

1- Título práctica de laboratorio: PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS CARBOHIDRATOS

2- OBJETIVOS

Generales:

- Reconocer las principales propiedades químicas de los carbohidratos.

Específicos:

- Clasificar los carbohidratos de acuerdo a sus comportamiento reductor por medio del reactivo de Benedict.
- Identificar polisacaridos mediante la observación de la formación del complejo de yodo en el ensayo de Lugol.
- Reconocer la hidrólisis enzimática sobre un disacárido como la sacarosa y un polisacárido como el almidón.

3- REFERENTES CONCEPTUALES

Los carbohidratos, las biomoléculas más abundantes de la naturaleza, son un vínculo directo entre la energía solar y la energía de los enlaces químicos de los seres vivos. (Más de la mitad de todo el carbono “orgánico” se encuentra en los carbohidratos.) Se forman durante la fotosíntesis, un proceso bioquímico en el que se captura la energía luminosa y se utiliza para impulsar la biosíntesis de moléculas orgánicas con energía abundante a partir de las moléculas con poca energía: CO_2 Y H_2O . La mayoría de los carbohidratos contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en una proporción $(\text{CH}_2\text{O})_n$, de aquí su nombre. Se han adaptado a una amplia diversidad de funciones biológicas, como fuentes de energía (p.ej., la glucosa), como elementos estructurales (p.ej., la celulosa y la quitina en los vegetales y en los insectos, respectivamente) y como precursores de la producción de otras biomoléculas (p.ej., los aminoácidos, los lípidos, las purinas y las pirimidinas); otros actúan como sitios de reconocimiento en las superficies celulares. Por ejemplo, el primer evento en la vida de todos los seres humanos fue un espermatozoide que reconoció un carbohidrato en la superficie de la pared de un ovulo. Los carbohidratos se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, según el número de unidades.¹

Reacción de Benedict- Azúcares reductores.

Los azúcares que reaccionan con oxidantes suaves se denominan azúcares reductores. Estructuralmente se sabe que aquellos monosacáridos y disacáridos que poseen su carbono anomérico libre (es decir, el grupo hidroxilo OH del carbono anomérico sin estar comprometido en un enlace glucosídico) son capaces de sufrir reacciones de óxido reducción en su grupo OH⁻. Si dichos azúcares se tratan con una solución llamada reactivo de “Fehling” (Cu^{+2} en tartrato de sodio y potasio acuoso) o con otra llamada reactivo de “Benedict” (Cu^{+2} en citrato de sodio acuoso) y luego se someten al calor, el color azul inicial de estos reactivos cambia a un color rojo ladrillo y se forma un precipitado del mismo color de **óxido de cobre I** (Cu_2O). Este grupo OH⁻ libre es característico de los monosacáridos y algunos disacáridos. Los azucares que contienen un grupo hemiacetal dan pruebas positivas. Los carbohidratos que solo contienen grupos acetal no dan pruebas positivas con estas soluciones y se llaman azúcares no reductores.¹

Reacción de Seliwanoff (grupos cetónicos)

Esta prueba sirve para diferenciar una aldosa de una cetosa. El resorcinol que contiene el reactivo condensa con los furfurales derivados de cetosas originando un color rojo intenso. Este fenómeno es desencadenado porque las cetosas se deshidratan a mayor velocidad que las aldosas.² Después del tiempo observamos que la muestra cambia a coloración en dos fases rojiza en el fondo del tubo de ensayo y de un color rosado en la parte superior.³

Ensayo con Lugol (determinación de polisacáridos)

El Lugol es una disolución acuosa de yodo y yoduro potásico que sirve para identificar si, en una disolución de azúcares no reductores, existe el polisacárido almidón (prueba de Lugol positiva). El almidón es una mezcla de amilosa y amilopectina. Cuando el almidón se pone en contacto con unas gotas de Lugol, toma un color azul-violeta característico (la amilosa se colorea de azul oscuro a negro y la amilopectina se colorea entre naranja y amarillo). Se trata de una reacción, en la que se forma un compuesto de inclusión del yodo en el interior de las hélices de la amilosa. Esta inclusión es reversible y está condicionada por la temperatura.⁴

Hidrólisis de la sacarosa

La sacarosa (figura 1) es un disacárido no reductor, (en el enlace glucosídico, participan los dos carbonos anoméricos). Sin embargo, en presencia de enzimas, la sacarosa se hidroliza y se descompone en los dos monosacáridos (glucosa y fructosa), que sí son reductores.⁴

