

TRABAJO PRACTICO N° 4.

HIDRATOS DE CARBONO.

Objetivos

- Analizar la naturaleza y el comportamiento de algunos hidratos de carbono de uso farmacológico y/o aplicación industrial.
- Resaltar la importancia de los alginatos en las industrias farmacéutica y alimenticia, así como la proyección a futuro en Salud.
- Adquirir destrezas para identificar muestras de alginato de sodio.
- Investigar la presencia de hidratos de carbono en las especies vegetales en estudio.

Introducción

Los hidratos de carbono son polialcoholes aldehídicos o cetónicos, de fórmula general $C_n(H_2O)_n$, que pueden haber sufrido transformaciones tales como oxidaciones, reducciones, aminaciones o polimerizaciones entre moléculas iguales o no, pero del mismo tipo (originando así homo y hetero polisacáridos), o con otras moléculas con naturaleza distinta a los hidratos de carbono (glicósidos).

Pueden clasificarse en:

Monosacáridos: ej. glucosa, levulosa, manosa, xilosa.

Disacáridos: - no reductores: ej. sacarosa, trehalosa.
- reductores: ej. maltosa, lactosa.

Trisacáridos: ej. rafinosa, gencianosa.

Tetrasacáridos: ej. estaquirosa.

Polisacáridos: pueden desempeñar distintas funciones, como ser sustancias de reserva, de sostén (constituyendo las paredes celulares), regulación osmótica, entre otras.

Dada su complejidad molecular presentan variaciones importantes en sus propiedades. Por ejemplo en lo que a solubilidad se refiere, existen polisacáridos que con el agua dan soluciones coloidales (como algunas gomas), otros que tan sólo se hinchan en agua caliente (almidón) y otros que son totalmente insolubles (celulosa).

Por hidrólisis enzimática o por medio de ácidos diluidos, se pueden descomponer en las unidades o bloques constituyentes (monosacáridos, disacáridos), y en base a ello se los clasifica en:

Pentosanós: arabanos, xilanos.

Pentosanós mixtos: gomas, mucílagos, hemicelulosas, pectinas.

Multipentosanós: ramnanos.

Hexosanós: glucosanós, fructosanós, manosanós, aminoglucosanós.

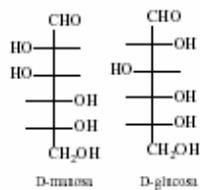
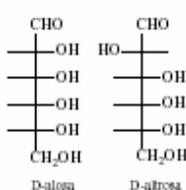
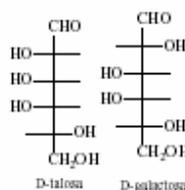
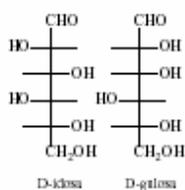
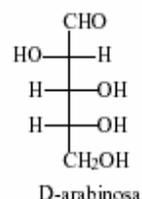
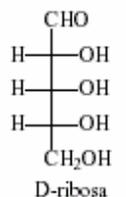
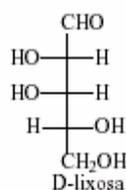
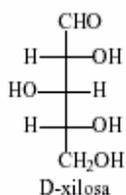
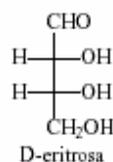
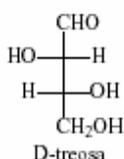
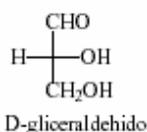
Hexosanós mixtos: pectinas.

Otra clasificación los agrupa en forma más sencilla, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas:

Hexosanós o almidones: glucosanós, fructosanós.

APLICACIONES ALIMENTICIAS	
Espesante, estabilizante o propiedades de suspensión en:	Jugos de fruta Salsas Cremas Cerveza
Propiedades gelificantes en:	Alimento para animales Gelatinas Relleno de aceitunas
Propiedades de control en:	Fabricación de quesos Helados Cubiertas de frutas en pastelería
APLICACIONES FARMACÉUTICAS	
Propiedades espesantes en:	Jarabes Emulsiones Lociones Cremas
Características de rápida hidratación en:	Desintegración de tabletas Control de irrigación de drogas
Propiedades gelificantes en:	Polvos de impresión dental
APLICACIONES TEXTILES	
Propiedades espesantes en:	Gomas para impresión Baños de tinta
Propiedades de limpieza en:	Sistemas reactivos de tinta Sistemas de dispersión de tinta
OTRAS APLICACIONES INDUSTRIALES	
Propiedades de formación de película	Industria de papeles calco Sellado de conservas
Interacción con silicatos en:	Electrodos de soldadura
Propiedades espesantes y estabilizantes en:	Barnices para cerámicas Pinturas cremosas

Serie D – Fórmulas según la Proyección de Fischer.



