

20. Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares.

Nieves Abril Díaz, Jesús V. Jorrín Novo y José A. Bárcena Ruíz

Dep. de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio C-6 (Severo Ochoa), Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, España.

RESUMEN

Las pruebas colorimétricas para la determinación de azúcares se basan en la reacción específica de estos compuestos con determinados reactivos para dar derivados coloreados. La formación de color se toma como resultado positivo e indica la presencia del compuesto en cuestión, mientras que la no formación de color es indicativo de su ausencia. Para cada prueba se utilizará un control negativo, también denominado blanco de la reacción, en el que el reactivo se añadirá a agua destilada (o solvente adecuado). Aunque en la presente práctica se llevará a cabo sólo la determinación *cualitativa* de azúcares, las técnicas que se describen pueden, también, ser utilizadas para la determinación *cuantitativa* de dichas biomoléculas. Es importante que el alumno conozca la estructura y propiedades químicas de los compuestos que se van a utilizar, por lo que se le recomienda que acuda a sus notas de clase o a un libro de texto de bioquímica general para un mejor entendimiento y aprovechamiento de la práctica y para presentar y discutir los resultados obtenidos en el cuaderno de prácticas.

Título corto: Colorimetría de azúcares.

Palabras clave: azúcares reductores, pentosas, hexosas, aldosas, cetosas, mono, oligo y polisacáridos.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Hay una amplia gama de métodos colorimétricos que permiten la determinación cualitativa y cuantitativa de azúcares. Aunque son métodos muy generales, algunos de ellos permiten discriminar entre diferentes tipos de azúcares. Así hay métodos de determinación de azúcares reductores, de pentosas y hexosas, aldosas y cetosas, mono, oligo y polisacáridos, etc. En todos ellos el fundamento es similar, y se basa en la reacción del azúcar con otro reactivo, con la formación productos coloreados que se pueden determinar cuantitativamente por espectroscopía visible.

1.1. Reacciones de determinación de furfural e hidroximetilfurfural

Las pentosas y hexosas (tanto aldosas como cetosas) en presencia de ácidos minerales (p.ej., ácido sulfúrico) y a temperaturas elevadas sufren procesos de deshidratación originando **furfural** (derivados de pentosas) o **hidroximetilfurfural** (derivados de hexosas), tal y como se indica en la **Fig.1**.

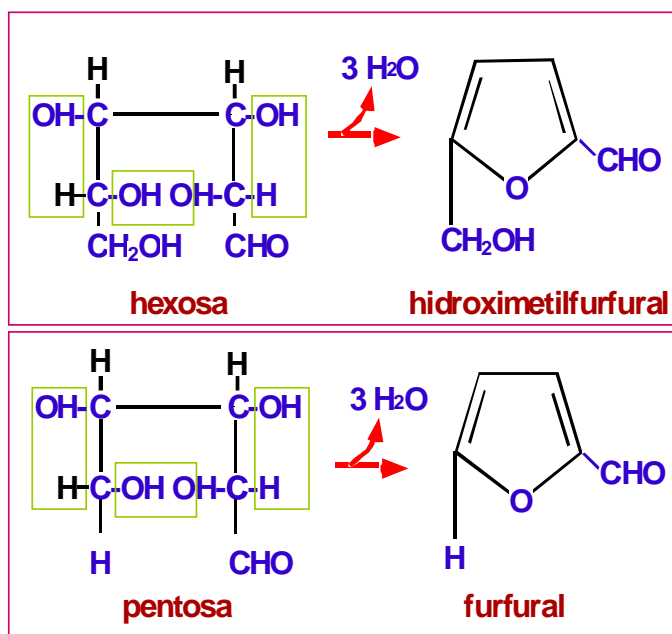


Fig. 1. Formación de furfurales. Los monosacáridos en caliente y medio muy ácido, sufren una deshidratación que conduce a la formación de un anillo pentagonal de furfural o hidroximetilfurfural, según se parta de pentosas o hexosas. Los oligo- y polisacáridos también sufren estas reacciones, ya que el medio ácido favorece la hidrólisis previa del enlace glicosídico. Los furfurales formados se combinan fácilmente con diversos fenoles y aminas, dando reacciones coloreadas.

