

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

RECONOCIMIENTO Y DIFERENCIACION  
DE AZUCARES EN MEZCLA  
APLICACIONES PRACTICAS

TESIS PROFESIONAL QUE  
PARA OBTENER EL TITULO  
DE QUIMICO PRESENTA

JOSE GUTIERREZ VALENCIA

MEXICO, D. F.

1950

1727



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mis Padres*  
*con gratitud y cariño.*

*Al Dr. José Giral F.*

*con estimación, respeto y agradecimiento,  
por su valiosa enseñanza y dirección  
en el desarrollo de este trabajo.*

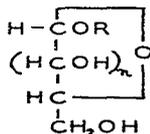
— C A P I T U L O S —

- I.—Consideraciones Generales acerca de Azúcares.
- II.—Reacciones Típicas de las distintas clases de Azúcares.
- III.—Marchas Analíticas de Separación e Identificación de Azúcares.
- IV.—Métodos Seguidos (Originales o Modificados).
- V.—Aplicaciones Prácticas.
- VI.—Conclusiones.
- VII.—Bibliografía.

## CAPITULO I.

### CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE AZUCARES

Entre las sustancias naturales conocidas de más antiguo por los químicos, figuran los azúcares o carbohidratos, nombre este último que les fué adjudicado porque en los primeros análisis que de ellas se hicieron se encontró que su composición empírica correspondía a la fórmula general  $C_n (H_2O)_n$ , es decir, que el hidrógeno y el oxígeno se encuentran en la misma proporción que en el agua. Sin embargo, esta denominación no es del todo exacta, pues, como después se ha encontrado, algunos carbohidratos no corresponden a esta fórmula general, como la rhamnosa:  $C_7H_{10}O_5$ , y en cambio otros cuerpos no carbohidratos como el ácido láctico  $C_3H_5O_3$  sí concuerdan con ella. Los carbohidratos se encuentran ampliamente difundidos en el reino vegetal, constituyen cerca del 75% de la parte sólida de los vegetales y en numerosos productos de origen animal y vegetal tales como azúcar, miel, leche, almidón, madera, gomas vegetales, etc.; se encuentran principalmente en forma de glucósidos, los cuales son compuestos que mediante la hidrólisis por ácidos minerales diluidos o por enzimas, producen un alcohol y un azúcar:



siendo R un radical alcohólico.

Por acuerdo internacional, los glucídidos o sean los azúcares reductores o sustancias que pueden darlos por hidrólisis, se han clasificado en la forma siguiente:

#### GLUCIDOS

**Glucosas ú Osas:**  
Azúcares reductores  
no hidrolizables.

**Glucósidos ú Osidos:**  
Glúcidos hidrolizables  
en osas solamente o con  
otro cuerpo (aglucona).

**Hologlucósidos:**  
Hidrolizables en  
osas solamente.

**Heteroglucósidos:**  
Hidrolizables en  
osa y aglucona.

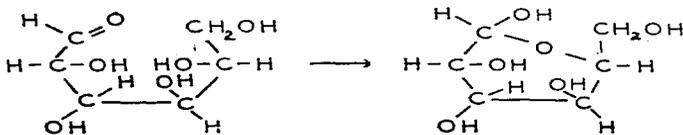
**Polisacaridos:**  
Fácilmente hidrolizables;  
cadena abierta.

**Poliosas:**  
Difícilmente hidrolizables;  
cadena cerrada.

Entre las poliosas se hallan las celulosa, almidón, dextrinas, etc. Los monosacáridos tienen estructura más sencilla, pues son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas. La subdivisión de los monoacáridos se hace tomando en cuenta el número de átomos de oxígeno que poseen, que en la mayoría de los casos, es igual al número de átomos de carbón y así tenemos las triosas, tetrosas, pentosas, hexosas, etc. De ellos los más importantes son las hexosas, y en menor grado las pentosas; éstas últimas se obtienen por hidrólisis de ciertas substancias naturales llamadas pentosanos que se encuentran en las gomas vegetales, madera, cascarrilla de la avena, etc. Entre las hexosas, la glucosa y la fructosa se hallan al estado de libertad en la naturaleza y también combinadas en forma de disacáridos, trisacáridos, glucósidos y polisacáridos. La glucosa se encuentra también normalmente en la sangre humana.

Los monosacáridos pueden dividirse en aldosas y cetosas según que la función que los caracteriza sea un aldehido o una cetona. Así, las glucosas son todas aldosas, en tanto que las fructosas son todas cetosas.

El agrupamiento CHOH de los carbohidratos contiene un átomo de carbón asimétrico y a medida que el número de estos agrupamientos aumenta, un gran número de estereoisómeros se hace posible, el cual depende además de la colocación espacial de los grupos H y OH. Preparando una solución acuosa de glucosa, se observa que presenta una rotación específica de  $+106^\circ$ ; sin embargo, en el transcurso de unas cuantas horas, este valor va disminuyendo hasta llegar a un valor constante de  $+52.5^\circ$ . Este fenómeno que se conoce con el nombre de mutarrotación, se explica por la existencia de dos formas estructurales de la glucosa: teniendo en cuenta que el ángulo tetraédrico entre las ligaduras que unen los átomos de carbón entre sí es de  $109^\circ 28'$  resulta que el átomo de carbón que tiene el grupo aldehido, o sea el primero de la cadena, está colocado cerca del átomo de carbón 5, y entonces un puente de oxígeno se establece fácilmente entre estos dos átomos de carbón. Como resultado de estos cambios, aumenta el número de átomos de carbón asimétricos en la molécula, lo que a su vez determina el poder rotatorio de la solución. Se supone que el equilibrio entre estas dos formas isómeras origina la estabilización del valor rotario específico de la glucosa. (1)

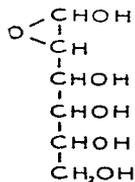


Tanret (2), en 1895, reportó el aislamiento de 3 formas de glucosa, que llamó: (alfa, beta y gama) -glucosa con los siguientes valores rotarios:

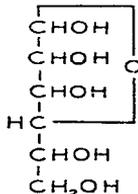
(alfa)—glucosa	(beta)—glucosa	(gamma)—glucosa
$+106^\circ$	$+52.5^\circ$	$+22.5^\circ$

Al disolverlas en agua, el valor rotatorio de la (alfa)-glucosa disminuía y el de la (gamma)—glucosa aumentaba a la rotación constante de +52.5°. La (beta)—glucosa no mostró ningún cambio y ésto hizo pensar que se trataba de una mezcla de las otras dos formas en cantidades equivalentes.

Este hecho, así como el que se obtuviesen dos pentaacetatos isómeros al esterificar los grupos hidroxilo de la glucosa con anhídrido acético y un catalizador, y dos metilglucósidos isómeros al tratarla con metanol y HCl, hizo sentir la necesidad de una fórmula cíclica para los azúcares, pues dichos isómeros no pueden ser admitidos sobre la base de la fórmula lineal o aldehídica. Ya antes de haber sido aislados los varios isómeros de la glucosa y sus derivados, se había observado la ausencia en la glucosa de algunas reacciones típicas de aldehídos, como la de Schiff; Colley en 1870 y Tollens en 1883 explicaron ésto por un bloqueo parcial del grupo aldehído debido a la formación de una ligadura del tipo del hemiacetal interno. Las fórmulas propuestas por estos autores fueron las siguientes: (3)



Fórmula de  
Colley

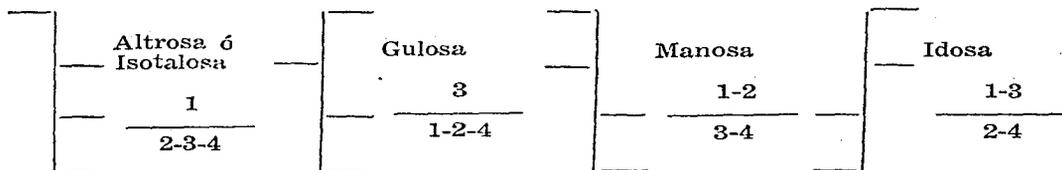


Fórmula de  
Tollens

Tollens, en su fórmula suponía el enlace en el carbón (gamma) respecto al carbonilo, pero actualmente se admite que el enlace se verifica preferentemente en el carbón (delta). Sin embargo, se han encontrado glucósidos con el enlace en el carbón (gamma).

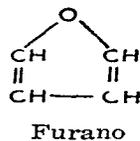
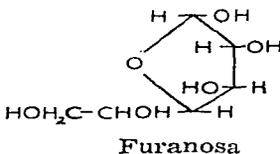
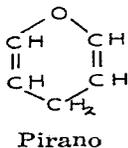
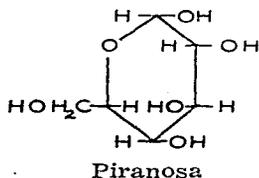
De la fórmula de la glucosa se deducen 8 isómeros estereoquímicos, según la posición que ocupen los grupos H y OH a lo largo de la cadena. Estos 8 isómeros que ya han sido aislados y estudiadas sus propiedades, son los siguientes:

Alosa ó Alomucosa	Glucosa	Talosa	Galactosa
0	2	4	1-4
1-2-3-4	1-3-4	1-2-3	2-3

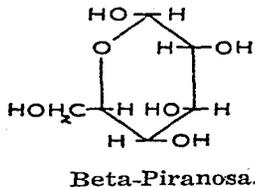
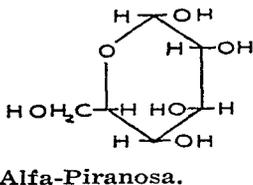


Cada uno de estos isómeros posee otros 3 isómeros llamados enantiomórficos y según la dirección en que desvían la luz polarizada, pueden ser dextrógiros o levógiros y la mezcla de ambos ópticamente inactiva, o sea el racémico; de modo que resultan 24 isómeros.

Tomando en cuenta la estructura cíclica de los carbohidratos, cada uno de ellos puede existir en dos formas: la forma piranosa que es la más estable y se hace derivar del pirano, y la forma furanosa, menos estable y que se hace derivar del furano:

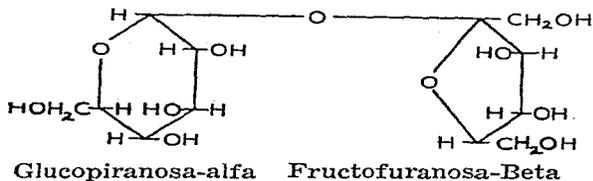


Cada una de estas dos formas cíclicas puede a su vez existir en dos formas isómeras: (alfa) y (beta) llamadas también (cis) y (trans), según la posición que ocupe el H y el OH en el primer átomo de carbón, ya que la ciclización torna asimétrico este átomo de la molécula haciendo posible la existencia de dos formas isómeras. Como resultado, el número total de isómeros posibles se eleva a 96.