Características generales de algunos Hidratos de Carbono

Glucosa: es la α -D-glucopiranososa con una molécula de agua de hidratación o anhidra, que contiene no menos de 99 % de $C_6H_{12}O_6$, calculado para la sustancia desecada.

Sinonimia: azúcar de uva, dextrosa.

Características generales: polvo blanco, cristalino o granuloso, inodoro y con sabor dulce.

Usos: alimento por vía oral, rectal o parenteral. Edulcorante, sustituto de la sacarosa en jarabes y como excipiente.

Conservación: en recipientes de cierre perfecto.

Lactosa: es la 4-(β -D-galactopiranosil)-D-glucosa, con una molécula de agua de cristalización o anhidra que contiene no menos de 98,5 % de $C_{12}H_{22}O_{11}$ calculado para la sustancia desecada.

Sinonimia: azúcar de leche.

Caracteres generales: masas cristalinas aglomeradas o polvo blanco cristalino, inodoro aunque absorbe fácilmente los olores y con sabor débilmente dulce.

Usos: diluyente, en alimentación para lactantes, con precaución.

Sacarosa: es el azúcar obtenido de *Saccharum officinarum* (= *S. officinalis*) var Linneo y sus variedades de cultivo (Poaceae), o de *Beta vulgaris* L. var esculenta (Chenopodiaceae).

Características generales: se presenta en grandes cristales anhidros, prismas monocíclicos, transparentes, duros, inalterables en el aire; o más generalmente en polvo, panes, gránulos o trozos irregulares, cristalinos, blancos, secos, sin olor, y con sabor dulce característico.

Usos: en preparaciones farmacéuticas, demulcente. En altas concentraciones es bacteriostático.

Goma arábica: es la exudación gomosa desecada del tronco y las ramas de varias especies de *Acacia* (Mimosaceae) y principalmente *Acacia senega*, *A. arábica* y *A. verek*. No debe contener más de 1 % de sustancias insolubles en agua, ni más de 15 % de agua, y por incineración no debe dejar más de 5 % de cenizas.

Sinonimia: Goma de Acacia, Goma del Senegal.

Caracteres generales: se presenta en forma de lágrimas redondeadas u ovoides de tamaño variable, frágiles, inodoras, sabor mucilaginoso y algo dulzaino. Calentada a unos 50 °C se pulveriza.

Composición química: constituida principalmente por arabina, que es una mezcla compleja de sales de Ca, Mg y K del ácido arábigo. El ácido arábigo es un polisacárido ramificado que por hidrólisis da arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido glucurónico.

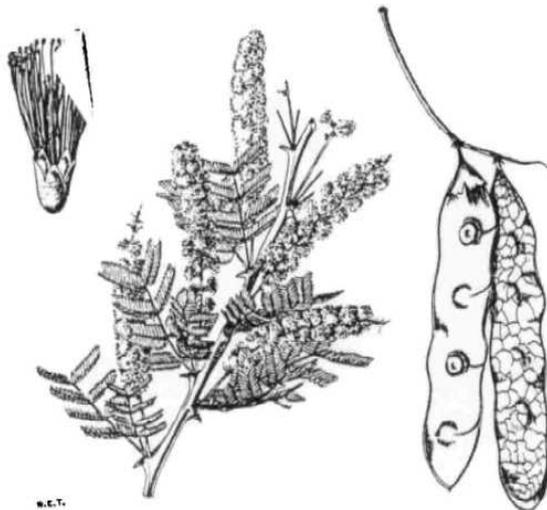
Usos: emulsionante y suspensor, demulcente y emoliente.

Goma tragacanto: es la exudación gomosa de especies de *Astragalus* (Fabaceae), en especial de *A. gummifer*, *A. adscendens*. No debe contener más de 2 % de otras sustancias orgánicas extrañas y por incineración no debe dejar más de 4 % de cenizas.