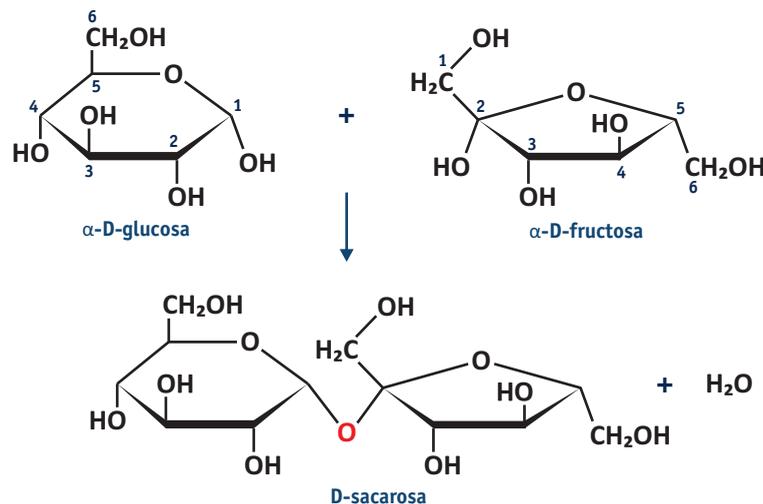


Figura 1: Estructura de la Sacarosa.⁵

Hidrólisis del almidón

El polisacárido almidón (figura 2) está constituido de dos polímeros, amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida de largas cadenas lineales de glucosa unidas en enlace glicosídico alfa 1,4 (Figura 2. a.). 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 amilopectina 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 (Figura 2. b.).⁶