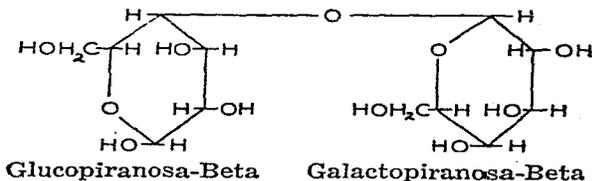


Las fórmulas cíclicas de los disacáridos más importantes son como sigue:

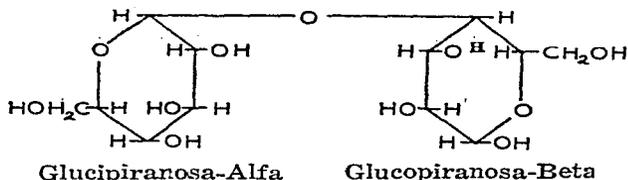
**SACAROSA**



**LACTOSA**



**MALTOSA**



La composición de otros disacáridos es:

Trehalosa: Glucopiranososa — $\alpha$  + Glucopiranososa — $\alpha$

Melibiosa: Glucopiranososa — $\alpha$  + Galactopiranososa — $\alpha$

Turanosa: Glucopiranososa — $\alpha$  Glucopiranososa — $\beta$  (isómero de la maltosa).

Gençiobiosa: Glucopiranososa — $\beta$  + Glucopiranososa — $\beta$

Celobiosa: Glucopiranososa — $\beta$  + Glucopiranososa — $\beta$

Trisacáridos:

Melicitosa: Turanosa + Glucopiranososa — $\alpha$

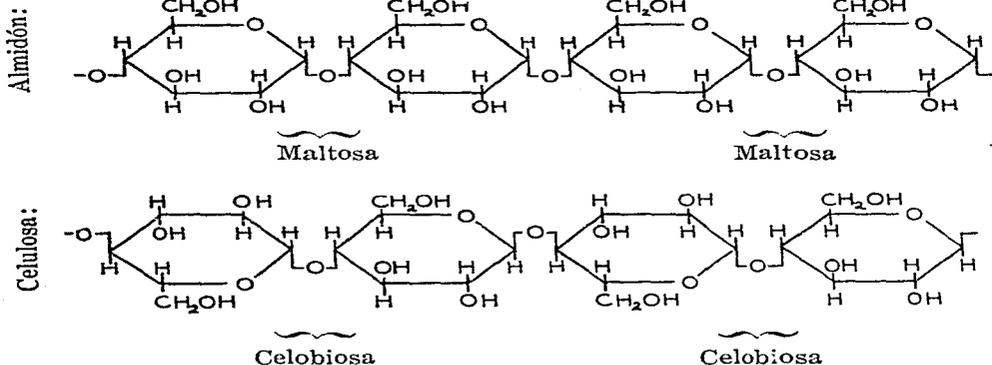
Gencianosa: Gençiobiosa + Fructofuranosa — $\beta$

Rafinosa: Melibiosa + Fructofuranosa — $\beta$

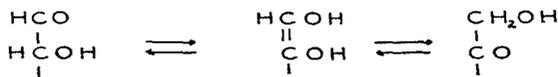
Tetrasacáridos:

Estaquiosa: 2 Galactosa + Glucosa + Fructofuranosa — $\beta$

## Polisacáridos:



Los carbohidratos presentan también el fenómeno de enolización, el cual se debe a una activación por el grupo carbonilo, de los agrupamientos adyacentes, lo que permite la verificación de dicho fenómeno por la acción de bases orgánicas o inorgánicas:



En este traslado del grupo carbonilo del carbón 1 al carbón 2, se supone la formación intermedia de un enediol. Este cambio de configuración en el carbón 2 constituye un medio para sintetizar azúcares.

Es necesario esclarecer lo que significan las letras d y l antepuestas a los nombres de los distintos azúcares. Expresan la estructura de ellos derivada de los dos aldehidos glicéricos isómeros:



los cuales se diferencian como puede observarse, en la posición en que se encuentran el H y el OH en el carbón central. Por lo tanto, d-glucosa no expresa la glucosa dextrógira sino la glucosa que deriva en su estructura del aldehido d-glicérico. Los poderes rotatorios se indican por los signos (+) para el dextrógiro y (-) para el levógiro. Por consiguiente la glucosa natural que es dextrógira debe expresarse

con el nombre d-(+) glucosa y la levulosa debe expresarse como l-(—) fructosa.

De toda la exposición que acabamos de hacer, se deduce que la identificación de un azúcar cuando se encuentra en mezcla con otros es bastante difícil porque todos ellos o casi todos son isómeros con propiedades químicas muy parecidas. El objeto de consignar en este capítulo las estructuras de las moléculas de los distintos azúcares es fundamentalmente razonar la dificultad grande de la separación de azúcares mezclados y de la caracterización de cada uno de ellos.

## CAPITULO II.

### REACCIONES TIPICAS DE LAS DISTINTAS CLASES DE AZUCARES.

Estas reacciones las dividiremos en la forma siguiente:

Reacciones generales de los carbohidratos.

Reacciones de poliosas.

Reacciones de polisacáridos.

Reacciones de azúcares sencillos, las cuales a su vez se dividen así:

Reacciones del grupo CO.

Reacciones de aldosas.

Reacciones de cetosas.

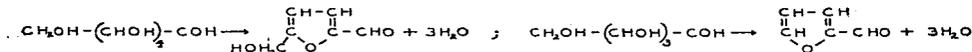
Reacciones de hexosas.

Reacciones de pentosas.

A) Reacciones generales de los carbohidratos.

Entre estas reacciones se halla la que se manifiesta por la coloración pardo-oscuro y finalmente negra, que experimentan todos los carbohidratos en presencia del ácido sulfúrico concentrado y caliente; unos decigramos de substancia se mezclan en un tubo de ensayo con 1 ml. de sulfúrico concentrado y se observa una coloración amarilla en frío; se calienta y el color se oscurece hasta negro con desprendimiento de óxido de carbono y anhídridos sulfuroso y carbónico. La reacción, aunque muy general, no es exclusiva de estos cuerpos, pues otros como los ácidos alcoholes la producen también. Si se substituye el ácido por una lejía alcalina, la coloración es amarilla al principio pero pasa también a parda por ebullición, terminando por resinificarse la substancia en virtud de su función aldehídica. (4)

Otra prueba muy conocida es la de Molisch, que es llevada a cabo mezclando uno o dos ml. de la solución acuosa de la substancia con unas gotas de solución alcohólica al 10% de (alfa)-naftol. A continuación se agrega con una pipeta 1 ml. de  $\text{SO}_3\text{H}_2$  concentrado de manera que no se mezclen los líquidos; aparecerá en la zona de separación un anillo rojo intenso. Esta reacción es general y específica de todo carbohidrato, y de gran sensibilidad. Por la acción deshidratante del ácido sulfúrico, el carbohidrato origina furfural que es el que produce la reacción coloreada (hidroximetilfurfural las hexosas y furfural las pentosas).



La reacción Molisch-Mulliken es análoga a la anterior, con la sola diferencia que emplea el (alfa)-naftol en disolución clorofórmica. (5)

Reacción Mulliken-Schiff: unos decigramos de substancia se agitan en un tubo de ensayo con 5 ml. de HCl 1:3; se hierve un momento y se coloca en la boca del tubo un papel impregnado de acetato de anilina; debe producirse una coloración roja. Esta reacción la dan de preferencia las pentosas y la fructosa. (6).

Reacción Bertrand-Tollens: a 5 g<sub>tas</sub> de la solución problema se le agregan 5 ml. de una solución de 0.05 g. de orcinol en HCl. 1:2 y la mezcla se hace hervir durante unos 20 segundos; en el caso de una hexosa se produce una coloración anaranjada y violeta azulada en el caso de una pentosa; los carbohidratos; originados por estos azúcares dan también las respectivas coloraciones. Substituyendo el orcinol por el floroglucinol, se produce una coloración rojo cereza en el caso de un carbohidrato o azúcar cualquiera; los líquidos coloreados tienen espectros de absorción característicos. Si se emplea naftoresorcinol, se originan líquidos fluorescentes verde; en el caso de algunas pentosas o polisacáridos correspondientes. Todas estas reacciones son también producidas por el furfuroil o sus derivados, engendrados en la acción del ácido clorhídrico sobre el carbohidrato. (7)

Reacción Wehmer-Tollens: calentando la substancia durante muchas horas a baño maría con un exceso de HCl concentrado, se produce ácido levúlico el cual puede extraerse filtrando el conjunto frío y extrayendo con éter el líquido filtrado; la evaporación de la capa etérea deja ese ácido en libertad y se identifica produciendo su sal de plata insoluble y de forma cristalina característica. Producen esta reacción todas las hexosas y carbohidratos derivados de ellas. (8)

Reacción Fenton: calentando durante unos minutos a baño maría y a 90° C. unas partícula<sub>s</sub> de la substancia con 2 o 3 ml. de agua oxigenada y una pequeña cantidad de sulfato ferroso y añadiendo después una ligera cantidad de ácido fenilhidrazino-parasulfónico y calentando nuevamente, se obtiene un líquido pardo violeta que tiñe a la seda del mismo color, en el caso de una cetosa o derivado de ella. (9)

Reacción de la antrona: esta prueba recientemente descrita por Dreywood (10), ha mostrado una alta especificidad para carbohidratos. El reactivo se prepara disolviendo 2 g. de antrona en 1 lt. de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> de 95% (preparado añadiendo cuidadosamente 1 lt. de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentrado a 50 ml. de agua y enfriando). Se coloca un ml. de agua en un pequeño tubo de ensayo que contiene aproximadamente 1 mg. del material a ensayar, se añaden a continuación 2 ml. de la solución de antrona y las soluciones se mezclan por agitación. La concentración final de ácido sulfúrico en la solución problema debe ser siempre mayor del 50%; de otro modo la antrona dejará de estar en solución y producirá una suspensión lechosa. El calor producido por la dilución del ácido sulfúrico es una parte necesaria de la prueba, la cual parece requerir también la presencia de una estructura furfurólica, pues se obtuvieron pruebas negativas con la fe-

nilosazona y el fenilosotriazol de la d-glucosa y positiva con la fenilhidrazona de la d-manosa. (11)

En presencia de un carbohidrato, un color verde claro aparecerá y rápidamente aumentará su intensidad hasta resultar una solución azul-verde obscuro. En ausencia de carbohidratos pero en presencia de otros compuestos orgánicos, un color pardo se produce a menudo por la acción del  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado. La prueba de la antrona es en extremo sensible; en pruebas con almidón probó ser de 10 a 40 veces más sensible que el yodo para delatar este carbohidrato. Aproximadamente una parte de almidón en 900.000 partes de agua puede ser descubierta.