Sinonimia: tragacanto.

Caracteres generales: contiene alrededor de 60 - 70 % de basarina, que es un complejo de ácidos polimetoxilados que se hincha en agua, pero no se disuelve. Y un 30 % de tragacantina que es hidrosoluble y por hidrólisis da ácido galacturónico, fucosa, xilosa, galactosa y arabinosa. Es un polisacárido ácido.

Usos: se emplea en farmacia como agente de suspensión de mezcla de polvos insolubles, como agente emulsionante de aceites y como adhesivo de píldoras y pastillas.



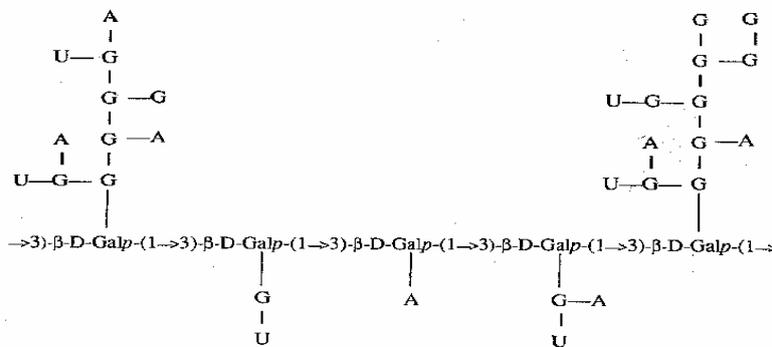
Acacia senegal flower, flowering branch, and mature pods.
(from *Flora of West Tropical Africa*)

***Acacia senega* (Mimosaceae)**



Astragalus gummifer

***Astragalus gummifer* (Fabaceae)**



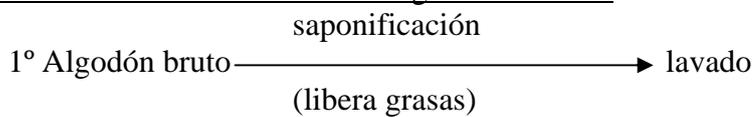
Gum arabic : structural hypothesis

G = β -D-Galp
A = short chains of L-Araf linked (1 \rightarrow 3)
or α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Araf
U = α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA or β -D-GlcA (4-OMe)

Algodón hidrófilo: está constituido por los pelos de las semillas de diferentes especies de *Gossypium* (Malvaceae), exento de sustancias extrañas y sustancias grasas, blanqueado y cardado, dispuesto en capas uniformes.

Descripción: se presenta como finos pelos, filamentos blancos, suaves, inodoros, de relativa resistencia a la tracción.

Procedimiento de transformación en algodón hidrófilo:



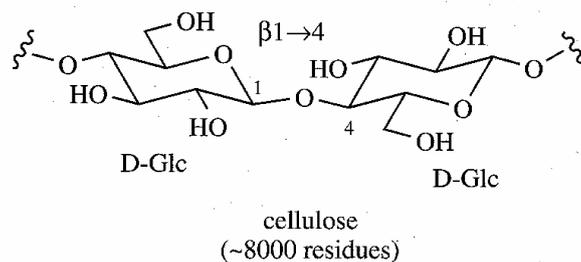
2° Decoloración con NaClO ó H₂O₂ —————> lavado

3° Neutralización con HCl —————> lavado

4° Secado y cardado —————> lavado

Composición química: principalmente celulosa, con pequeñas cantidades de minerales y humedad en relación con el medio ambiente. El algodón natural contiene materias colorantes y está cubierto por una delgada película grasa cerosa y resinosa que lo hace impermeable a los líquidos, por ello se lo somete al procedimiento para hacerlo absorbente e hidrófilo, además de ser blanqueado.

Sinonimia: algodón absorbente, algodón purificado.



Miel: es el producto natural elaborado por las abejas (*Apis mellífera* L. Apidae).

Características: es de consistencia de jarabe espeso, translúcida y de color amarillo o pardo amarillento; después de algún tiempo se concreta en una masa blanda, granulosa cristalina, de color blanco amarillento que se licúa nuevamente entre 40 y 50 °C; con el olor particular aromático y sabor dulce, aromático característico.