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 y enzimas.⁴

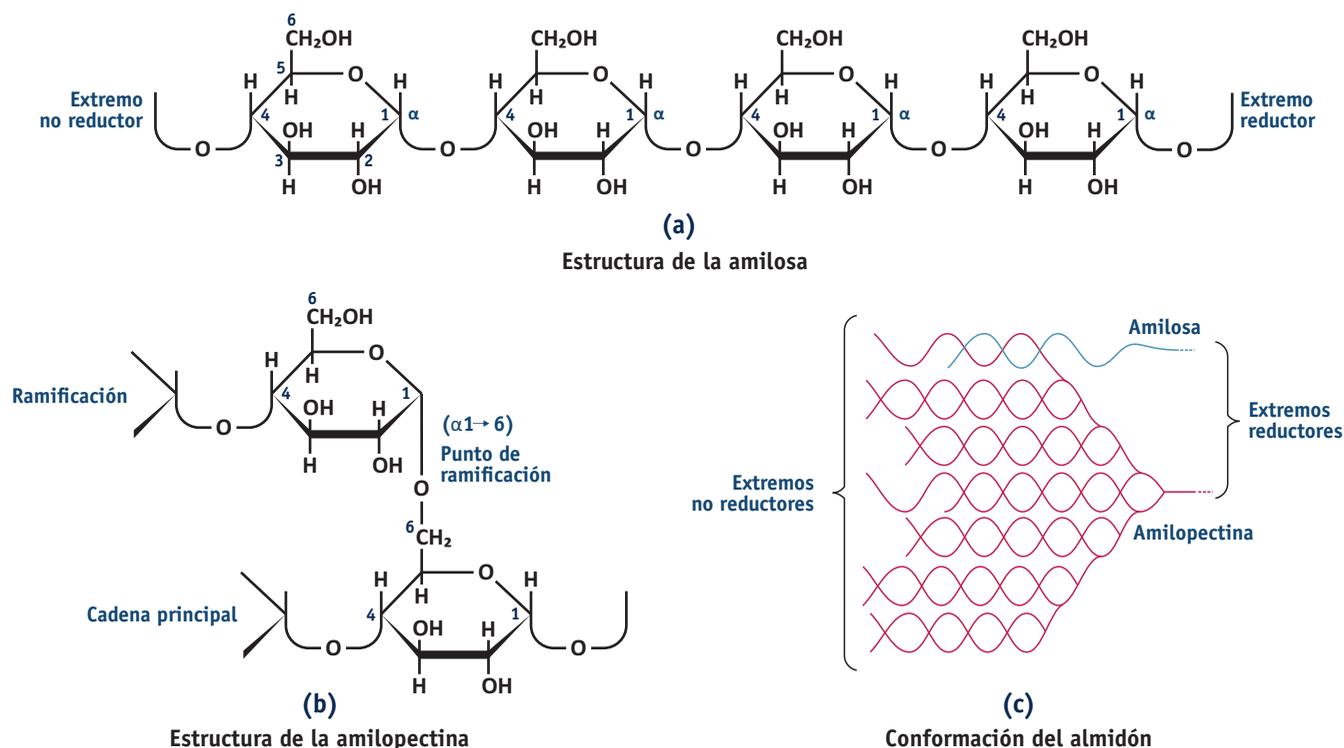


Figura 2: Estructura del Almidón.⁶

4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos

- 10. Tubo de ensayo.
- 1. Gradilla.
- 5. Pipeta Pasteur.
- 2. Beaker de 250 mL.
- 1. Beaker de 100 mL
- 1. Trípode.
- 1. Placa de calentamiento.
- 1. Baño serológico.

Reactivos

- Disolución de sacarosa al 2% m/v.
- Disolución de fructosa al 2% m/v.
- Disolución de galactosa al 2% m/v.
- Disolución de glucosa al 2% m/v.
- Disolución de maltosa al 2% m/v.
- Disolución de lactosa al 2% m/v.
- Disolución de almidón al 1% m/v.
- Disolución salina al 0,9% m/v.
- Reactivo de Benedict.
- Reactivo de Seliwanoff.
- Reactivo de Lugol.

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad (Bata, guantes de nitrilo, monogafas).
- Toallas absorbentes.
- Sharpie.
- Levadura.
- 50 mL de zumo de Naranja.
- 50 mL de Leche.

5-PROCEDIMIENTO

1. Reacción de Benedict (Azúcares reductores)

- En un tubo de ensayo limpio y seco agregue 1 mL de disolución de glucosa al 2% p/v. Posteriormente agregue 0,5 mL de reactivo de Benedict.
- Calentar a baño María hasta que cambie de color (aprox. 1 minuto)
- Repita con disolución de los demás carbohidratos (fructosa al 2% m/v, galactosa al 2% m/v, lactosa al 2% m/v, maltosa al 2% m/v, sacarosa al 2% m/v, almidón al 0,5%, zumo de naranja y leche)
- Observe cuales azúcares dan prueba positiva y explique ¿por qué?

 Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones de Metales pesados"

2. Reacción de Seliwanoff (Grupos cetónicos)

- En un tubo de ensayo limpio y seco agregue 1 mL de disolución de glucosa al 2% m/v. Posteriormente agregue 0,5 mL de reactivo de Seliwanoff.
- Calentar a baño María hasta que cambie de color (aprox. 10 minutos)
- Repita con disolución de fructosa al 2% m/v, sacarosa al 2% m/v y zumo de naranja
- Observe la formación de un color rojo cereza. ¿En cuáles tubos se observa la formación del color y por qué?

 Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones ácidas"

3. Ensayo con Lugol (Determinación de polisacáridos)

- En un tubo de ensayo limpio y seco agregue 1 mL de disolución de glucosa al 2% p/v. Posteriormente agregue 4 gotas de reactivo de Lugol.
- Repita con disolución de los demás carbohidratos (fructosa al 2% m/v, galactosa al 2% m/v, lactosa al 2% m/v, maltosa al 2% m/v, sacarosa al 2% m/v, almidón al 1%, zumo de naranja, leche y papa)
- Observe cuales azúcares dan prueba positiva y explique ¿por qué?

 Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones de compuestos halogenados"

4. Hidrólisis de Sacarosa (Acción digestiva de la Sacarasa)

- En un tubo de ensayo limpio y seco agregue 3 mL de disolución de sacarosa al 2% m/v. (Tubo 1)
- En un vaso de precipitado de 50 mL, agregue 10 mL de agua de la llave. Adicione 0,5 g de levaduras y active a 37°C en baño maría.
- Agregue 0,5 mL de la mezcla anterior al tubo de ensayo que contiene la disolución de glucosa.
- Tome 2 mL del tubo 1, y realice prueba de azúcares reductores con el reactivo de Benedict.

 Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones de Metales pesados"

5. Hidrólisis de Almidón (Acción digestiva de la amilasa)

- En un tubo de ensayo limpio y seco agregue 4 mL de disolución de almidón al 1 % m/v.
- EXTRACCIÓN DE SALIVA: Tome una pequeña cantidad de NaCl al 0,9% m/v en un beaker de 100 mL, mantenga esta cantidad en la boca por unos 10 segundos y luego deposite en un tubo de ensayo.
- Agregue 3 mL de saliva extraída con solución de NaCl al 0,9% m/v.
- Incube la mezcla anterior 15 min a 37°C en baño María.
- Repartir la muestra en dos tubos de ensayo y en uno determine la presencia de azúcar reductor con Benedict y en el restante la presencia del polisacárido con Lugol.