Estos compuestos, furfural o hidroximetilfurfural, reaccionan con compuestos aromáticos (fenoles, aminas cíclicas o heterociclos) dando productos coloreados. Aunque son pruebas específicas de monosacáridos, los oligo y polisacáridos también dan positivo, ya que en medio ácido se hidroliza el enlace glicosídico. Se disponen de diferentes técnicas, dependiendo del reactivo utilizado (ensayo de Molish, con α -naftol; ensayo de la antrona; ensayo de Bial, con orcinol; ensayo de Seliwanoff, con resorcinol). En la presente práctica se llevará a cabo la determinación cualitativa de azúcares mediante los siguientes ensayos: Molish, Bial y Seliwanoff (**Fig. 2**)

1.1.1.- Ensayo de Molish: Reacción de furfural e hidroximetil-furfural con α -naftol (**Fig. 2**), dando lugar a *derivados de color púrpura*. Es una prueba general de azúcares.

1.1.2.- Ensayo de Bial: Reacción del furfural e hidroximetil-furfural con orcinol (**Fig. 2**) en medio con HCl, dando lugar a *derivados de color azul*. Es una prueba específica de pentosas.

1.1.3.- Ensayo de Seliwanoff: Reacción del furfural e hidroximetil-furfural con resorcinol (**Fig. 2**), dando lugar a *derivados de color rosa-rojo*. Es una prueba específica de hexosas. Las cetosas en medio ácido se deshidratan más rápidamente que las aldosas, por lo que ambos grupos pueden diferenciarse en función del tiempo que tarda en aparecer el producto coloreado.