Composición química: contiene del 50 al 90 % de una mezcla equimolecular de glucosa, fructosa y agua, además de 0,1 % al 10 % de sacarosa, pequeñas cantidades de dextrinas y ácido fórmico.

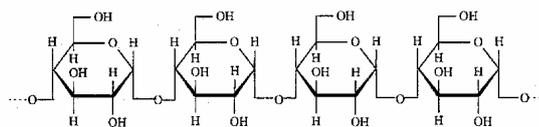
Agar-agar: es una sustancia coloidal desecada que se puede obtener a partir de distintas algas rojas pertenecientes a los géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria* principalmente.

Sinonimia: gelosa.

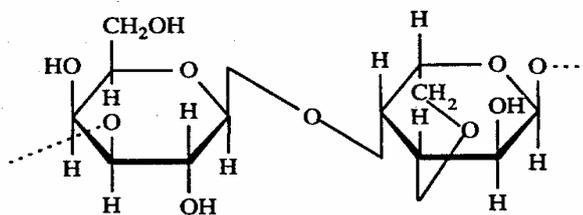
Características macroscópicas: se presenta como polvo o filamentos blancos translúcidos y quebradizos al estado seco, y que se reblandecen con agua caliente. Olor muy suave y sabor mucilaginoso.

Composición química: 20 % de agua, 4 – 5 % de materias minerales, trazas de lípidos, y 4 – 5 % de compuestos nitrogenados.

Uso: en Farmacia como agente emulsionante, en la preparación de óvulos y supositorios. En medicina como laxante mecánico. En microbiología es la base de la preparación de los medios de cultivo. En la industria se acostumbra mezclar con gelatina en la elaboración de jaleas. También tiene aplicación en la industria cosmética.



Amylose



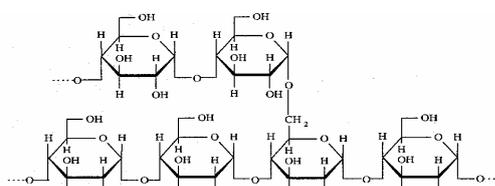
Agarose

Carragaen: polisacárido obtenido de las frondas desecadas y blanqueadas al sol de *Chondrus crispus* L. (Rhodophyceae).

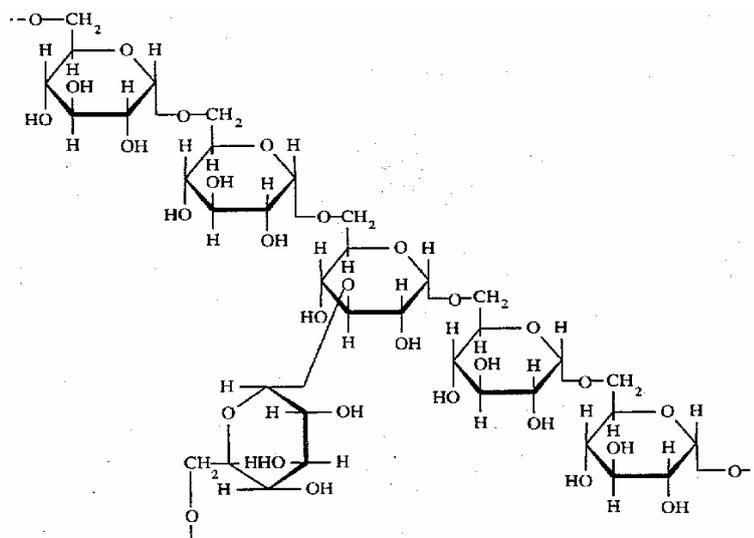
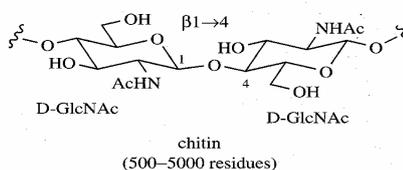
Características macroscópicas: la droga seca se presenta como una masa constituida por pequeñas tiras entrecruzadas, blanco amarillento, translúcidas, de consistencia córnea, con ligero olor a mar, sabor salado y mucilaginoso.

Composición química: 15 % de agua, 15 % de sustancias minerales ricas en Cl⁻, I⁻, Br⁻; 2 % de lípidos, 10 % de proteínas, 55 – 60 % de hidratos de carbono.