 Disponga los residuos en los recipientes rotulados como "Disoluciones de Metales pesados (Benedict)" y "Disoluciones de compuestos halogenados (Lugol)"

6. Hidrólisis de Almidón (Acción digestiva de la Amilasa)

- En un tubo de ensayo limpio y seco agregue 4 mL de disolución de almidón al 0,5 % p/v.
- Agregue 3 mL de saliva extraída con solución de NaCl al 0,9%
- Incube la mezcla 15 min a 37°C en baño María
- Repartir la muestra en dos tubos de ensayo y en uno determine la presencia de azúcar reductor con Benedict y en el restante la presencia del polisacárido con Lugol.



Disponga los residuos en los recipientes rotulados como "Disoluciones de Metales pesados (Benedict)" y "Disoluciones de compuestos halogenados (Lugol)"

6 Preguntas de profundización

Para entregar resueltas en el pre-informe

1. ¿Cuáles de los siguientes azúcares o derivados de azúcares son reductores:
 - a. Glucosa.
 - b. fructuosa.
 - c. α -metil-glucosido.
 - d. sacarosa.
2. De acuerdo a la clasificación de los monosacaridos realice un cuadro en el que relacione su fórmula química, cantidad de carbonos y clasificación.
3. Un estudiante de Medicina quiere sintetizar D-galactosa a partir D-lixosa. Lamentablemente encontró que las etiquetas de las botellas de la D-lixosa y D-Xilulosa se habían caído, ¿Cómo podría el estudiante determinar cuál botella contiene D-lixosa?
4. Complete el siguiente cuadro con la siguiente información (Si es necesario complementé con la información que considere):
 - Miel, frutas bebidas, productos azucarados, leches.
 - Sacarosa, maltosa, lactosa.
 - Acción a largo plazo, liberación lenta. No produce fluctuaciones en los niveles de energía.
 - Bebidas energéticas para deportistas
 - Almidón, celulosa, glucógeno.
 - Papas, cereales, pastas, panes.
 - Glucosa, fructosa, galactosa.

Tipo	Principales representantes	Fuentes Principales	Utilización
Monosacáridos			Azúcar rápidamente disponible, corta duración. Energía fluctuante.
Disacáridos		Azúcar, mermeladas, productos azucarados, cerveza de cebada, leche.	
Oligosacáridos	Maltotriosa, maltopentosa, dextrina.		
Polisacáridos			

Para entregar en el informe

1. Escriba todas las ecuaciones químicas de las reacciones que se realizaron en cada uno de los procesos de la práctica. Indique si para cada prueba los resultados fueron positivos o negativos y realice una descripción y/o explicación de lo ocurrido.
2. ¿Cuáles son los cofactores de las enzimas utilizadas y donde se ubican en la estructura protéica? ¿Cómo se lleva a cabo el metabolismo y la absorción de los carbohidratos en el organismo?
3. Consultar cuales son las principales enfermedades (alteraciones) asociadas al metabolismo de los carbohidratos.
4. Describa brevemente en que consiste la glucólisis anaerobia y la aerobia.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. McKee, T., & McKee, J. R. (2003). Bioquímica: la base molecular de la vida. McGraw-Hill Interamericana de España.
2. Túnez, I., Galván, A., y Montilla, P. Determinación de glúcidos. Accesible en URL: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/21%20DETERMINACI%C3%93N%20GL%C3%9ACIDOS.pdf> Consultada el 15 de marzo de 2015.
3. Morales, AF. Reconocimiento de los monosacaridos, disacaridos y de los polisacaridos . Universidad Nacional del Callao Facultad de Ingenieria Quimica. 2005. Accesible en URL: <http://www.fsalazar.bizland.com/pdf/POLISACARIDOS.pdf> Consultada el 15 de marzo de 2015.
4. Reconocimiento de Glúcidos. Accesible en URL: http://pedropablomoreno.com/pedropablomoreno.com/BIO2-Practicas_files/4%20Reconocimiento%20de%20glu%CC%81cidos.pdf Consultada el 15 de marzo de 2015.
5. Disacáridos. Accesible en URL: http://medicina.usac.edu.gt/quimica/biomol2/carbohidratos/Disac_ridos.htm Consultada el 15 de marzo de 2015.
6. Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry. Macmillan.