B) Reacciones de Poliosas (celulosa, almidón, dextrina, etc.).

Por tratamiento con ácidos concentrados (60-70% de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  o 38% de HCl) seguido de ebullición con ácidos diluidos, la celulosa se degrada completamente, originándose exclusivamente d-glucosa (Braconnot, 1819).

En el tratamiento de la celulosa con los álcalis fuertes, como lejía de sosa al 18%, se originan combinaciones alcalinas de composición no exactamente conocida que se hidrolizan fácilmente por el agua.

Tratándola con la mezcla sulfonítrica se obtiene un trinitrato y con el anhídrido acético produce un triacetato. En la metilación, que se efectúa de la mejor manera posible con yoduro de metilo y sodio en amoniaco líquido, se forma un derivado trimetilado. Estos resultados indican que la celulosa tiene 3 grupos hidroxilo libres por cada 6 átomos de carbón. La acetólisis de la celulosa, o sea acetilación seguida de la hidrólisis produce un 40 a 50% de celobiosa, lo cual hace considerar a la celulosa formada por unidades de celobiosa.

También reacciona la celulosa con el reactivo Nowopokrowsky produciendo un color azul. El reactivo se prepara disolviendo 50 g. de cloruro de zinc y 16 g. de yoduro de potasio en 17 ml. de agua. Se agrega un exceso de yodo y se deja reposar varios días, usándose el líquido que sobrenada. (12)

La celulosa se disuelve en el reactivo de Schweitzer, que se prepara agregando a 10 partes de hidróxido de amonio de gravedad específica 0.90, 3 partes de agua destilada y un ligero exceso de carbonato cúprico. Se agita bien y se centrifuga, a continuación se decanta usándose la solución clara. Esta es la mejor manera de preparar el reactivo, pero también puede hacerse precipitando el hidróxido cúprico por la adición de amoniaco a una solución de sulfato cúprico. El hidróxido cúprico precipitado, se filtra, se lava con agua y es disuelto en hidróxido de amonio concentrado.

Otros reactivos que disuelven la celulosa son cloruros metálicos disueltos en HCl. El reactivo de Cross y Bevan para disolver la celulosa consiste en una parte de cloruro de zinc disuelta en 2 partes (en peso) de HCl concentrado.

La celulosa además, puede sufrir la fermentación por hongos y bac-

terias produciendo gran diversidad de substancias, según la clase de microorganismos que lleven a cabo el proceso.

Una substancia de constitución análoga a la celulosa es el almidón; éste por ebullición con ácidos diluidos se desdobra cuantitativamente en d-glucosa, engendrando como productos intermedios dextrinas y maltosa.

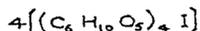
Tratándolo con anhídrido acético y piridina se pueden introducir en el almidón 3 grupos acetilo (calculados para cada unidad  $C_6H_{10}O_5$ ) los cuales a su vez pueden ser substituidos por grupos metilo, tratando el trimetil-almidón con sulfato de metilo y un álcali.

También puede ser nitrado el almidón por medio de la mezcla sulfonítrica, dando un producto usado como explosivo.

Calentado a  $200^{\circ}$ - $250^{\circ}$  C. se convierte en dextrinas y esta misma transformación puede ser llevada a cabo por la ptialina,, enzima contenida en la saliva.

El caracter químico más importante del almidón es la coloración azul intensa que produce con las soluciones acuosas de yodo (basta la mínima cantidad de metaloide que se disuelve en agua, pero puede haber también un yoduro alcalino); se ha observado que el yodo absolutamente puro no produce esta coloración porque no tiene los indicios de IH indispensables para que tenga lugar.

Se ha discutido mucho la constitución química del compuesto resultante, llamado corrientemente yoduro de almidón; unos autores defienden que se trata de un compuesto definido y se han propuesto hasta 13 fórmulas distintas para representarlas, variando en ellas la cantidad de yodo de 3 a 20%; una de estas fórmulas más aceptada es la de Mylius:



en la cual se expresa la inestabilidad del cuerpo (se decolora por el calor y los alcalis, se recolora por enfriamiento, se destruye por alcohol,  $NO_3Ag$ , etc.) por la disociación de la combinación molecular del yoduro con el IH. Pero la hipótesis más admitida es la de considerar al yoduro de almidón como un compuesto de adsorción del yodo y del ion  $I_3$  por el almidón, en proporciones relativamente constantes; es precipitado por  $SO_4Ba$  en tanto que el almidón soluble no lo es, y pasa al polo positivo por electrólisis; otros autores consideran que es una verdadera disolución sólida del metaloide en la fécula y no un simple compuesto de adición en la superficie; y otros adoptan un criterio ecléctico admitiendo que la acción entre el yodo y el almidón es un fenómeno de sorción, es decir de adsorción en la superficie combinado con fijación en el seno de la masa. Las dextrinas producen coloración pardo rojiza porque su grado de dispersión es mucho más avanzado que el del almidón. El yoduro de almidón es un polvo azul oscuro muy higroscópico que se ha preconizado en Medicina como desinfectante y antiséptico contra las enfermedades infecciosas.

Recientemente Turner (13) ha establecido que el color azul que da

el almidón con el yodo no depende del yodo sino que este actúa catalíticamente induciendo a la molécula del almidón a cambiar de estructura interna; lo demuestra usando yodo 131 radioactivo. El almidón se caracteriza además por su estudio microscópico; forma de los granos, posición del núcleo etc. Y también porque calentado con agua produce una masa translúcida llamada engrudo de almidón; si la cantidad empleada de almidón es muy pequeña, puede llegar a disolverse en el agua caliente sobre todo si se acidula ésta con ácido clorhídrico; se tiene así lo que se llama almidón soluble.

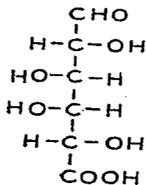
El glucógeno llamado también almidón animal produce con el yodo una coloración rojo caoba. Todas estas reacciones con el yodo se llevan a cabo preparando una solución acuosa de yodo en yoduro de potasio y agregándola gota a gota a la poliosa interpuesta en agua.

### C) — Reacciones de Polisacáridos.

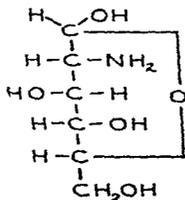
Los polisacáridos más importantes son los disacáridos y entre ellos la sacarosa, la lactosa y la maltosa. No reduce el líquido Fehling la sacarosa y si lo reducen la lactosa y la maltosa. Pero estas dos se diferencian de los azúcares sencillos reductores en que no reducen la disolución de acetato de cobre al 5% en tanto que si lo hacen las osas tales como la glucosa, galactosa, etc. Este reactivo llamado también Barfod (modificación de Tauber, H., y Kleiner, I. S., J. Biol. Chem. 99, 249 (1932) se prepara disolviendo 24 g. de acetato cúprico en 450 ml. de agua hirviendo, y agregando enseguida 25 ml. de ácido láctico de 8.5%. El material se agita, enfría, se diluye a 500 ml. y se filtra. El reactivo de Barfod no puede usarse con soluciones de azúcar que contengan cloruros. En este caso un precipitado blanco de cloruro cúprico básico se forma por calentamiento.

Algunos disacáridos pueden caracterizarse por la formación de su hidrazona u osazona llevada a cabo conforme decimos más adelante al hablar de azúcares sencillos; así los cristales de la osazona de la maltosa se agrupan en forma de roseta y los de la lactosazona forman agrupamientos circulares menos compactos. (14)

Los polisacáridos experimentan también reacciones hidrolíticas: los pentosanos que se encuentran en la goma arábica producen arabinosa; los que se hallan en la cáscara de la avena y en las mazorcas del maíz originan xilosa. Las pectinas, existentes en diversos frutos, hidrolizadas producen galactosa y arabinosa y gran cantidad de ácido galacturónico: (15)



Hidrolizando los galactanos que existen en el agar-agar, originan la galactosa. La quitina es un polisacárido que hidrolizado produce glucosamina:



La inulina no reacciona con el yodo é hidrolizada produce fructosa.

D) — Reacciones de azúcares sencillos.

a) — Reacciones del grupo CO.

Una de las reacciones más características de este agrupamiento, es su oxidación por sales metálicas en solución alcalina. Los principales métodos químicos para determinar cuantitativamente los azúcares hacen uso de la acción reductora de los azúcares sobre las soluciones alcalinas de las sales de ciertos metales. Aunque muchas sales metálicas incluyendo las de cobre, plata, mercurio y bismuto llevan a cabo este tipo de reacción, el cobre ha sido el más extensamente empleado en análisis de azúcares. La reacción consiste esencialmente en la oxidación del grupo CO originándose el correspondiente ácido urónico; la sal metálica es reducida precipitándose el metal como metal libre o como el subóxido.

Sin embargo, el proceso es complicado por la extensa acción del álcali sobre el azúcar y por la presencia de grupos alcohólicos que también son oxidables, resultando muchos productos de oxidación de los cuales no se ha identificado todavía la totalidad.

