

# IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Jose Manuel Parra, Juan Barbosa <sup>†</sup>

Departamento de Química. <sup>†</sup> Departamento de Física. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

**ABSTRACT:** Carbohydrates are the main source of energy for both animals and humans. Carbohydrates can have different structures or properties, which allows the use of certain tests to identify them in broad strokes. Thanks to this, we sought to observe the particular behaviors of different types of carbohydrates in the face of various characteristic identification reactions. In addition, we sought to identify the nature of an unknown carbohydrate by means of characteristic identification reactions. To achieve this, three standard standards were used: maltose, sucrose and glucose, and a test sample. These samples were tested with the Molisch reaction, the Barfoed test, the Fehling test, the Seliwanoff test and the Osazone test. As a result, it was obtained that the identity of the unknown sugar is either xylose or arabinose, two carbohydrates whose behavior in all of the tested reactions is the same.

## ■ INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen una infinidad de compuestos, los cuales han sido clasificados en inorgánicos y orgánicos [1]. Dentro de la clasificación de los compuestos orgánicos, el carbono es el elemento principal. Con el carbono y otros pocos elementos, se puede formar macromoléculas biológicas, en otras palabras, polímeros de alto peso molecular formados a partir de precursores simples, comparados con la estructura final. Entre estas moléculas se encuentran las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y los ácidos nucleicos [2, 3].

Centrándonos más, los carbohidratos son uno de los principales tipos de nutrientes. Son la principal fuente de energía para el cuerpo, tanto en humanos como en los animales [4]. Este tipo de compuestos se descomponen a carbohidratos más pequeños, como la glucosa. Después, el cuerpo metaboliza la glucosa, produciendo Piruvato, NADH,  $H^+$ , agua y ATP [3], siendo el ATP energía para las células, tejidos y órganos. Por otro lado, no todos los carbohidratos que entran al cuerpo son procesados, parte de estos se guarda en el hígado y músculos para cuando se necesiten.

Continuando, los carbohidratos se clasifican en simples o complejos dependiendo de su estructura química. Entre los carbohidratos simples se tiene el azúcar que se encuentra naturalmente en productos, tales como frutas, vegetales, leche y derivados de la leche. Además, dentro de los carbohidratos simples se incluyen azúcares añadidos durante el procesamiento y refinación de ciertos alimentos [5]. Entre los carbohidratos complejos se tienen los panes y cereales integrales, vegetales ricos en almidón y legumbres [5].

Por otro lado, los carbohidratos también cumplen una función estructural fundamental en los organismos. Polisacáridos como el peptidoglicano por ejemplo, es el componente principal de las paredes celulares de bacterias y plantas, además de jugar un papel importante en la comunicación celular.

En particular para las muestras analizadas en el presente documento se tiene lo siguiente:

- **Fructuosa** Es un importante azúcar estructural de las plantas, forma parte de la sacarosa y es un intermediario de la glucólisis, por lo que es un monosacárido muy abundante en el medio celular y constituye una de las fuentes principales de energía en las células por su disponibilidad y capacidad hidrolizable.
- **Glucosa** Es uno de los carbohidratos mas abundantes en la naturaleza y constituye la fuente principal de energía en los organismos vivos, en forma de energía metabólica. Además, esta también cumple un rol estructural en la celulosa, la cual es un homopolisacárido de glucosa y la biomolécula orgánica más abundante, puesto que conforma la mayor parte de la biomasa terrestre.
- **Lactosa** Esta presente en lácteos y algunos vegetales y constituye la fuente de energía fundamental en mamíferos durante el periodo de lactancia, por lo que juega un papel fundamental en el desarrollo de estos organismos.
- **Maltosa** Es un dímero de glucosa que esta presente en plantas en forma de almidón y animales en forma de glucógeno y constituye a su vez la principal reserva energética, siendo capaz de almacenar grandes cantidades de energía por medio de enlaces fácilmente aprovechables por las células, manteniendo a su vez una forma óptima de plegamiento en su estructura.
- **Sacarosa** Esta presente en los frutos, semillas, raíces y en la miel y es uno de los productos de la fotosíntesis y constituye una fuente de energía en los organismos. Además, es uno de los azúcares mas comunes y constituye el “azúcar de mesa”, por lo que es ampliamente utilizado y producido por la industria alimenticia.