REACCIONES COLOREADAS DE LOS FURFURALES

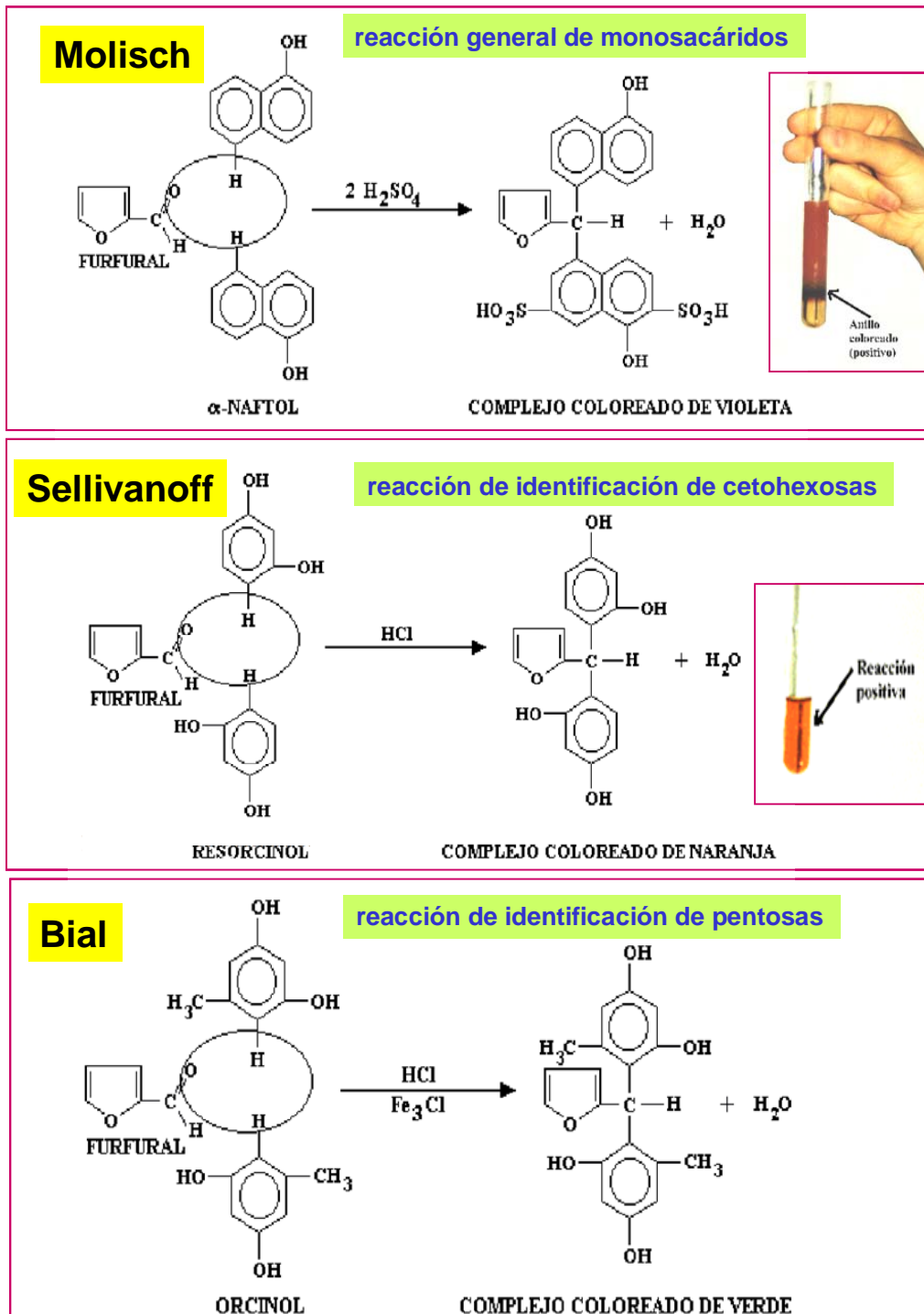
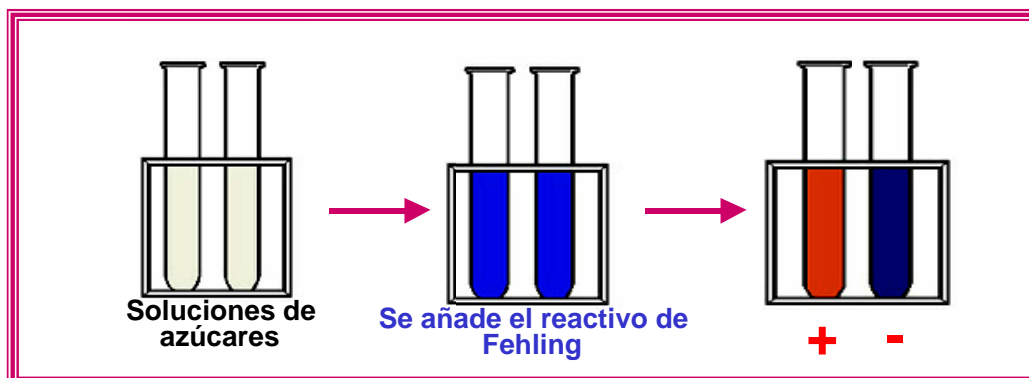


Fig. 2. Reacciones coloreadas de los furfurales con α -naftol (prueba de Molisch), resorcinol (prueba de Sellivanoff) y orcinol (prueba de Bial).

1.2. Identificación de azúcares reductores por el ensayo de Fehling

Los carbohidratos que presentan grupos aldehídicos libres o en forma hemiacetálica (grupos aldehídicos potenciales) no bloqueados (por ejemplo formando parte de un enlace glicosídico) pueden ser oxidados por diferentes reactivos, por lo que se les denomina **azúcares reductores**.



