

6. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

ENUNCIADO PROBLEMA

De la muestra proporcionada indique el tipo de carbohidratos que contiene y la concentración de cada uno de ellos.

CUESTIONARIO PREVIO

1. ¿Cómo se clasifican los carbohidratos con respecto a su solubilidad y su digestibilidad?
2. Completar la Cuadro 1:

Cuadro 1. Características de los métodos para cuantificar carbohidratos

Método	Tipo de prueba*	Fundamento	Reacción química	¿Qué tipo de carbohidratos cuantifica?	El carbohidrato cuantificado, ¿es soluble o insoluble en etanol al 80%?
Fenol-sulfúrico					
Ácido 3,5-dinitrosalicílico					
Reacción con yodo					
Reacción con carbazol					

*Tipo de prueba se refiere a si es gravimétrica, volumétrica, colorimétrica, etc.

3. Indicar dos alimentos en los cuales puedan ser utilizados cada uno de los métodos para determinar carbohidratos. Justificar su respuesta con las Normas Oficiales Mexicanas o de la AOAC.
4. ¿Qué es un azúcar reductor? Escribir la estructura química desarrollada de un azúcar reductor y otra de un azúcar no reductor, marcando la diferencia.
5. ¿Qué tratamiento se debe realizar a un azúcar no reductor para transformarlo a reductor?

1ª ETAPA. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

PROCEDIMIENTO

La cuantificación y caracterización de carbohidratos se realiza en tres partes:

1. Separar los carbohidratos solubles e insolubles en solución de etanol a 80 %.
2. En la fracción de carbohidratos solubles en etanol se cuantifica su concentración empleando los métodos de Fenol-sulfúrico y Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).
3. Del residuo insoluble en solución etanólica se deberán solubilizar polisacáridos y realizar la reacción colorida con yodo y reacción con carbazol.

A continuación se muestra el procedimiento previo a seguir para cada una de las determinaciones:

A) Separación de carbohidratos.

Colocar en un sistema de reflujo 1 g de muestra (de preferencia desengrasada y seca) con 100 mL de etanol al 80% o en un sistema de agitación empleando parrilla, durante 1 h en ambos casos.

Después del tiempo de separación de hidratos de carbono, dejar enfriar y centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min para separar ambas fases. Se deberá medir el volumen del sobrenadante y reservar para su análisis posterior.

Transferir el material insoluble a una caja Petri de vidrio previamente puesta a peso constante. Secar el material insoluble en estufa convencional a 80 °C hasta peso constante. Reservar para su análisis posterior.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

TRABAJAR DISOLVENTE Y EL SISTEMA DE REFLUJO EN LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN.

B) **En el sobrenadante**, realizar las siguientes determinaciones:

1. Reacción con fenol-sulfúrico. Seguir el procedimiento indicado en el manual de metodologías.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

MANIPULAR EL ACIDO SULFÚRICO CONCENTRADO Y EL FENOL EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN Y CON EL EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL NECESARIO.

2. Reacción con DNS.
 - i. DNS en el sobrenadante de manera directa. Seguir el procedimiento indicado en el manual de metodologías.
 - ii. DNS en el sobrenadante después de **realizar una hidrólisis vía enzimática**.
Hidrólisis enzimática: diluir 2.5 mL del sobrenadante con 7.5 mL de agua destilada. Adicionar 1.0 mL de solución de invertasa, mantenga la solución a 55 °C durante 15 min y detener la reacción sumergiendo el tubo en un baño de agua hirviendo. Al mismo tiempo preparar un blanco con etanol diluido e invertasa, sometido a las mismas condiciones.

C) **En el residuo insoluble:**

1. Pulverizar residuo en mortero.
2. Determinar el contenido de proteína total y cenizas del residuo seco.
3. Colocar en un vaso de precipitados aproximadamente 0.3 g del residuo seco pulverizado, adicionar 5 mL de una solución 2 M de NaOH y 5 mL de agua destilada. Colocar en un baño de agua a 80 °C durante 15 min. Llevar la muestra a temperatura ambiente y neutralizar con una solución 2 M de HCl. Verificar que el pH se encuentre en 7 ± 0.5 . Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min para separar el material insoluble. Recuperar sobrenadante y medir el volumen.