Uso: el carragenano natural o parcialmente degradado es eficaz como protector en las úlceras gástricas y duodenales, la actividad está relacionada con la presencia de sulfatos en el polisacárido. En la industria cosmética y alimenticia se usa como agente gelificante.



Amylopectin

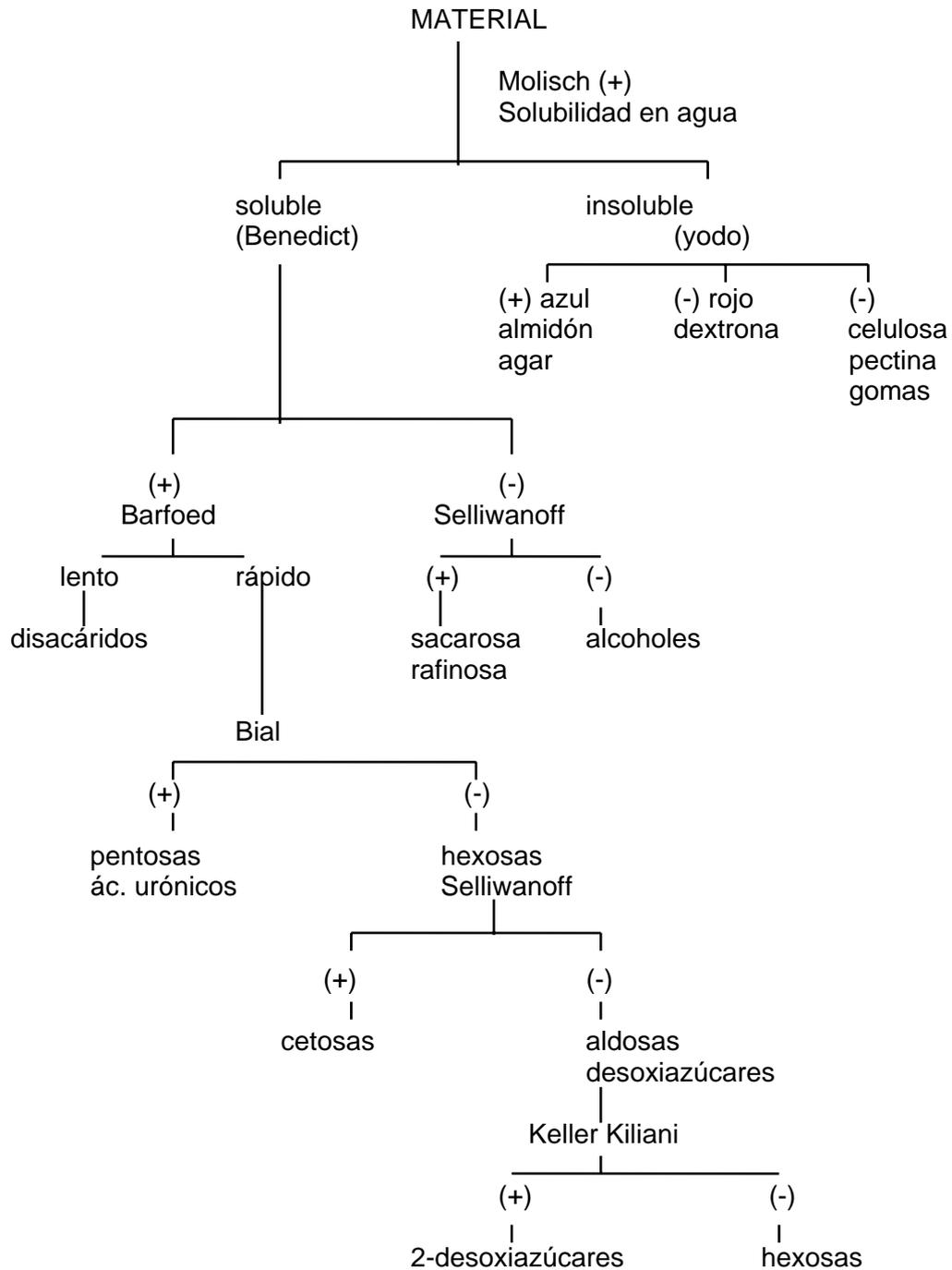


Dextrano

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

1) Identificación sistemática de Hidratos de Carbono

Se ensayará solo la reacción de Molisch sobre la **Fracción A** y el infuso (**I**). A los fines didácticos se incluye la Marcha sistemática completa seguida de los fundamentos de las reacciones.