En cuanto identificación, existen diferentes pruebas las cuales dan indicio de que tipo de hidrocarburos se tiene. Por ejemplo, la prueba de Benedict es una prueba en la cual se emplea el reactivo de Benedict para identificar azúcares reductoras [6], azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto

[3]. Otra prueba que se tiene es la de Molisch, en la cual se tiñe cualquier carbohidrato presente en una disolución [7]. También se tiene la prueba de Barfoed, en la cual se detecta monosacáridos, mediante la reducción del cobre (II) a cobre (I) [8]. Otro ejemplo es la oxidación de oxidación de Fehling, la cual es una prueba análoga a la prueba de Benedict [9]. Otra posible prueba es la prueba de Seliwanoff, la cual permite distinguir aldosas y cetosas, azúcares que contienen un grupo aldehído o cetona, respectivamente; Por último se tiene la prueba de Osazone, la cual permite para identificar monosacáridos.

En base a lo anterior, en esta ocasión se buscó observar los comportamientos particulares de distintos tipos de carbohidratos frente a diversas reacciones características de identificación. Para lograr esto se empleó estándares: maltosa, sacarosa y glucosa. Además, se buscó identificar la naturaleza de un carbohidrato desconocido por medio de las reacciones características de identificación, tales como la reacción de Molisch, la prueba de Barfoed, la prueba de Fehling, prueba de Seliwanoff y la prueba de Osazone.

## ■ SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 1.1 Materiales y reactivos

En cuanto a los materiales empleados se tiene: balón aforado de 10 mL, tubos de ensayo, pipeta graduada 5 mL, gotero de vidrio, beaker 400 mL, plancha de calentamiento y microscopio. En cuanto a reactivos, se empleó: solución estándar al 5 % p/v de glucosa, sacarosa, maltosa y muestra problema, solución de  $\alpha$ -Naftol al 10 % en etanol absoluto, ácido sulfúrico concentrado, reactivo de Barfoed (0,65 g de acetato de cobre en 0,1 mL de ácido acético glacial, llevado a 10 mL con agua destilada), solución de sulfato de cobre (II) (0,34 g de sulfato de hierro (II) anhidro en 10 mL de agua destilada), solución de hidróxido de sodio al 10 %, solución de tartrato de sodio y potasio al 35 % (preparada con la solución de hidróxido de sodio), solución de ácido clorhídrico al 20 %, reactivo de Seliwanoff (5 mg de resorcinol disueltos en ácido clorhídrico al 20 %), reactivo de Benedict y mezcla de Osazone (mezcla 1:2 de fenilhidrazina y acetato de sodio). Los materiales y reactivos fueron provistos por el laboratorio. Las soluciones fueron preparadas el mismo día de la práctica. La muestra problema fue provista por la profesora.

### 1.2 Reacción de Molisch

Se tomaron 4 tubos de ensayo y se rotularon del 1 al 4. Al tubo uno se agregó 1 mL de la solución de maltosa, al dos 1 mL de la solución de glucosa, al tres 1 mL de la solución de sacarosa y al cuatro 1 mL de la solución de la muestra problema. Seguidamente se añadió 5 gotas de la solución de  $\alpha$ -Naftol a cada tubo. Después, se agregó 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, por las paredes y sin revolver, a cada tubo.

### 1.3 Oxidación de Fehling

Se rotuló cuadros tubos de ensayo, del 1 al 4. A cada tubo se añadió 1 mL de la solución de sulfato de cobre (II) y 1 mL de la solución básica de tartrato de sodio y potasio. Seguidamente los tubos se calentaron a ebullición por 1 min. Después, al tubo uno se agregó 1 mL de la solución de maltosa, al dos 1 mL de la solución de glucosa, al tres 1 mL de la solución de sacarosa y al cuatro 1 mL de la solución de la muestra problema.