A partir del sobrenadante realizar las siguientes determinaciones:

- i. Reacción colorida con yodo. Seguir el procedimiento indicado en el manual de metodologías.
- ii. Reacción con carbazol. Seguir el procedimiento indicado en el manual de metodologías.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

MANIPULAR REACTIVOS EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN Y CON EL EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL NECESARIO.

CUESTIONARIO DE RESULTADOS

1. De acuerdo a los componentes de la muestra analizada y a la clasificación de los carbohidratos por solubilidad, ¿cuáles son los carbohidratos solubles y cuáles no son solubles en solución etanólica al 80 %? Justificar con base en sus propiedades fisicoquímicas.

Considerando la extracción de hidratos de carbono en etanol al 80% y sus reacciones.

2. ¿Qué tipo de carbohidratos se determinan con el método Fenol-sulfúrico y cuál es su concentración (%) en la muestra original? Incluir ejemplo de cálculos.
3. ¿Qué tipo de carbohidratos se determinan con el método DNS directo y cuál es su concentración (%) en la muestra original? Incluir ejemplo de cálculos.

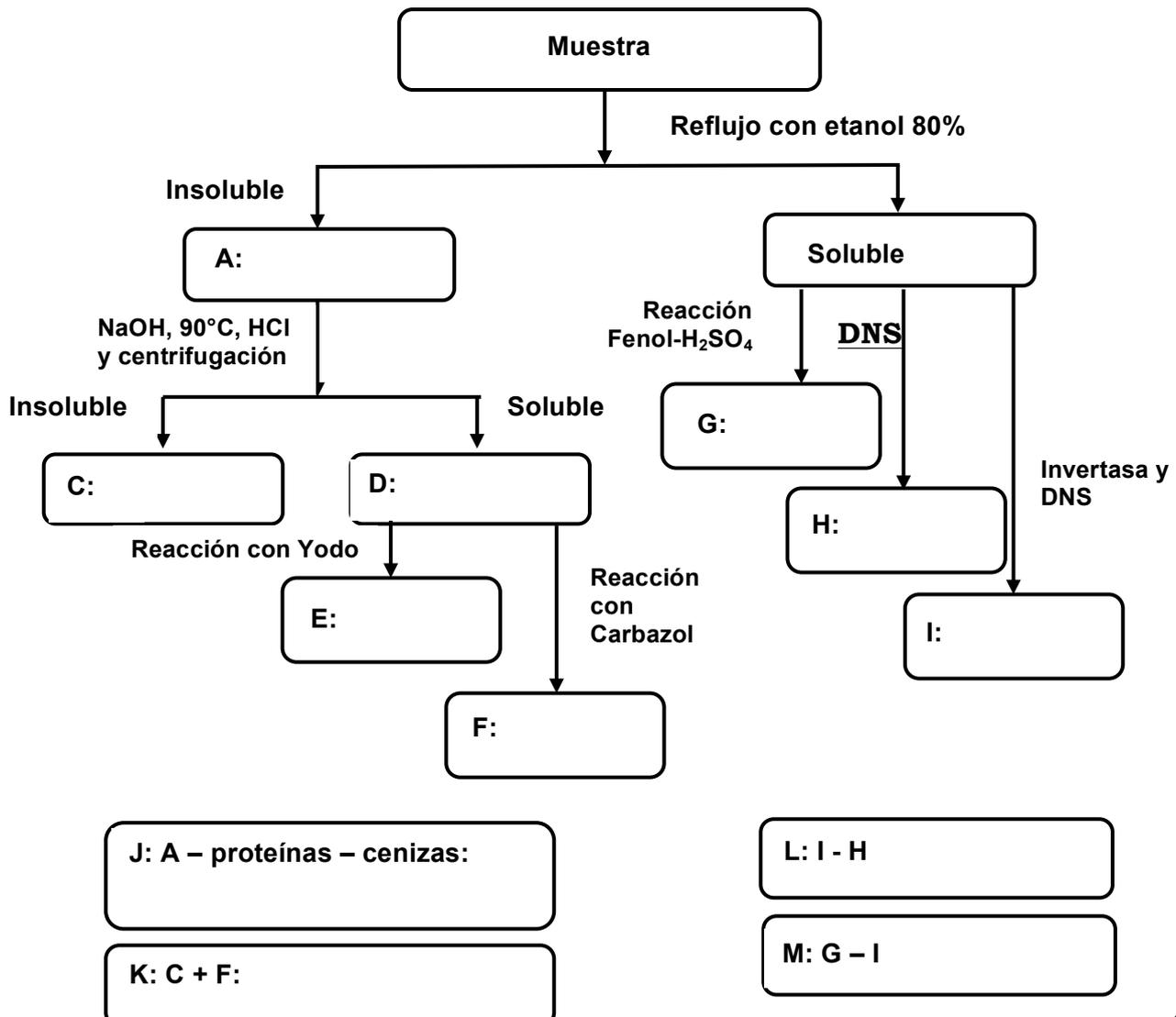
- ¿Encontró diferencia en la respuesta con el método de DNS antes y después del uso de la invertasa? Si/No, ¿Qué significa? Incluir los cálculos, concentraciones (%) en muestra original y tipo de carbohidratos obtenidas en cada caso.
- ¿Existe diferencia en los valores obtenidos por DNS después de la hidrólisis enzimática y los obtenidos con la reacción de fenol-sulfúrico? Si/No Explicar resultados e incluir cálculos, concentraciones (%) y tipo de cabohidratos.