El método del cobre fué mejorado en 1848 por Fehling quien dió como equivalentes estequiométricos 5 moléculas de cobre para una molécula de glucosa, pero la cantidad de cobre reducido varía con las condiciones del experimento. El reactivo de Fehling consiste en 2 soluciones: A) se disuelven 34.639 g. de sulfato de cobre pentahidratado en agua, se diluye hasta 500 ml. y se filtra la solución por amianto preparado. B) se disuelven 173 g. de sal de Rochelle y 50 g. de NaOH en agua; se diluye hasta 500 ml. se dejan en reposo por espacio de dos días y se filtra por amianto preparado. Las dos soluciones se mezclan en volúmenes iguales momentos antes de la determinación; al mezclarlas se precipita momentáneamente hidróxido cuproso de color azul oscuro, pero éste se disuelve en presencia del tartrato doble de potasio y sodio, pues forma con esta sal un ión complejo tartrocúprico soluble en la solución alcalina; en presencia de una substancia reductora, el ión complejo se descompone formando hidróxido cuproso, el cual a su vez se deshidrata y se origina el óxido cuproso inso-

luble, de color rojo intenso. El objeto de conservar separadas las dos soluciones de que consta el reactivo es lograr una mejor conservación de este, pues mezcladas, con el tiempo llega a precipitar el hidróxido cúproso. Se han hecho numerosas modificaciones de este método: sulfato ó acetatos que tengan menor alcalinidad, como para las soluciones de Benedict y Barford, respectivamente); el hidróxido de potasio ha sido substituído por el de sodio en el método de Allikn y sus modificaciones. También se han usado citratos y carbonatos en vez de KOH para producir reactivos que tengan menor alcalinidad, como para las soluciones de Benedict y de Soidaini. El reactivo de Benedict está compuesto de sulfato de cobre, carbonato de sodio y citrato de sodio en una solución. Se conserva perfectamente y es un reactivo en extremo seguro para la investigación en orina de cantidades patológicas de azúcar. Para prepararlo se disuelven 173 g. de citrato de sodio y 100 g. de carbonato de sodio anhidro en 800 ml. de agua caliente. Filtrese y dilúyase a un volúmen de 850 ml. Se disuelven 17.3 g. de sulfato de cobre cristalizado en 100 ml. de agua y se agrega lentamente y agitando a la primera solución; se diluye a 1000 ml.

Pueden mencionarse entre otras soluciones de cobre, el tartrato de cobre y amonio y sulfato de cobre amoniacal. Se han establecido procedimientos unificados para los cuales se usan los mismos reactivos y procedimiento, independientemente de la naturaleza del azúcar, con objeto de evitar las variaciones en el resultado como consecuencia de la diversidad de condiciones en que se efectúe la determinación. Entre estos métodos están los de Munson y Walker de Quisunbing y Thomas, de Bertran, de Brown, Morris y Miller, de Lane y Eynon y de Scales (modificado). El método de Somogyi-Shaffer-Hartmann, emplea la determinación volumétrica del ión cuproso en presencia de citratos, los cuales, forman iones complejos cúpricos. (16). Este método es como sigue: se pipetea 5 ml. de la solución de glucosa conteniendo de 0.2 a 2.0 mg. de glucosa en un tubo de ensayo grueso y agréguense 5 ml. exactamente del reactivo de cobre Shaffer-Somogyi. Se mezcla, se tapa con un tapón de vidrio holgado y se coloca en un baño maría durante 15 minutos. Se saca el tubo y se enfría en agua durante unos 3 minutos. La temperatura de la solución debe hacerse bajar a 30° o 40° C. Ahora se agrega un ml. de ácido sulfúrico 5N. se mezcla y se deja 2 minutos. Titúlere con tiosulfato de sodio 0.005N hasta que casi todo el yodo haya reaccionado. Se agregan unas cuantas gotas de solución de almidón hervida y titúlese cuidadosamente hasta que el color azul desaparezca. A continuación se efectúa una prueba en blanco, calentando 5 ml. de agua destilada y 5 ml. del reactivo de cobre, agregando ácido sulfúrico, etc. El volumen del tiosulfato de sodio usado para titular el problema se resta del volúmen usado en la titulación de la prueba en blanco. La diferencia es equivalente a la cantidad de óxido cuproso formado por la acción reductora del azúcar. La tabla que sigue indica la cantidad de azúcar a la que ésta corresponde.

Miligramos de Glucosa que corresponden a la diferencia entre los valores de las titulaciones de la prueba en blanco y del problema.

Ml. de Tiosulfato de sodio 0.005N	Décimos de ml. de Tiosulfato de Sodio 0.005N.									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0			0.05	0.06	0.08	0.09	0.10	0.11	0.13	0.14
1	0.15	0.16	0.17	0.19	0.20	0.21	0.22	0.23	0.24	0.25
2	0.27	0.28	0.29	0.30	0.31	0.32	0.33	0.35	0.36	0.37
3	0.38	0.39	0.40	0.41	0.42	0.43	0.45	0.46	0.47	0.48
4	0.49	0.50	0.51	0.53	0.54	0.55	0.56	0.57	0.58	0.59
5	0.60	0.61	0.63	0.64	0.65	0.66	0.67	0.68	0.69	0.70
6	0.72	0.73	0.74	0.75	0.76	0.77	0.78	0.79	0.80	0.82
7	0.83	0.84	0.85	0.86	0.87	0.88	0.89	0.90	0.91	0.93
8	0.94	0.95	0.96	0.97	0.98	0.99	1.00	1.01	1.02	1.04
9	1.05	1.06	1.07	1.08	1.09	1.10	1.11	1.12	1.13	1.15
10	1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21	1.22	1.23	1.24	1.26
11	1.27	1.28	1.29	1.30	1.32	1.33	1.34	1.35	1.36	1.37
12	1.38	1.39	1.40	1.42	1.43	1.44	1.45	1.46	1.47	1.48
13	1.49	1.50	1.52	1.53	1.54	1.55	1.56	1.57	1.58	1.59
14	1.60	1.61	1.63	1.64	1.65	1.66	1.67	1.68	1.69	1.70
15	1.71	1.72	1.74	1.75	1.76	1.77	1.78	1.79	1.80	1.81
16	1.82	1.83	1.85	1.86	1.87	1.88	1.89	1.90	1.91	1.92
17	1.93	1.94	1.95	1.96	1.97	1.98	1.99	2.01	2.02	2.03

Nota:—Los valores en esta tabla son válidos solo cuando se calientan 5 ml. de la solución de glucosa con 5 ml. del reactivo de cobre. Si se usa un volumen menor de solución de azúcar, debe añadirse agua hasta hacer un volumen de 5 ml. antes de agregar el reactivo de cobre.

Deben observarse las siguientes precauciones para obtener resultados satisfactorios con este método. Evítase la agitación de las soluciones durante el calentamiento y enfriamiento. La agitación ocasiona una oxidación excesiva del óxido cuproso por el oxígeno del aire que se introduce en las soluciones. No debe enfriarse a menos de 30°C.; si los 5 ml. de solución usados para una determinación contienen 1.0 mg o más de glucosa el enfriar demasiado puede causar bajos resultados a causa de una incompleta oxidación del cobre reducido por el yodo después de añadir ácido sulfúrico.

La reacción es rápida hasta que todo el cobre cuproso excepto un 3 a 5% es oxidado, pero se completa más bien lentamente a más bajas temperaturas. Si la temperatura se mantiene o se eleva entre 30° y 40° C. hasta que se agrega el ácido, la oxidación es completa en 2 a 3 minutos. Entonces se puede titular el exceso de yodo. Grandes cantidades de sales conducen a diferentes resultados porque disminuyen la cantidad de aire en solución. Por ejemplo Somogyi encontró que 10% de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  en la solución de azúcar daba resultados 17% más altos. Las soluciones ácidas deberán neutralizarse; no deben usarse carbonatos o bicarbonatos porque producen cambios relativamente grandes del pH, que afectan en gran manera los resultados.

En este método los pasos esenciales son como sigue:

1.—El cobre cúprico se reducido por la glucosa para formar un precipitado de óxido cuproso.

2.—La adición de ácido sulfúrico hace que el yodato reaccione con el yoduro liberando yodo.

3.—El óxido cuproso se disuelve en el ácido y reacciona con el yodo libre de este modo:



De esta manera se usa una cantidad de yodo que equivale a la cantidad de óxido cuproso formado.

4.—El yodo que queda es titulado con tiosulfato de sodio.

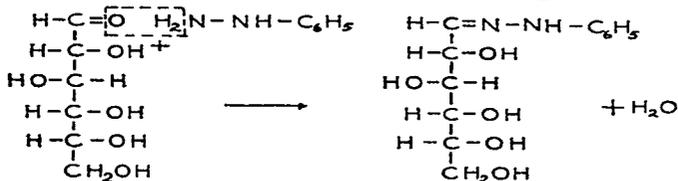
Preparación de los reactivos: se disuelven 25 g. de carbonato de sodio anhidro y 25 g. de sal de Rochelle en 500 ml. de agua. No debe calentarse para disolver; agréguese 75 ml. de  $\text{SO}_4\text{Cu}$  al 10% usando una pipeta y manteniendo la punta de la pipeta dentro de la solución de carbonato y tartrato para evitar pérdidas de  $\text{CO}_2$ . Ahora se agregan 20 g. de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  y 5 g. de IK. Añádase  $\text{IO}_3\text{K}$  0.1 N según la cantidad de azúcar que se pretenda analizar. Por lo general bastan 200 ml.; usando esta cantidad, la prueba en blanco consumirá unos 20 ml. de tiosulfato 0.005 N. Se diluye el reactivo a un litro y se mezcla.

La solución de tiosulfato de sodio se prepara diariamente diluyendo 26 ml. de tiosulfato de sodio 0.1 N a 500 ml. El yodato 0.1 N contiene 3.567 g. de  $\text{IO}_3\text{K}$  por litro; la solución de almidón se prepara hirviendo 1 g. de almidón soluble con 50 ml. de agua.

Para subsiguientes modificaciones del método, véase: Somogyi, M., J. Biol. Chem., 117, 771, (1937).

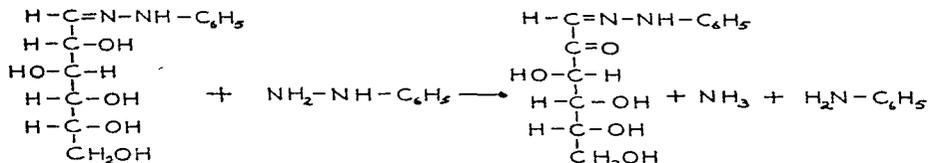
El método Folin-Wu y su modificación de acuerdo con Benedict requiere la medida del color producido por sales cuprosas y un reactivo de ácido túngstico. Aunque la reducción de sales cúpricas en solución alcalina es común a todas las aldosas y cetosas (así como aldehidos y cetonas), pueden establecerse condiciones para que tenga lugar de preferencia una oxidación de monosacáridos.

Otra reacción típica del grupo carbonilo es la que tiene lugar con la fenilhidrazina y compuestos análogos como la nitrofenilhidrazina, bromofenilhidrazina, etc. La reacción, en el caso de la glucosa es como sigue:

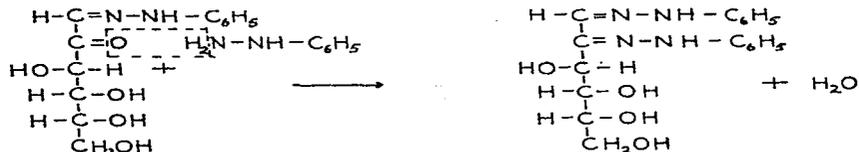


Fenilhidrazona de la glucosa.