### 1.4 Prueba de Seliwanoff

Se tomaron 4 tubos de ensayo y se rotularon del 1 al 4. Al tubo uno se agregó 1 mL de la solución de maltosa, al dos 1 mL de la solución de glucosa, al tres 1 mL de la solución de sacarosa y al cuatro 1 mL de la solución de la muestra problema. Después se agregó 5 gotas del reactivo de Seliwanoff a cada tubo. Los tubos se agitaron y seguidamente se colocaron en baño maría a ebullición por 1 min.

### 1.5 Prueba de Osazone

Se tomaron 4 tubos de ensayo y se rotularon del 1 al 4. Al tubo uno se agregó 1 mL de la solución de maltosa, al dos 1 mL de la solución de glucosa, al tres 1 mL de la solución de sacarosa y al cuatro 1 mL de la solución de la muestra problema. A continuación, se agregaron 0,2 g de la mezcla de Osazone y dos gotas de ácido acético a cada tubo. Después, los tubos se agitaron y seguidamente se colocaron en baño maría a ebullición hasta que se formaron cristales. Finalmente, los cristales obtenidos fueron observados al microscopio.

### 1.6 Prueba de Benedict

Se tomó 1 mL de la solución de muestra problema y se añadió 1 mL de reactivo de Benedict.

## ■ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas se muestra en la [Tabla 1](#). En la primera sección se describen las observaciones para los estándares usados en la práctica, mientras que en la segunda se presentan lo que se debería observar para cada una de las muestras problema.

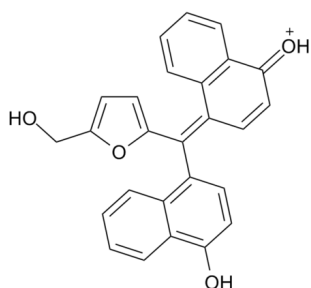
### 2.1 Molisch

La reacción de Molisch es de particular importancia, dado que permite determinar la presencia de carbohidratos en la muestra [2]. Si bien no es del todo selectiva a éstos, pues da positiva para glicoproteínas y ácidos nucleicos, en el caso de las muestras trabajadas, considerando su pureza, los resultados muestran que todas las muestras trabajadas constituyen carbohidratos.

Se considera que un resultado positivo para la prueba de Molisch es la formación de un anillo violeta en la interfase entre el ácido sulfúrico y el carbohidrato. El anillo violeta tiene su origen en la formación de un complejo orgánico altamente aromático, el cual se observa en el [Esquema 1](#). Este complejo está formado por un hidroximetil furfural, para el

Tabla 1. Resultados esperados para las muestras

Muestra	Molisch	Benedict	Fehling	Seliwanoff	Osazone
Maltosa	+	N.A.	+	-	Círculos de agujas
Glucosa	+	N.A.	+	+	Agujas
Sacarosa	+	N.A.	-	+	-
Xilosa	+	+	+	-	Agujas
Lactosa	+	+	-	-	Círculos de agujas
Fructosa	+	+	-	+	Agujas
Arabinosa	+	+	+	-	Agujas



Esquema 1. Complejo violeta en la reacción de Molisch, para una hexosa.

caso de carbohidratos de 6 carbonos, o furfural, para pentosas y dos derivados fenólicos como el  $\alpha$ -naftol. Los furfurales se forman independientemente del número de unidades que conformen el polisacárido o monosacárido, dado que la presencia del ácido sulfúrico, el cual, debido a su carácter de ácido mineral, es capaz de hidrolizar polisacáridos a monosacáridos [7].

## 2.2 Barfoed

En el caso del reactivo de Barfoed, si bien, no se obtuvo ningún resultado positivo para las muestras, se debe tener en cuenta que este se comporta como un ácido débil el cual puede sufrir un proceso de reducción por acción de monosacáridos. El resultado de la prueba es positivo cuando se presenta una reacción de color rojizo, que se produce por la formación de óxido de cobre.

## 2.3 Benedict

La prueba de Benedict permite determinar la existencia de azúcares reductores en el medio. Esto se debe a que, en medio fuertemente alcalino, el ion  $\text{Cu}^{+2}$  puede ser reducido a  $\text{Cu}^{+1}$  bajo la acción del grupo aldehído de un azúcar. La reacción produce un cambio en el color desde azul, hasta, anaranjado y rojo, dependiendo de la cantidad de sustancias reductoras en la muestra. En particular, se debe destacar que la prueba se realizó únicamente para la muestra problema, obteniendo una coloración naranja, positiva para azúcar reductor.