Positivo Aldehídos alifáticos y α -hidroxialdehidos

Negativo: Aldehidos aromáticos y cetonas

Fig. 3. Reacción de oxidación de azúcares por iones cúpricos

Un ejemplo típico de azúcares reductores serían la *glucosa* y la *maltosa*, y de azúcares no reductores, el disacárido *sacarosa* (O- β -D-fructofuranosil-(2-1)- α -D-glucopiranosido). Las cetosas, que no son azúcares reductores, sufren, sin embargo, reacciones de oxidación típicas de los aldehidos; para ello necesitan un medio básico, ya que a valores altos de pH se produce una isomerización a la correspondiente aldosa. Hay diferentes métodos de determinación de azúcares reductores (Fehling, Benedict, Barfoed, Nelson-Somogyi, etc.). En todos ellos, el azúcar reductor es oxidado por el catión cúprico (Cu^{2+}) en medio alcalino, con formación de óxido cuproso insoluble, lo que da la típica coloración rojizo-amarillenta (**Fig. 3**). Los iones Cu^{2+} se pueden mantener en solución, formando complejos coloreados con tartratos y citratos, lo que permite la determinación cuantitativa de azúcares reductores.

Los **OBJETIVOS** de la presente práctica son:

a) Realizar la determinación cualitativa de azúcares por los métodos de:

(1) Molish, (2) Bial, (3) Seliwanoff y (4) Fehling.

b) Caracterizar la reacción de diferentes azúcares (pentosas, hexosas, aldosas, cetosas, azúcares reductores y no reductores, mono y disacáridos) con α -naftol, orcinol, resorcinol y el reactivo de Fehling.

c) Identificar una solución de azúcar desconocido por comparación con los resultados obtenidos con los azúcares patrón.

2. MATERIAL Y REACTIVOS

2.1 Material

2.1.1 Material para cada grupo

- gradillas con tubos de ensayo;
- juego de pipetas (20, 200 Y 1000 μ l);
- probetas (100 y 250 ml);
- vasos de precipitado (100 y 500 ml);
- frasco lavador con agua destilada;
- recipientes de plástico de 50 ml (dos);
- papel de filtro;
- papel de parafina;
- rotulador para vidrio;
- bote con acetona;
- pipetas Pasteur de plástico (cuatro);
- guantes de latex.

2.1.2 Material de uso general

Baños de agua; agitador de tubos de ensayo; balanza; pHmetro.

2.2 Reactivos

- Soluciones al 1% (1 g en 100 ml) en agua destilada de los siguientes azúcares:
 - xilosa
 - glucosa
 - almidón.
 - sacarosa
 - fructosa
 - Solución problema de azúcar.
- Solución de α -naftol al 0.5% (p/v; 0.5g en 100 ml) en etanol absoluto.
- Solución de **orcinol** al 0.3% (p/v; 0.3g en 100 ml) en ácido clorhídrico concentrado ($\rho = 1,19$)
- Solución de **resorcinol** al 0.06% (p/v; 60 mg en 100 ml) en ácido clorhídrico 6N.
- **Reactivo de Fehling:** Mezclar a partes iguales (el día de su uso) las soluciones A y B:
 - **Solución A de Fehling:** Sulfato de cobre 0.28 N (35 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada).
 - **Solución B de Fehling:** Tartrato sódico-potásico 1.5 N (158 g en 500 ml) en hidróxido potásico 4 N (112 g en 500 ml de agua destilada).

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Prueba de Molish

1. Numerar 7 tubos de ensayo

2. Añadir a cada tubo 1 ml de: agua (ensayo blanco), xilosa, sacarosa, glucosa, fructosa, y almidón y solución problema.
3. Añadir a cada tubo (incluyendo al blanco) dos gotas de la solución de **α -naftol**. Agitar la mezcla
4. Añadir a cada tubo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado (dejándolo resbalar por las paredes, usar guantes y trabajar en la campana de gases).
5. Observar y anotar la aparición de color (tipo de color, intensidad y tiempo de aparición) para cada uno de los compuestos.
6. Calentar a 60° durante 10 min y observar y anotar si se produce algún cambio.

