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.

Objetivos de aprendizaje

Identificará el fundamento de los métodos fenol sulfúrico, ácido-3,5-dinitrosalicílico, reacción con yodo y reacción con carbazol, empleados para la cuantificación de hidratos de carbono.

• Calculará la concentración de algunos carbohidratos de una muestra, a partir de datos obtenidos de métodos espectrofotométricos.

• Identificará los hidratos de carbono con base a sus propiedades fisicoquímicas, para su aplicación tecnológica en distintas matrices alimentarias.

1ª ETAPA. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

CUESTIONARIO Y ACTIVIDADES PREVIAS

1. Revisar con atención los videos relacionados con los métodos:
a) fenol-sulfúrico, b) ácido- 3,5-dinitrosalicílico (DNS), c) reacción con yodo y d) reacción con carbazol.
2. ¿Cómo se clasifican los carbohidratos con respecto a su solubilidad?
3. Completar el Cuadro 1:

Cuadro 1. Características de los métodos para cuantificar carbohidratos

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

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

4. Escribir las reacciones químicas que se llevan a cabo en cada uno de los métodos anteriores.
5. Explicar la razón de utilizar etanol al 80% en la separación de los carbohidratos de la muestra.
6. ¿Qué es un azúcar reductor? Escribir una estructura química de un azúcar reductor y otra de un no reductor, marcando la diferencia.
7. ¿Qué tratamiento se debe realizar a un azúcar no reductor para transformarlo a reductor?
8. Diseñar un diagrama con el procedimiento y las técnicas a utilizar, así como los cálculos para preparar las soluciones del estándar.

PROCEDIMIENTO

La cuantificación y caracterización de carbohidratos se realiza en tres partes:
1. Separar los carbohidratos solubles e insolubles en etanol.
2. En la fracción soluble en etanol, realizar las determinaciones de Fenol-sulfúrico y DNS.
3. En la fracción insoluble, realizar la reacción colorida con yodo y reacción con carbazol.

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

1) Separación de carbohidratos.

1) Por equipo, pesar 10 g de muestra en un vaso de precipitados (de preferencia desengrasada y seca) con 50 mL de etanol al 80 % y tapar el recipiente.

2) Separar carbohidratos por solubilidad, en parrilla de agitación, durante 1 h a temperatura ambiente.

3) Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min para separar ambas fases. Se deberá medir el volumen del sobrenadante y reservar para el análisis de hidratos de carbono solubles en etanol.

4) Transferir el material insoluble a una caja Petri de vidrio previamente puesta a peso constante. Secar en estufa a 90 °C hasta peso constante. Reservar el residuo insoluble para el análisis de polisacáridos posteriormente.

Preparación de curvas estándar para métodos: fenol sulfúrico, DNS, Reacción con yodo y Reacción con Carbazol.

5) Se asignarán 4 equipos en el grupo para preparar una de las cuatro curvas patrón de los métodos a estudiar.

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

2) 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 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 (15 mg/mL), mantenga la solución a 55º C durante 20 min y detenga la reacción sumergiendo en un baño de agua hirviendo. Al

mismo tiempo preparar un blanco con etanol diluido e invertasa, sometido a las mismas condiciones.

3) En el residuo insoluble:

i) Pulverizar residuo en mortero.

ii) Determinar el contenido de proteína total y cenizas del residuo seco.

iii) Colocar 0.3 g del residuo seco pulverizado en un vaso de precipitados de 150 mL, adicionar 5 mL de una solución 2 M de NaOH. Colocar en un baño de agua a 90º 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 15 min para separar el material insoluble. Recuperar sobrenadante y medir el volumen.

A partir del segundo sobrenadante realizar las siguientes determinaciones siguiendo el procedimiento indicado en el manual de metodologías.

i. **Reacción colorida con yodo**.

ii. **Reacción con carbazol**.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:
MANIPULAR REACTIVOS EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN Y CON EL EQUIPO DE PROTECCIÓN NECESARIO.

CUESTIONARIO DE RESULTADOS

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

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

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

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

d) ¿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. Justificar respuesta.

e) ¿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 carbohidratos que podrían encontrarse en ese grupo.

Considerando el material insoluble en etanol al 80 % y las determinaciones realizadas.

f) ¿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.

g) ¿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.

h) ¿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.

i) Incluir el diagrama de la página 41 de la bitácora con el tipo y concentración de los hidratos de carbono cuantificados en la muestra analizada.

Videos de referencia

Videos localizados en la carpeta del AMyD 1618 Laboratorio de Alimentos I, Unidad 5 https://cutt.ly/txrLxCL.

- 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. https://cutt.ly/Kn38Xnb

Otras referencias

- Abcam. (2019) Total Carbohydrate Quantification Assay Kit. https://cutt.ly/qn47FWJ.

- Badui Dergal, S. (2006) Capítulo 2 Hidratos de Carbono. En el Libro: Química de los Alimentos. Pearson Educación. México. https://cutt.ly/Rj5jo8f

- 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. UNAM. https://cutt.ly/tnxhBb2.

- Nielsen, S. (2010) Chapter 10 Carbohydrate Analysis & Chapter 21 Basic Principles of Spectroscopy. En el libro: Food Analysis. Springer. Fourth Edition. https://cutt.ly/Kvl6L0x