Fundamentos - Técnicas

Reacción de Molisch: (α - naftol en etanol al 10 % P/V).

Técnica: colocar 2 ml de muestra, agregar 2 gotas del reactivo de Molisch, y cuidadosamente agregar por las paredes del tubo H_2SO_4 . La observación en la interfase de un **anillo de color púrpura violáceo**, es indicativa de la presencia de hidratos de carbono.

Reacción de Benedict: (solución de 17,3 g de citrato de sodio y 10 g de Na_2CO_3 anhidro en 60 ml de agua destilada, a la que se le añadió lentamente y agitando 1,73 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ en 15 ml de agua. La mezcla se llevó a 100 ml).

Permite diferenciar sustancias **reductoras** de no reductoras. Puede utilizarse también el reactivo de Fehling, y en ambos casos la aparición de un **precipitado rojo ladrillo** (Cu_2O), indicará resultado positivo.

Técnica: se colocan en un tubo de ensayo cantidades iguales de reactivo y extracto. La mezcla se calienta a Baño María.

Reacción de Barfoed: (solución de 1,33 g de acetato cúprico $Cu(CH_3CO_2)_2 \cdot H_2O$ en 15 ml de agua, se adicionan 3 ml de ácido acético y se afora a 20 ml con agua destilada). Permite diferenciar de modo grosero un monosacárido de un di- o polisacárido. En caso de ser positiva (monosacárido), aparece un **precipitado rojo ladrillo** (Cu_2O).

Técnica: a 0,5 ml de reactivo se le adicionan 0,5 ml de solución problema y se calienta en baño de agua. La aparición de **precipitado rojo ladrillo** a los 3-5 minutos indica la presencia de **monosacáridos**, en caso negativo continuar el calentamiento hasta los 60 minutos ya que los oligosacáridos de bajo peso molecular pueden reaccionar en el tiempo.

Reacción de Selliwanoff: (0,30 g de resorcinol disueltos en 100 ml de HCl al 12,5 %. Se basa en la mayor y más rápida formación del 5-hidroximetilfurfural por las cetosas que por las aldosas, frente a ácidos diluídos.

Técnica: a 0,5 ml de reactivo se le agregan 0,5 ml de la solución problema, y 0,5 ml de HCl al 25 %, la mezcla se calienta a baño María. Si el líquido toma una **coloración roja intensa** a los 2-10 minutos, (a veces con precipitado marrón), indica presencia de **cetosas**. Las aldosas, en las mismas condiciones, dan un color mucho más tenue.

Reacción de Bial: (150 mg de orcinol, disueltos en 50 ml de HCl concentrado añadiendo 2 o 3 gotas de $FeCl_3$ al 10 %). Se basa en la formación de furfural a partir de una pentosa, y una posterior reacción con orcinol. **Coloración verde** indica **pentosas**, la reacción es negativa para hexosas.

Técnica: Se calientan a baño María 3-5 ml del reactivo y cuando esté hirviendo se añades una gotas de la solución problema. Si hay pentosas aparece una coloración azul verdosa. Si se añade butanol el color pasa a la fase butanólica.

2) Análisis de los monosacáridos constituyentes mediante cromatografía analítica en papel

Sistema cromatográfico:

Cromatofolio de altura y ancho necesarios según la cantidad de muestras

Fase estacionaria: papel Whatman N° 1

Fase Móvil: butanol – piridina - agua (10:3:3).

Sustancia patrón: glucosa

Muestra 1: se usara **I** preparado en el TP 2 y secado mediante liofilización que se retomará con un volumen medido de agua.

Muestra 2: colocar 10 mg del **I** liofilizado en un vial provisto de cierre de teflón, adicionar 1 ml de TFA 2 M e hidrolizar en estufa a 121 °C durante 90 min; evaporar los restos de ácido en un baño a agua a 60 °C se obtiene así el infuso hidrolizado **Ih**.

Procedimiento: sembrar 10 gotas de muestra 1 y 2 y 3 gotas de la sustancia patrón a 1 cm de cada borde. Dejar secar el sembrado y efectuar el desarrollo ascendente con la fase móvil. Finalizada la cromatografía secar a temperatura ambiente.