Considerando el sobrenadante proveniente del material insoluble en etanol al 80%.

- ¿Cuál es la concentración (%) de los carbohidratos que reaccionaron con yodo en la suspensión preparada con el residuo de material insoluble en etanol? Incluir cálculos y tipo de carbohidrato cuantificado en material insoluble y muestra original.
- ¿Cuál es la concentración (%) de los carbohidratos que reaccionaron con carbazol, en la suspensión del residuo de material insoluble en etanol? Incluir cálculos y tipo de carbohidrato determinado en material insoluble y en muestra original.
- ¿La suma del peso de los carbohidratos medidos en el material insoluble, las proteínas y cenizas de este material insoluble corresponden a la masa del material recuperado? Si/No ¿Cómo se puede explicar este resultado? Incluir cálculos para justificar su respuesta.

Considerando todos los resultados.

- Contestar el siguiente diagrama, con el tipo de hidratos de carbono determinados y su concentración. Incluir el diagrama en su informe.



10. El contenido de hidratos de carbono en la muestra analizada, ¿corresponde con el de la etiqueta? Si/No. Realizar análisis comparativo entre valores y justificar diferencias en los métodos de cuantificación.
11. Investigar otros métodos que puedan emplearse para la cuantificación directa o indirecta de los carbohidratos determinados en la práctica.

REFERENCIAS

- Hernández Martínez, A. (2020) Caracterización de ácidos urónicos-Método de Carbazol. <https://cutt.ly/Kn38Xnb>
- Hernández Martínez, A. (2020) Caracterización de carbohidratos totales- Método Fenol Sulfúrico. <https://cutt.ly/Kn38Xnb>
- Vega Pérez, A. (2020) Caracterización de mono- y oligosacáridos. Método DNS. <https://cutt.ly/Kn38Xnb>
- Vega Pérez, A. (2020) Caracterización polisacáridos-Método Reacción con yodo. <https://cutt.ly/Kn38Xnb>
- Abcam. (2019) Total Carbohydrate Quantification Assay Kit. <https://cutt.ly/qn47FWJ>
- Badui Dergal, S. (2006) Capítulo 2 Hidratos de Carbono. Química de Alimentos Pearson Educación, Cuarta Edición. México. https://www.academia.edu/28233446/Qu%C3%ADmica_de_los_alimentos_badui_4edi
- Brummer Y., Cui, SW. (2005) Chapter 2 Understanding Carbohydrate Analysis. En el libro: Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications. <https://cutt.ly/7n45hQ9>
- Iturbe Chiñas, A. F. y Sandoval Guillén, B. J. (2011). Análisis de alimentos: fundamentos y técnicas. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://cutt.ly/tnxhBb2>
- Nielsen, S. (2010) Chapter 9 Protein Analysis. Chapter 15 Protein Separation and Characterization Procedures. Chapter 21 Spectroscopy. Food Analysis. Springer. Fourth Edition. <https://cutt.ly/K9SSmaL>