicación</b>
<b>1</b>		
<b>2</b>		
<b>3</b>		
<b>4</b>		

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.**