Revelado: con vapores de Iodo (revelador universal no destructivo).

Revelado específico:

Reactivo 1: AgNO_3 al 40 % (para usar diluir 1:40 en acetona).

Reactivo 2: NaOH en etanol (1 ml de NaOH 10 M más 20 ml de etanol).

Reactivo 3: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 2,5 % en agua destilada.

Técnica: se realiza la inmersión del cromatograma en un recipiente que contenga el reactivo 1. Se deja escurrir y se lava exhaustivamente con el reactivo 2 usando la misma técnica de inmersión. Luego se fija con el reactivo 3 para evitar que se desvanezcan las manchas y para solubilizar el exceso de óxido de plata.

Los reactivos NO deben estar en solución acuosa para no disolver a los hidratos de carbono. El tiosulfato de sodio compleja y solubiliza la plata del óxido de plata que es el que ha quedado en el papel. La plata en forma de Ag^0 queda adherida al hidrato de carbono.

Los monosacáridos constituyentes serán identificados mediante el cálculo de los R_f correspondientes y de los R_g .

La comparación del extracto sin y con hidrolizado permitirá estimar la naturaleza de los hidratos de carbono constituyentes.

3) Determinación del porcentaje de azúcares totales. Método del fenol – ácido sulfúrico

Pesar exactamente una porción del Infuso liofilizado. Retomar con agua llevando a volumen final en un matraz de 5 ml.

Preparar una solución acuosa patrón de glucosa de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tomar distintas alícuotas (volúmenes de 0,05 ml a 0,45 ml) de la solución patrón y de la solución del extracto liofilizado de la planta, y llevar cada una a volumen final de 0,5 ml con agua destilada. Agregar a cada tubo 0,5 ml de una solución acuosa de fenol al 5 %, agitar en el vórtex y verter sobre la superficie de cada tubo 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, UTILIZANDO GUANTES, ANTEOJOS PROTECTORES Y CAMPANA. Luego de transcurridos 10 minutos, agitar en el vórtex y dejar enfriar 5 min más. Efectuar un blanco de reactivo con 0,5 ml de agua destilada.

Leer la absorbancia de cada tubo a 490 nm. Graficar Absorbancia versus μg de azúcares totales de la sustancia patrón. Extrapolar las alícuotas de la muestra, y determinar el porcentaje de azúcares totales en el liofilizado y en la muestra vegetal sometida a extracción.

NOTA: se utilizarán los extractos preparados según lo indicado en la actividad 1.

4) Búsqueda bibliográfica e identificación de alginatos

A- Buscar información actualizada (papers 2005 en adelante) a fin de cumplimentar el segundo objetivo de este práctico (importancia farmacéutica: nuevas aplicaciones, metodología de extracción, purificación y análisis).

B- Efectuar las siguientes reacciones de identificación a partir de una solución acuosa al 1 % P/V de la muestra de alginato (20 – 25 ml). Para preparar la solución, agregar el sólido sobre el líquido y agitar hasta disolver.

I) Tomar 5 ml de la solución muestra preparada anteriormente y agregar 0,5 ml de una solución de cloruro de calcio. Observar los resultados y justificarlos.

II) Tomar 1 ml de la solución muestra y agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido. Observar los resultados y justificarlos.

III) Tomar 1 ml de la solución muestra y agitando en vortex, agregar gota a gota (a intervalos de 30 segundos), hasta 1 ml de una solución ácida de sulfato férrico. Una coloración rosa-rojo cereza indicará resultado positivo. Observar y justificar.

BIBLIOGRAFIA

- Dominguez, J. A., “*Métodos de Investigación Fitoquímica*”. 1985. México, Limusa.
- FNA VI Ed., 1978.
- FA VII Ed., 2003
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. and F. Smith. “Colorimetric method of determination of sugars and related substances”. *Anal. Chem.* **28**: 350-356, 1956.
- Flores, M.L., “Estudio de las paredes celulares del alga roja *Iridaea undulosa* Bory”. *Tesis doctoral*, FCN, UNPSJB, 2000.
- Scherz, H. and Bonn, G., “*Analytical Chemistry of Carbohydrates*”. 1998. New York. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- British Ph., 1963.
- Informes Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios: 7° (1964), 17° (1974) y 41° (2009).