En general, las hidrazonas no son características, casi todas son líquidas. Haciendo reaccionar una nueva molécula de fenilhidrazina, se origina la hidrazona de función cetónica, separándose anilina y amoníaco:

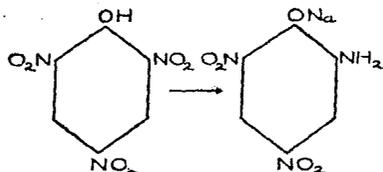


Por último, con una tercera molécula de fenilhidrazina se origina la osazona:



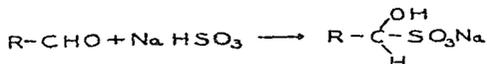
Las osazonas son ya compuestos insolubles, generalmente amarillos y cristalinos; la forma observada al microscopio y su punto de fusión son característicos de cada azúcar y permiten en muchos casos diferenciar éstos. Muchas veces es más útil el empleo de derivados de la fenilhidrazina que permiten obtener osazonas mejor definidas y diferenciadas, como veremos más adelante. La osazona de la glucosa está formada de agujas largas amarillas unidas en forma de haces; la fenilxilosa está formada por agujas más cortas y dispersas; la arabinosa forma con la benzilhidrazina, la benzil-arabinosa-hidrazona, en cristales incoloros (17). Para efectuar la reacción se colocan 5 ml. de la solución problema en un tubo de ensayo y se añade 1 ml. de la solución de acetato de fenilhidrazina, se mezclan, se tapa el tubo con un pedazo de algodón y se calienta a baño maria unos 20 ó 30 minutos. Se coloca una gota del material en un portaobjetos y se observan al microscopio los cristales formados; la solución de fenilhidrazina se prepara añadiendo 10 ml. de ácido acético glacial a 20 ml. de fenilhidrazina y 200 ml. de agua; como preservativo se agregan 2 g. de  $\text{SO}_2\text{HNa}$ .

El grupo CO reduce al ácido pícrico en solución saturada, en mezcla con solución de  $\text{CO}_2\text{Na}_2$ , desarrollándose un intenso color rojo debido a la formación de la sal sódica del ácido picramico:



Una solución de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  amoniacal es reducida por el grupo carbonilo, produciéndose un espejo de plata en las paredes del tubo.

La formación de compuestos de adición con el bisulfito de sodio, es una reacción general de aldehidos; se determina el exceso de bisulfito por métodos yodométricos. (18):



Sin embargo, numerosas cetonas cíclicas de bajo peso molecular, metilcetonas y otros ciertos compuestos que tienen grupos carbonilo reaccionan de una manera similar. Algunas metilcetonas sin embargo, forman los compuestos de adición muy lentamente ó no del todo. El reactivo se prepara añadiendo 3 ml. de alcohol etílico a 12 ml. de una solución acuosa al 40% de la sal. (19).

El índigo es reducido por el grupo CO en solución débilmente alcalinizada con  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ ; calentando la solución se obtiene una coloración roja amarillenta.

b) —Reacciones de aldosas.

Reacción con hipoyodito. (20).

Romijn (1897) fué el primero que mostró que las aldosas son oxidadas cuantitativamente por el yodo en solución débilmente alcalina bajo condiciones cuidadosamente controladas.

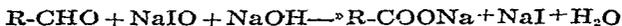
El yodo y el álcali forman hipoyodito y yoduro:



Parte del hipoyodito es convertido en yodato y yoduro; la cantidad depende de la concentración, el tiempo y la temperatura:

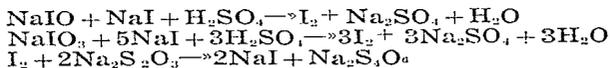


El hipoyodito reacciona con la aldosa:



Como el yodato de sodio no puede oxidar el azúcar en solución alca-

lina, algo de yodo activo se pierde en lo que concierne a la oxidación del azúcar. Si el yodo está presente en un exceso demasiado grande, puede ocurrir una sobreoxidación y los grupos alcohólicos son lentamente oxidados a grupos carboxilo ó carbonilo. Aunque algo de yodo puede perderse por la reacción secundaria, este yodo es medido con el exceso cuando la solución es acidulada y titulada con tiosulfato:

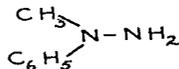


Aunque la naturaleza estequiométrica de esta reacción es una ventaja sobre la naturaleza empírica de las reducciones de cobre, este procedimiento no tiene tan gran aplicación y también debe ser usado bajo condiciones controladas.

Las aldosas originan por oxidación moderada, ácidos del mismo número de átomos de carbón. Por oxidación del grupo aldehídico se originan ácidos aldónicos monobásicos; si la oxidación ataca también el grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$  final, se originan ácidos dibásicos del tipo del ácido sacárico:  $\text{COOH}-(\text{CHOH})_n-\text{COOH}$ .

c)—Reacciones de cetosas.

La metilfenilhidrazina:



constituye un valioso medio para investigar cetosas, pues reacciona con ellas mucho más fácilmente que con las aldosas, formándose las osazonas de las cetosas.

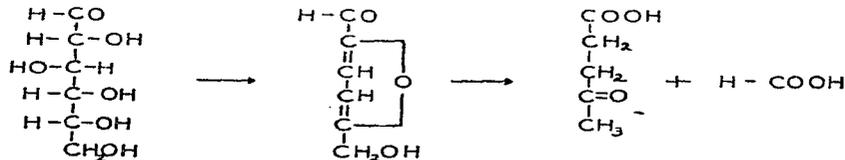
La prueba de Seliwanoff es muy usada para investigar cetosas aunque la prueba no es específica de estas substancias, pero la reacción es mucho más rápida e intensa con las cetosas que con las aldosas: a 5 gotas de la solución problema se le agregan 5 ml. de una solución de 0.05 g. de resorcinol en 100 ml. de  $\text{HCl}$  1:2. la mezcla se hace hervir durante unos 20 segundos: si está presente una cetosa se produce una coloración roja obscura con o sin precipitado café.

Las cetosas con el reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico producen una coloración naranja que se desarrolla completamente en el término de 2 horas. El reactivo consta de 2 soluciones: 1) se disuelven 2 g. de ácido 2,5-dinitrosalicílico en 70 ml. de agua destilada, a  $80^\circ\text{--}90^\circ\text{C}$ . y se agregan 10 ml. de solución acuosa al 20% de  $\text{CO}_2\text{Na}_2$ . Cuando esta mezcla se ha enfriado a  $20^\circ\text{--}25^\circ\text{C}$ . se diluye a 100 ml. con agua destilada. 2) se disuelven 1.5 g. de  $\text{NaOH}$  en suficiente agua destilada para hacer 100 ml. de solución a  $20^\circ\text{--}25^\circ\text{C}$ . A la solución de 3 ml. de muestra en un tubo de ensaye, se agrega 1 ml. de la solución (1) y 1 ml. de la solución (2). Se cierra el tubo de ensaye y se agita bien, dejando la mezcla a  $20^\circ\text{--}25^\circ\text{C}$ .; se observa cualquier cambio de color que aparezca en 2 horas.

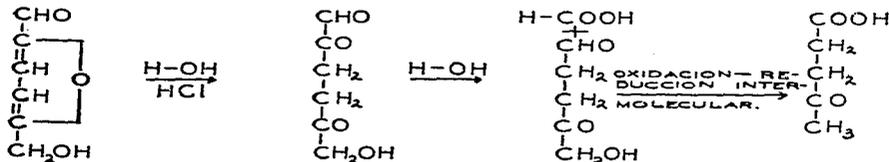
Las cetosas suministran en la oxidación ácidos de menor número de átomos de carbón.

d) —Reacciones de hexosas.

Por la acción de los ácidos diluidos, las hexosas producen hidroximetilfurfuro, el cual sin embargo es fácilmente transformado en ácido levulínico (21):



De acuerdo con Pummerer y Gump, el ácido levulínico se forma como resultado de la siguiente serie de reacciones:



Las hexosas reaccionan con la difenilamina y HCl. La coloración producida y la sensibilidad de esta reacción dependen de la clase de hexosas: azul con la levulosa, violeta con la galactosa, pardo con la manosa, etc. La reacción la da también el ácido hexosafosfórico que produce un color violeta; la prueba se efectúa agregando a 1 ml. de la solución del azúcar, 2 ml. del reactivo, que consiste en 100 ml. de HCl concentrado 20 ml. de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y 20 ml. de solución alcohólica al 10% de difenilamina. Se mantiene en baño maría por 30 minutos.

Las hexosas son fermentescibles por la levadura, a diferencia de las pentosas.

e) —Reacciones de pentosas.

Reacción de Tauber: esta reacción es interesante por su gran sensibilidad y su alta especificidad. El reactivo, que debe prepararse cada 4 días, consiste en 1 g. de benzidina disuelto en 25 ml. de ácido acético glacial. Se mezclan unas gotas de la solución problema con 0.5 ml. del reactivo; hirviendo fuertemente y enfriando con agua a continuación se desarrolla un color rojo muy estable.

La prueba de Tashiro y Tietz se efectúa colocando 1 ml. de sal biliar al 0.1% en un tubo de ensaye y agregando 1 ml. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado. Enseguida se añade una gota de la solución de pentosas y se mezcla; se produce un color naranja. Las hexosas y algunos polisacáridos dan coloración rosa con esta prueba.

La prueba de Bial modificada se lleva a cabo colocando 4 ml. de solución de pentosa en un tubo de ensaye, se agregan unas 15 gotas del reactivo de Bial modificado y 4 a 5 ml. de  $\text{HCl}$  concentrado. Se mezcla, se tapa con algodón y se calienta 10 minutos en agua hirviendo. Se produce un color azul; las hexosas oscurecen esta prueba. El reactivo de Bial modificado se prepara disolviendo 6 g. de orcinol en 200 ml. de alcohol etílico de 95%; a ésta se le añaden 40 gotas de solución de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 10%. Este reactivo se conserva por lo menos 6 meses, mientras que el reactivo de Bial original se conserva menos de una semana.

Otra prueba específica para pentosas es la de Tollens: a 4 ml. de solución problema, se agregan de 3 a 6 gotas de solución alcohólica de floroglucinol al 5%, se añaden 4 ml. de  $\text{HCl}$  concentrado, se mezcla y se lleva a ebullición incipiente; se produce momentáneamente un color rosa.