## 2.4 Fehling

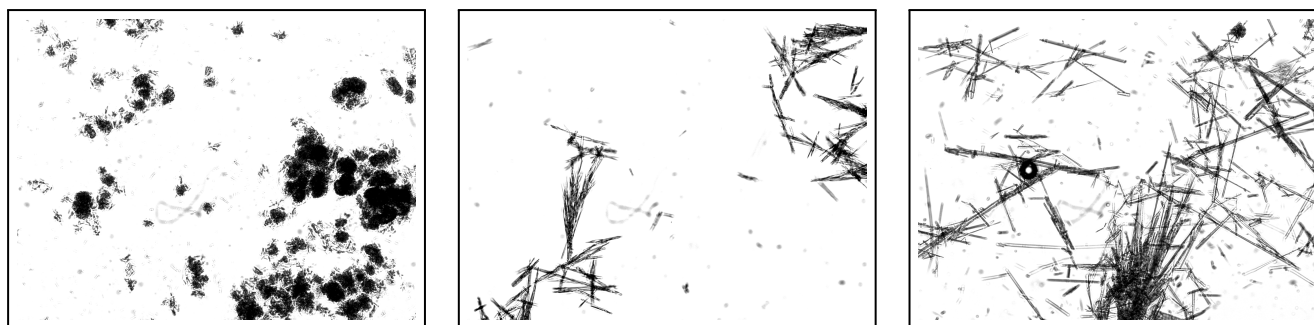
La prueba de Fehling, al igual que la de Benedict y Barfoed, también permite determinar la presencia de carbohidratos reductores. Si bien el mecanismo es análogo al de Benedict, en donde la coloración observada se debe a la reducción del ion cobre (II) a cobre (I), esta reducción sucede únicamente a través de ácidos carboxílicos, los cuales se obtienen a partir de la oxidación del grupo aldehído de los carbohidratos. En muchos casos, la reacción permite distinguir entre aldosas y cetosas reductoras, dado que las cetosas no pueden oxidarse a ácidos carboxílicos, a menos que sean  $\alpha$ -hidroxicetonas. Es por esta razón que en las muestras problema, la fructuosa, a pesar de ser una cetona da positivo, pues es posible que debido al medio alcalino, se tautomerice la estructura, produciendo un alcohol el cual posteriormente se oxida a ácido. De esta forma, y a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio, se descarta la presencia de lactosa en la muestra problema.

Por otro lado, la maltosa, si bien no es un monosacárido, da positivo a la reacción dado que ésta procede sobre la cadena abierta, la cual presenta el aldehído propio de la glucosa [10].

## 2.5 Seliwanoff

El principio de funcionamiento de la prueba de Seliwanoff consiste en que: las cetosas, como la fructuosa, en presencia de calor y en un medio ácido, forman un derivado de furfural el cual se combina con el resorcinol presente en la solución formando un compuesto de color rojo. Esta prueba es específica para cetosas, razón por la cual se esperaba que los únicos resultados positivos fueran para la fructuosa y la sacarosa (el cual contiene fructuosa), sin embargo, como se observa en la Tabla 1, también se observó un resultado positivo para la glucosa, la cual corresponde con una aldosa.

A nivel experimental, se observó un color ligeramente amarillo para la muestra problema, lo cual bien podría asociarse a la presencia de cetosas en la misma. Sin embargo, al considerar los tiempos de la reacción, la coloración tuvo lugar en tiempos análogos a los observados para el falso positivo de la glucosa, los cuales fueron considerablemente superiores a los de la sacarosa. A partir de esto se considera que la muestra tuvo, en realidad un resultado negativo para la prueba.