3.2 Prueba de Bial

1. Numerar 7 tubos de ensayo
2. Añadir a cada tubo 1 ml de: agua (ensayo blanco), xilosa, sacarosa, glucosa, fructosa, almidón y solución problema.
3. Añadir 3 ml de la solución de **orcinol**.
4. Agitar la mezcla y observar y anotar la aparición de color (tipo de color, intensidad y tiempo de aparición) para cada uno de los compuestos.
5. Calentar a 60° durante 10 min y observar y anotar si se produce algún cambio.

3.3 Prueba de Seliwanoff

1. Numerar 7 tubos de ensayo
2. Añadir a cada tubo 3 ml de la solución de **resorcinol**.
3. Añadir a cada tubo 100 μ l de: agua (ensayo blanco), xilosa, sacarosa, glucosa, fructosa, almidón y solución problema.
4. Agitar la mezcla y observar y anotar la aparición de color (tipo de color, intensidad y tiempo de aparición) para cada uno de los compuestos.
5. Calentar a 60° durante 10 min y observar y anotar si se produce algún cambio.

3.4 Prueba de Fehling

1. Numerar 7 tubos de ensayo
2. Añadir a cada tubo 2 ml de: agua (ensayo blanco), xilosa, sacarosa, glucosa, fructosa, y almidón y solución problema.
3. Añadir 5 gotas del reactivo de Fehling y mezclar bien agitando el tubo.
4. Observar y anotar la aparición de color (tipo de color, intensidad y tiempo de aparición) para cada uno de los compuestos.
5. Calentar en el baño de agua a 40 °C durante 10 min y observar y anotar si se produce algún cambio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Presentar los datos obtenidos en la tabla que aparece en la página siguiente (**Tabla 1**) (resultado positivo o negativo de la prueba, tipo de color, intensidad y tiempo en dar reacción).

2. Representar la fórmula de cada uno de los azúcares ensayados en el recuadro que aparece en esta página como **Figura 4**.
3. Sobre la base de la estructura química de cada azúcar, explicar:
 - a. por qué cada uno de ellos da o no da positivo en las distintas pruebas
 - b. las diferencias observadas en el desarrollo de la reacción para cada uno de ellos.

Figura 4. Fórmulas químicas de los azúcares empleados como patrón	
AZÚCAR	FÓRMULA QUÍMICA
GLUCOSA	
FRUCTOSA	
XILOSA	
SACAROSA	
ALMIDÓN	

Tabla 1. Determinación colorimétrica de azúcares					
AZÚCAR		PRUEBA DE MOLISH	PRUEBA DE BIAL	PRUEBA DE SELIWANOF	PRUEBA DE FEHLING
"BLANCO"	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				
GLUCOSA	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				
FRUCTOSA	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				
XILOSA	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				
SACAROSA	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				
ALMIDÓN	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				
"PROBLEMA"	Color antes de calentar				
	Color al calentar				
	Tiempo de aparición del color				

5. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Berezov TT, Korovkin BF (1992): Chemistry and metabolism of carbohydrates. En Berezov TT, Korovkin BF (eds): Biochemistry, 1ª Ed. Editorial Mir Publishers Moscow (Moscú, Rusia), pp. 215 – 256.

- D'Ocon MC, García MJ, Vicente JC (1998): Estudio general del metabolismo de los hidratos de carbono. En D'Ocon MC, García MJ, Vicente JC (eds): Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico, 1ª Ed. Editorial Paraninfo (Madrid, España), pp. 53 – 72.
- Harris RA (2004): Metabolismo glucídico I: Principales rutas metabólicas y su control. En Devlin TM (eds): Bioquímica, 4ª Ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp. 597 – 664.
- Muñoz E (1988): Propiedades químicas de los azúcares. En Lozano JA, Tudela J (eds): Prácticas de bioquímica. Experimentación y Simulación, 1ª Ed. Editorial Síntesis (Madrid, España), pp. 65 – 70.
- McKee T, McKee JR (2003): Hidratos de carbono. En McKee T, McKee JR (eds): Bioquímica. La base molecular de la vida, 3ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana (Madrid, España), pp. 200 – 233.