### CAPITULO III.

#### MARCHAS ANALITICAS DE SEPARACION E IDENTIFICACION DE AZUCARES.

La microobservación de los cristales característicos de las hidrazonas y osazonas formados por algunos azúcares, puede ser de gran valor para la identificación y separación de dichas substancias.

Se han reunido en la siguiente tabla los resultados obtenidos por Fisher y Paulus en la caracterización de los azúcares por medio de dichas formas cristalinas. (22).

	Fructosa	Glucosa	Galactosa	Manosa	Arabinosa	Xilosa	Rhamnosa
Fenilhidra- zona	O	O	O	Bellos Cri- stales P. F. 201° C	O	O	O
p-bromofe- nilhidrazona	O	O	Sólo después de muchas horas, cristales sol. en al- cohol y eter P. F. 163°-176° C.	Cristales in- coloros P. F. 208°-408° C.	Mala forma- ción de agu- jas amarillos P. F. 165° C.	O	O
m-nitrofenil- hidrazona	O	O	O	O	O	10 mg Cri- stales rojos- amarillos P. F. 164° C.	O
o-nitrofenil- hidrazona	(10 mg) agu- jas rojas- amarillos P. F. 162° Diferen- ciación de la glucosa.	O	Pequeños cristales se forman mal, rojos amari- llos P. F. 174°-176° C.	O	Cristales rojos-ana- ranjados. P. F. 180° C.	O	O
Benzihidra- zona.	O	O	O	O	Bellos cri- stales inco- loros P. F. 211° C	O	O
p-bromo- benzihidra- zona.	O	O	Bellos pris- mas y cristales durecidos P. F. 214° C.	O	Cristales planos P. F. 210° C.	O	[10 mg.] Bel- los Cri-stales P. F. 161° C.
p-tolhidra- zona	O	O	O	Bellas pla- quetas inco- loras P. F. 200° C.	O	O	[10 mg.] Bel- las agujas. aparecen me- jor enfria- do en hielo. P. F. 167° C.
o-tolhidra- zona	O	O	Cristales P. F. 182° C	O	O	O	O
Fenilosa- zona	Bellas agu- jas P. F. 224° C.	Bellas agu- jas P. F. 221° C.	Agujas ama- rillas P. F. 192° C.	Bellas agu- jas P. F. 224° C.	Cristales poco defini- dos en for- ma de glán- dula P. F. 162° C.	Largas y fi- nas agujas P. F. 162° C.	Agujas P. F. 184° C.
p-bromofeni- losazona.	Cristales amarillos P. F. 222° C	Cristales amarillos P. F. 222° C.	O	O	O	O	Cristales amarillos P. F. 216° C.
p-nitroani- lozona	Cristales P. F. 257° C.	[2 mg.] cri- stales P. F. 257° C.	O	O	O	O	O

El siguiente conjunto de reacciones, consignado por Anne-Marie Staub (23) constituye una guía para la investigación de ciertos azúcares, aunque muchas de ellas, por estar basadas en los diferentes colores que producen dichos azúcares con los reactivos apropiados, no pueden ser utilizadas cuando estos azúcares se encuentran en mezcla.

1o. Hexosas.

A) Aldohexosas.

Métodos de reducción: basados en la oxidación específica de las aldehídos por el yodo según la reacción:  $R-CHO + H_2O + I_2 \rightarrow R-COOH + 2IH$ .

a) Glucosa

**Reducción según:**

Shaffer y Hartmann (24): este método está fundado en la reducción del sulfato cúprico y oxidación posterior del óxido cuproso formado, por el yodo naciente que se desprende de una solución de yoduro y yodato de potasio después de la adición de ácido. Se titula el exceso de yodo con solución de tiosulfato de sodio 0.005N.

Hagedorn y Jensen (25): en medio alcalino los glúcidos reducen el ferricianuro potásico  $Fe(CN)_6 \cdot K_3$  a ferrocianuro  $Fe(CN)_6 \cdot K_4$ ; el ferricianuro excedente se determina añadiendo  $IH$  y valorando el yodo desprendido con solución titulada de tiosulfato sódico.

Dumazert (26): este método se funda en la oxidación por el yodo, y valoración del exceso de éste con tiosulfato sódico titulado.

Colorimetría

Orcinol: rojo cereza.

Naftol I: rojo violeta.

Naftol II: rosa.

Difenilamina I: azul.

Indol: pardo.

Floroglucinol: pardo desde el principio.

**Fermentación.**

Es llevada a cabo por la levadura.

**Osazonas**

Con fenilhidrazina, p-bromofenilhidrazina, p-nitrofenilhidrazina, ésta última específica de glucosa y frutosa.

b) Galactosa.

**Reducción.**

Como la glucosa.

Colorimetría

Orcinol: rojo azulado.

Naftol I: rojo violeta.

Naftol II: rosa.

Difenilamina I: azul.

Difenilamina II: violeta.

Indol: pardo.

Floroglucinol: pardo desde el principio.

**Fermentación**

Por la levadura, menos rápida que con la glucosa, lo que permite dosificarlas separadamente.

**Hidrazonas.**

Con p-bromofenilhidrazina, o-nitrofenilhidrazina y o-tolihidrazina, ésta última específica.

**Osazona.**

Con fenilhidrazina.

c) Manosa.

**Reducción.**

Como la glucosa.

**Colorimetría.**

Orcinol: rojo obscuro.

Naftol I: rojo violeta.

Naftol II: rosa.

Difenilamina I: azul.

Difenilamina II: violeta.

Indol: pardo.

Floroglucinol: pardo desde el principio.

**Fermentación.**

Por la levadura, como la glucosa.

**Hidrazonas.**

Con fenilhidrazina (específica), p-bromofenilhidrazina, p-bromobenzhidrazina, o-tolihidrazina.

**Osazona.**

Con fenilhidrazina.

B) — Cetohechosas.

Las cetohechosas no son atacadas por el yodo, ni por el agua de bromo, sino después de estar en contacto varias horas.

**Reducción.**

Shaffer y Hartmann.

Hagedorn y Jensen.

Fischl (27): este método está fundado en la reducción de las sales de cobre por la levulosa en condiciones de temperatura tales que las aldosas no reaccionan.

Campbell y Hana (28): se funda en la reducción del ácido fosfomolibdico por la levulosa.

**Colorimetría.**

Orcinol: amarillo intenso.

Naftol I: rojo violeta.

Naftol II: azul.

Difenilamina I: azul. (Sensibilidad: 10 gammas - 20 gammas); sólo 27 veces más fuerte que para las aldosas.

Difenilamina II: azul (sensibilidad: 50 gammas); 50 veces más fuerte que para las aldosas.

Indol: pardo.

Floroglucinol: pardo desde el principio.

Resorcinol clorhídrico (reacción de Seliwanoff): rojo.

**Fermentación.**

Por la levadura del pan.

**Hidrazonas.**

Con o-nitrofenilhidrazina, que diferencia la fructosa de la glucosa, que no forma cristales en esas condiciones.

**Osazonas.**

Con fenilhidrazina, p-bromofenilhidrazina y p-nitrofenilhidrazina.

2o. Pentosas.

a) Arabinosa - Xilosa.

**Reducción.**

Shaffer y Hartmann.

Hagedorn y Jensen.

**Colorimetría.**

Reactivo de Bial: verde.

Reactivo de Tauber: rojo.

**Fermentación.**

Las pentosas no son fermentadas por la levadura.

**Hidrazonas.**

La arabinosa, con la p-bromofenilhidrazina, la o-nitrofenilhidrazina, la benzhidrazina (específica) y la p-bromobenzhidrazina. La xilosa, con la m-nitrofenilhidrazina (específica).

**Osazonas.**

La arabinosa y la xilosa, con la fenilhidrazina.

**Métodos especiales:** Entre estos se encuentran el que aprovecha la propiedad de las pentosas de transformarse en furfural por la acción de los ácidos fuertes, el cual puede ser extraído en corriente de vapor a 175° C. y dosificado por la anilina.

b) Metilpentosas (rhamnosa).

**Colorimetría.**

Reactivo de Rosenthaler: violeta.

Reactivo de Schiff: amarillo; las pentosas dan un color rojo en las mismas condiciones.

Reactivo de Bial: verde.

**Hidrazonas.**

Con la p-bromobenzhidrazina y la p-telhidrazina.

**Osazonas.**

Con la fenilhidrazina y la p-bromofenilhidrazina.

3o. Disacáridos.

En este estudio se consideran maltosa y lactosa.

### **Reducción.**

Shaffer y Hartmann.

Hagedorn y Jensen.

### **Colorimetría.**

Orcinol.

### **Fermentación.**

Con la levadura: lactosa: negativa; maltosa: positiva.

### **Hidrazonas y Osazonas.**

Otro método basado en la especificidad de las reacciones coloreadas, el de Dische (29) puede servir de base para la elaboración de un método más preciso. Los reactivos empleados en este método son los siguientes:

Reacción I de la difenilamina:

Reactivo: 100 ml. HCl concentrado ( $d=1.18$ ).

80 ml.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

20 ml. solución alcohólica al 10% de difenilamina.

Técnica: 1 ml. de solución de glúcidos + 2 ml. del reactivo. Se coloca en baño maría por 30 minutos. La coloración y la sensibilidad (cuando el límite inferior oscila entre 20 gammas y 100 gammas), varían según la especie de glúcido.

Reacción II de la difenilamina:

Se efectúa como la reacción I pero se calienta solamente 1.5 minutos en vez de 30. Esta reacción requiere una concentración mínima de glúcido de 1%.

Reacción III de la difenilamina:

Idéntica a las anteriores, pero con 3 minutos de calentamiento.

Reacción I del (alfa)-naftol (Molisch):

1 ml. de solución de glúcidos + 9 ml. de  $\text{SO}_2\text{H}_2$  1:1. Al mezclarlos, se mantiene la temperatura lo más baja posible; después se pone en baño maría, hirviendo, por 3 minutos, se deja enfriar y se añaden 0.2 ml. de una solución alcohólica de (alfa)-naftol al 5%. Se desarrolla rápidamente una coloración roja virando a violeta.

Reacción II de (alfa)-naftol:

1 ml. de solución de glúcido + 0.5 ml. de solución alcohólica al 2% de (alfa)-naftol + 9 ml. de  $\text{SO}_2\text{H}_2$  (450 ml. de  $\text{SO}_2\text{H}_2$  concentrado + 190 ml. de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Se mezclan y se deja 15 minutos. Esta reacción da un tinte y una intensidad variables según los glúcidos.

Reacción III del (alfa)-naftol:

1 ml. de solución de glúcidos + 0.1 ml. de solución alcohólica al 10% de (alfa)-naftol. + 8 ml. de  $\text{SO}_2\text{H}_2$  concentrado. No debe calentarse.