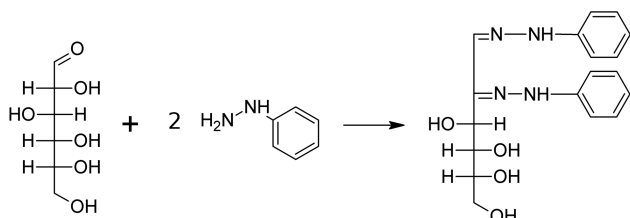


**Figura 1.** De izquierda a derecha: maltosa, glucosa y la muestra problema. Imágenes tomadas con una cámara CCD Olympus a una magnificación de 20 x.

## 2.6 Osazone

Los resultados de la prueba de Osazone se muestran en la [Figura 1](#), en ella se pueden observar los círculos de agujas característicos para disacáridos reductores como la maltosa y la lactosa, y las agujas propias de los monosacáridos reductores. De la [Tabla 1](#), la sacarosa no formó cristales dado que es la única que no constituye un azúcar reductor.

La reacción tiene lugar cuando un azúcar reductor reacciona con dos equivalentes de fenilhidrazina, las cuales sustituyen el grupo carbonilo y el OH del carbono  $\alpha$ , en la cadena abierta, como se observa en el [Esquema 2](#).



**Esquema 2.** Formación de la osazona de la glucosa.

Los resultados de la prueba de Osazone, confirman los resultados obtenidos hasta el momento, los cuales apuntan a que la muestra problema es xilosa, o arabinosa, dos aldopentosas, que no son distinguibles a partir de las pruebas bioquímicas realizadas en el laboratorio. Sobre esta última vale la pena mencionar que esta se encuentra presente en algunas plantas como componente de las paredes celulares y bacterianas como es el caso de los bacilos de la tuberculosis, por lo que puede jugar un papel importante en la tipificación de estos organismos y, así mismo, el control de enfermedades emergentes en la población que pueden constituir un problema de salud pública. Adicionalmente, este carbohidrato se encuentra presente también en la goma arábica, la cual es ampliamente usada en la industria de alimentos como agente gelificante.

## ■ CONCLUSIONES

Usando pruebas bioquímicas, fue posible establecer la naturaleza de azúcar reductor de la muestra problema. Adicionalmente, la prueba de Fehling en conjunto con la reacción

de Seliwanoff permitió determinar la presencia del grupo aldehído en la muestra. La formación de cristales tipo aguja, en la prueba de Osazone, confirma la presencia de un azúcar monosacárido, limitando la identidad del mismo a xilosa y arabinosa, dos aldosas que no pueden ser distinguidas por los métodos aquí reportados.

Cada uno de las reacciones fue explicada, junto con los resultados obtenidos para los estándares y las posibles identidades de las muestras problema. Todos los resultados observados fueron consistentes, salvo por la glucosa en la reacción de Seliwanoff.

Por último, dada la importancia biológica de los carbohidratos, se hizo una breve introducción sobre la presencia de los azúcares trabajados en organismos vivos, junto con sus funciones principales en ellos.

## ■ REFERENCIAS

- [1] Darrell D Ebbing and Steven D Gammon. *Química general*. Cengage Learning Editores, 2010.
- [2] Gustavo Blanco and Antonio Blanco. *Medical Biochemistry*. Academic Press, 2017.
- [3] David L Nelson, Albert L Lehninger, and Michael M Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [4] David W Martin, Harold A Harper, Peter A Mayes, and Victor W Rodwell. *Bioquímica de Harper/Harper's biochemistry*. Number 577.1. El Manual Moderno, 2001.
- [5] Carbohidratos en la dieta: Medlineplus en español. <https://medlineplus.gov/spanish/carbohydrates.html>. Accessed: Mar 12, 2019.
- [6] Kenneth W Raymond. *General organic and Biological Chemistry: An integrated approach*. John Wiley & Sons, 2013.
- [7] S Harisha. *An introduction to practical biotechnology*. Firewall Media, 2005.

- [8] C Barfoed. Ueber die nachweisung des traubenzuckers neben dextrin und verwandten körpern. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 12(1):27–32, 1873.
- [9] William A Bonner, Albert J Castro, Rafael Pérez Alvarez-Ossorio, Franco Fernández González, et al. *Química orgánica básica*. 1976.
- [10] Robert J Ouellette and J David Rawn. *Principles of organic chemistry*. Academic Press, 2015.