Reacción III del (alfa) - naftol	Rojo	Pardo —) Acido Glucurónico:		Rojo con la reaccion I del (alfa) - naftol						
		Aldehido glicólico	Pardo	Aldehido glicólico —)	1 ml. de solución de glucido.	Verde - azul [Todos los otros glúcidos dan color rojo]				
					0.1 ml. de solución al 10% de (alfa)-naftol 4 ml. de 50.H <sub>2</sub> concentrado, sin calentar.					
		Triosas	Pardo	Triosas —)	1 ml. de la solución de glucido.	Verde mientras que todos los otros glúcidos dan color rojo.				
					4 ml. SO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> concentrado, enseguida después de enfriar. 0.1 ml. de (alfa) - naftol, al 10%					
		Reacción I del (alfa) - naftol	Rojo	Desoxirribosa (ácido nucleico)	Pardo —) Pentosas		Reacción I de la difenilamina			
					Triosas	Pentosas		Rojo violeta —) Desoxirribosa		
								Desoxirribosa	Aldosas	Rosa —) Aldosas
					Hexosas	Fructosa				
								Hexosas	Fructosa	Acido H-xoan-tosfórico
Hexosas	Fructosa				Fructosa	Reacción III de la difenilamina				
						Hexosas		Fructosa	Fructosa	Reacción III de la difenilamina
Hexosas	Fructosa				Fructosa					Reacción III de la difenilamina
						Hexosas		Fructosa	Fructosa	Reacción III de la difenilamina
Hexosas	Fructosa				Fructosa					Reacción III de la difenilamina
		Hexosas	Fructosa	Fructosa		Reacción III de la difenilamina				
Hexosas	Fructosa				Fructosa	Reacción III de la difenilamina				
		Hexosas	Fructosa	Fructosa		Reacción III de la difenilamina				

Carl Neuberg e Ines Mandl (30) consiguan un método para la caracterización de la fructosa por medio de un derivado cristalino típico de ella, que puede ser preparado en muy pequeñas cantidades; este derivado es la metilfenilosazona de la fructosa de P. F. 158°-160° C. En condiciones usuales, la glucosa no forma la correspondiente osazona cuando es tratada con el acetato de metilfenilhidrazina, lo que permite la diferenciación de fructosa y glucosa. La prueba da resultados satisfactorios con cantidades tan pequeñas como 0.0045 y 0.0025 g. de fructosa, y puede efectuarse en presencia de glucosa, sacarosa y sorbosa.

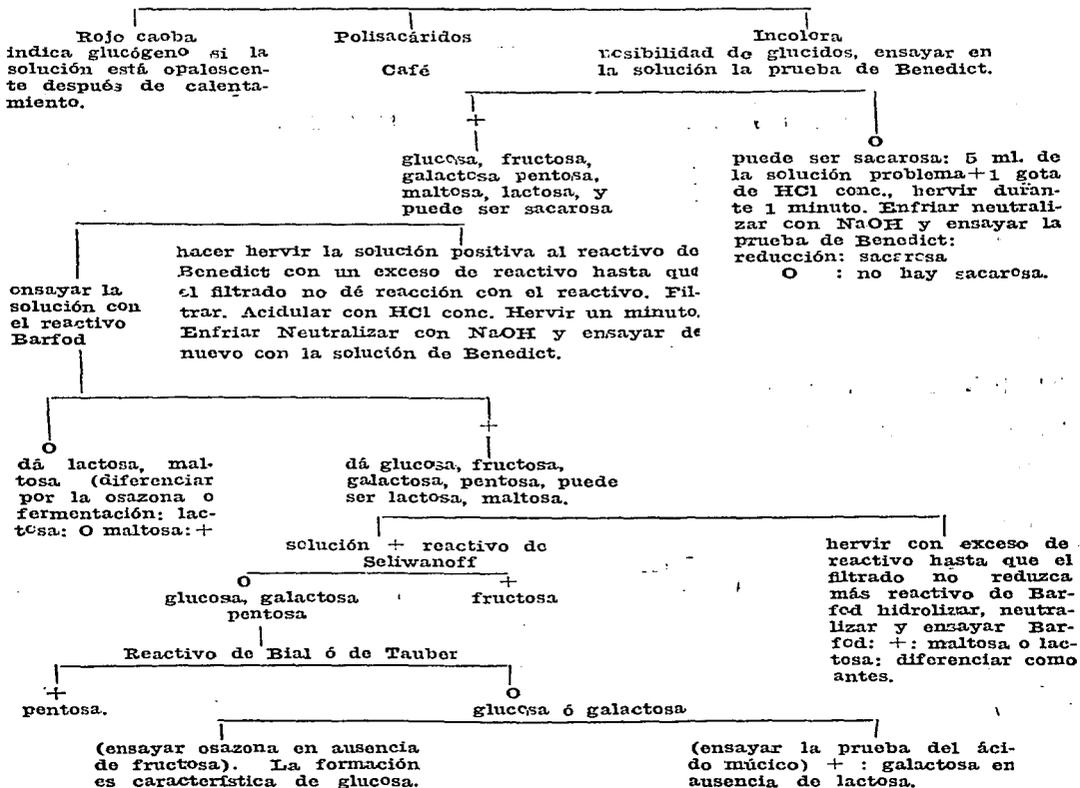
Un método para la formación cuantitativa de las osazonas ha sido presentado por Carl Neuberg y Edward Strauss (31): precipitando el glicolaldehído, d-glucosa, d-manosa, d-fructosa, d-galactosa, l-sorbosa y d-glicero-d-guloaldeheptosa como 2,4-dinitrofenilosazonas, usando la 2,4-dinitrofenilhidrazina en solución clorhídrica. Las osazonas de los monosacáridos que forman di y polisacáridos, pueden ser preparadas también cuantitativamente. Las 2,4-dinitrofenilosazonas formadas se determinan colorimétricamente.

**Método de Hawk y Bergeim (32).**

Estos autores dan el siguiente esquema, que sin embargo, sólo puede aplicarse para investigar glúcidos si éstos están presentes en cantidad mayor de un miligramo; además ciertas identificaciones como la de la galactosa por la prueba del ácido múxico requieren por lo menos 50 mg. de monosa.

Esquema para la identificación de algunos glúcidos según Hawk y Bergeim.

Si la solución está alcalina, neutralizar ó volver ligeramente ácida con HCl; ensayar algunas gotas sobre una tableta de ensayo con una solución de yodo (almidón).



Recientemente, T. W. Whitehead y W. C. Bradbury (33) han ideado un esquema sistemático de análisis cualitativo para diversas mezclas de glúcidos en muestras sólidas o líquidas. La presencia de almidón y dextrinas no interfiere. Este esquema es aplicable a mezclas de azúcares y la mayoría de productos alimenticios; los procedimientos no requieren reactivos difíciles de preparar o conservar ni equipo de laboratorio especializado ni técnicas desusadas. El fundamento del método consiste en remover la fructosa de la muestra sólida con alcohol etílico de 90% en el que es soluble pero otros azúcares y almidones no lo son. La fructosa se confirma por una prueba específica. La lactosa se remueve después del residuo disolviéndolo en alcohol cíclico de 50% y su presencia es confirmada con la formación de su osazona. La sacarosa es determinada por su reacción colorida con nitrato de cobalto. Glucosa y maltosa se separan formando las osazonas y aprovechando su diferencia de solubilidad a 87° C. El método es capaz de determinar 5 mg. de sacarosa y fructosa ó 200 mg. de los otros azúcares en una muestra.

#### Reactivos:

Solución (alfa)-naftol: disuélvase 15 g. de (alfa)-naftol (punto de fusión 95°-96° C.) en 100 ml. de cloroformo.

Alcohol etílico de 90%: dilúyase alcohol etílico de 95% U.S.P. hasta que su gravedad específica sea 0.8305 a 20° C.

Alcohol etílico de 50%: dilúyase alcohol etílico de 95% U.S.P. hasta que su gravedad específica es 0.9316 a 20° C.

Benilhidrazina base: redestílese Eastman Kodak Co. No. 329 a presión reducida a intervalos frecuentes. Se hace inactiva después de prolongada exposición a la luz solar y al aire.

Reactivo ácido dinitrosalicílico: disolver 2 g. de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Eastman Kodak No. 1802) en 70 ml. de agua a 80°-90° C. y agregar 10 ml. de solución de carbonato de sodio conteniendo 20 g. de  $\text{CO}_2\text{Na}_2$  por 100 ml. de agua. Cuando esta mezcla esté fría, dilúyase a 100 ml. con agua.

Solución de hidróxido de sodio: disolver 1.5 g. de NaOH C.P. en suficiente agua para hacer 100 ml. de solución.

Solución de nitrato de cobalto: disolver 5 g. de nitrato de cobalto hexahidratado en 50 ml. de agua, agregar una gota de  $\text{NO}_2\text{H}$  15 N y completar a 100 ml. con agua.

Solución de ácido acético: disolver 50 ml. de ácido acético glacial en 50 ml. de agua.

Solución de hidróxido de potasio al 50%: disolver 50 g. de KOH C. P. en 50 ml. de agua.

#### Procedimiento:

En primer lugar, debe efectuarse una prueba de Molisch para determinar si hay ó no carbohidratos en la muestra. Si esta prueba resulta positiva, se pesan 2 ó 3 g. de muestra; si ésta es líquida, se evapora a sequedad en baño maría y se pesan los 2 ó 3 g. del residuo sólido.

Para separar e identificar la fructosa, la muestra se coloca en un vaso de 150 ml. y se cubre con 50 ml. de alcohol etílico de 90%; se agita

con una varilla de vidrio rompiendo cualquier grumo que hubiere; se cubre el vaso con un vidrio de reloj y se le deja 45 minutos, con agitación ocasional. Se filtra y el filtrado se hace pasar nuevamente por el residuo hasta 3 veces para asegurar la disolución de la fructosa. En el filtrado se confirma la presencia de fructosa por la prueba del ácido dinitrosalicílico u otra prueba específica.

La separación e identificación de la lactosa se efectúa lavando el residuo anterior con 10 ml. de alcohol de 90% y eliminando por succión de vacío este alcohol de lavado; a continuación se transfiere el residuo a un vaso de 150 ml. y se cubre con 20 ml. de alcohol etílico al 50% (la presencia de grumos indica por lo general presencia de maltosa). Se filtra, el residuo contiene lactosa, almidón, dextrinas y huellas de otros azúcares. El residuo se lava varias veces con alcohol de 50% con porciones de 10 ml. cada una. Se pasa a un vaso pequeño y se disuelve en agua. Cualquier residuo insoluble es almidón ó dextrina. Se filtra si es necesario y al filtrado se agregan 0.5 ml. de solución de ácido acético y 0.5 ml. de fenilhidrazina base. Se agita bien esta mezcla, se pasa a un tubo de ensaye y se coloca en baño de agua a 87°C., durante 45 minutos, al cabo de los cuales se filtra rápidamente y se le añaden 50 ml. de agua y se enfría a 20°C. Un precipitado amarillo es la osazona de la lactosa.

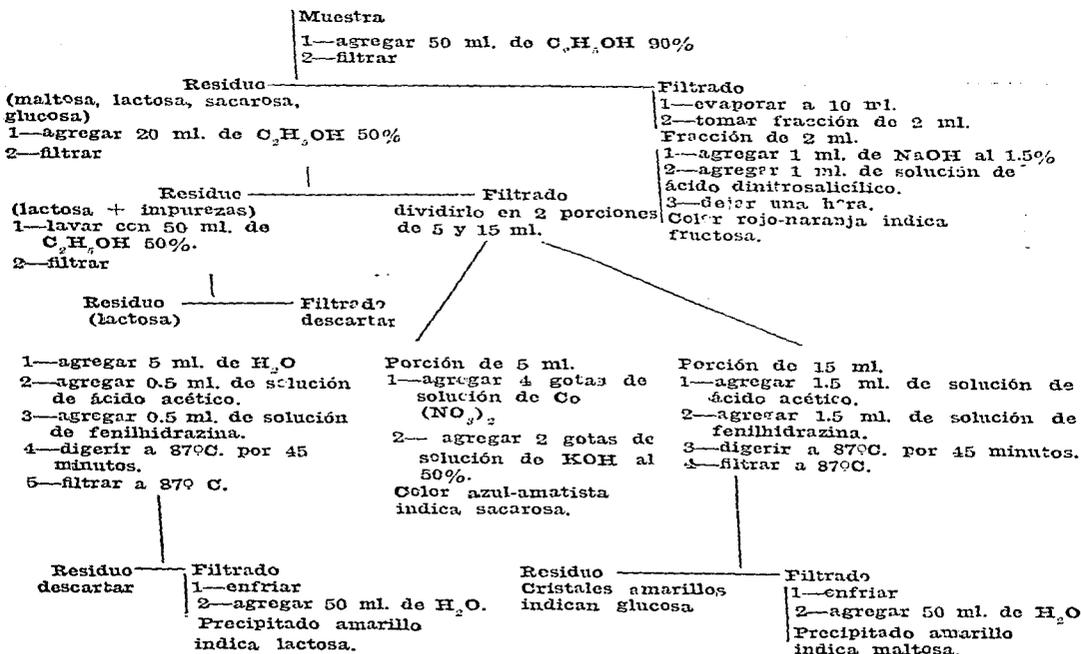
En el filtrado obtenido al tratar la muestra con alcohol etílico de 50% se investiga la sacarosa por medio del nitrato de cobalto y potasa cáustica al 50%; un color azul amatista indica la presencia de sacarosa; la prueba se efectúa agregando a 5 ml. del filtrado 4 gotas de solución de  $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$  y 2 gotas de solución de KOH al 50%.

A otra porción (10-15 ml.) de ese mismo filtrado después de evaporarla a la mitad de su volumen, se le agrega 1.5 ml. de solución de ácido acético y 1.5 ml. de fenilhidrazina base. Se pasa a un tubo de ensaye y se coloca en baño de agua a 87°C. durante 45 minutos, al término de los cuales se filtra rápidamente; un residuo de cristales amarillos es la osazona de la glucosa y el filtrado contiene la osazona de la maltosa en solución; a éste se le añaden 50 ml. de agua y se enfría a 20°C.; se forma un precipitado amarillo cristalino de la osazona de la maltosa, si ésta se hallaba presente en la muestra.

En este procedimiento es esencial remover primero la fructosa; pues de no hacerse así, dará una prueba errónea de glucosa ya que sus osazonas son idénticas. En la solución que contiene la glucosa y la maltosa, es necesario evaporar a la mitad su volumen con objeto de eliminar el alcohol que contiene, pues la presencia de éste demora la formación de las osazonas más de 45 minutos, y la mezcla no debe mantenerse a 87°C. más de ese tiempo porque la sacarosa puede ser hidrolizada y dar una prueba falsa de glucosa.

Las pruebas dadas en este esquema delatan 5 mg. de fructosa ó sacarosa y 200 mg. de glucosa, lactosa y maltosa. El método no es completo, pues no toma en cuenta las pentosas, menos comunes, ni manosa y raiinosa.

El esquema del método es el siguiente:



Se han empleado así mismo métodos papirográficos y cromatográficos en la identificación de los componentes de mezclas de azúcares (34): Forsyth introduce el empleo de reactivos coloridos (resorcinol y nafto-resorcinol) para la determinación de azúcares reductores y no reductores; Flood y colaboradores reportan la determinación cuantitativa de mezclas de 3 ó 4 azúcares simples y metilados, con una exactitud del 5%, empleando como revelador el reactivo micro-Cu de Somogyi. Aplican su método al análisis de gomas vegetales y otros materiales similares y establecen la composición de la goma de *Opuntia Fúlgida*.

Se emplea la reducción del permanganato en solución alcalina para determinar la presencia de carbohidratos reductores: Partridge determina por papirografía, el contenido de azúcares en el jugo de naranja, clara de huevo y sangre fetal de carnero. Se determinaron cuerpos reductores en la orina, empleando como reactivo sobre el papel, una solución de benzidina. Hawthorne describe un procedimiento para la microdeterminación papirográfica de azúcares con una aproximación del 5%.

## CAPITULO IV.

### METODOS SEGUIDOS (Originales ó Modificados).

Hemos aplicado los métodos expuestos en el capítulo anterior, con las modificaciones necesarias, para la identificación de los componentes de diversas mezclas de azúcares.

#### 1a. Mezcla: Sacarosa-Lactosa-Maltosa.

La muestra se formó con 200 mg. de cada uno de los azúcares mencionados disolviéndolos en 50 ml. de agua; siguiendo el esquema de Hawk y Bergeim, se aciduló ligeramente esta solución con HCl y se ensayó la prueba de Benedict hirviendo 8 gotas de la solución de azúcares con 5 ml. del reactivo durante 2 minutos, pero sin hervir tan vigorosamente que se evapore mucha solución; esta prueba dió resultado positivo; a continuación se hizo hervir una parte de la solución positiva al reactivo de Benedict con un exceso de reactivo hasta que el filtrado no dió más reacción con el reactivo; ésto tiene por objeto oxidar todos los azúcares reductores presentes en la solución. Se filtró y se aciduló con HCl concentrado y después de hervir un minuto y enfriar se neutralizó con NaOH, ensayando nuevamente con la solución de Benedict resultando positiva la reacción, lo cual indicó la presencia de sacarosa.

En otra porción de la solución positiva al reactivo de Benedict, se hizo la prueba con el reactivo Barfod, hirviendo 5 ml. de este reactivo con 1 ml. de la solución durante 10 segundos solamente resultando negativa la prueba: ésto nos indicó la presencia de disacáridos (lactosa, maltosa). Para investigarlos, se efectuó la prueba de la osazona colocando 5 ml. de la solución en un tubo de ensaye y agregando 1 ml. de solución de fenilhidrazina; se calentó esta mezcla a baño maría durante 30 minutos. Seguidamente se colocó una gota del material en un portaobjetos y se identificaron al microscopio los cristales característicos de maltosa, en forma de rosetas y los de la osazona de la lactosa en agrupamientos que semejan la forma de un plumero, con lo cual quedaron identificadas la maltosa y la lactosa.

#### 2a. Mezcla: Glucosa-Levulosa-Manosa-Galactosa.

Se pesaron 200 mg. de cada uno de estos azúcares, disolviéndolos en 50 ml. de agua destilada. La muestra se aciduló ligeramente con HCl y se ensayó la prueba de Benedict que dió resultado positivo; a continuación se hizo la prueba con el reactivo de Barfod, resultando también po-

sitiva; entonces se ensayó la reacción de Seliwanoff mezclando 5 ml. del reactivo con 5 gotas de la solución problema y calentando hasta la ebullición; esta prueba resultó positiva acusando la presencia de fructosa. Seguidamente se hizo la prueba de Bial colocando 4 ml. de la solución problema en un tubo de ensaye, se agregaron 15 gotas de reactivo y 1 ml. de HCl concentrado; se tapa la boca del tubo con un pedazo de algodón, calentando a baño maría 10 minutos; la prueba resultó negativa indicando la ausencia de pentosas.

En otra fracción de la solución se efectuó la prueba del ácido múcico, mezclando en un tubo de ensaye 1 ml. de  $\text{NO}_2\text{H}$  concentrado con 10 ml. de la solución; se calienta a baño maría durante hora y media, dejando reposar una noche; al día siguiente se observó un precipitado cristalino que fué identificado al microscopio como ácido múcico, el cual indica la presencia de galactosa en el problema. La formación de estos cristales se favorece raspando con una varilla de vidrio las paredes del tubo.

Para identificación de la manosa, no incluida en el esquema de Hawk y Bergeim, se utilizó la reacción de la manosa con una solución de cloruro de fenilhidrazina al 10% en agua que contiene 15% de acetato de sodio; esta reacción se llevó a cabo sobre la lámina portaobjetos, colocando en ella unas gotas de la solución de glúcidos y de la solución de fenilhidrazina y raspando con una varilla de vidrio para obtener los cristales de la fenilhidrazona de la manosa. Se observó que estos cristales pueden ser distinguidos más claramente, suprimiendo su lavado con agua, acetona al 25%, alcohol y éter que indica el método.

Para la identificación de la glucosa, no podía recurrirse a la formación de la glucosazona puesto que es idéntica a la osazona de la levulosa, también presente en el problema. Se ensayaron varias reacciones que no dieron resultado; se ensayó la reacción con triptofano disuelto en HCl al 50%: no dió coloración; la reacción de Motegi que utiliza una solución de antrona al 1% en ácido acético glacial: no se obtuvo ninguna coloración. La reacción de Mulder, que consiste en alcalinizar débilmente la solución con  $\text{CO}_2\text{Na}_2$ , y añadir una pequeña cantidad de índigo: al calentar se obtuvo una coloración roja-amarillenta debida a la isatina producida por hidrogenación del índigo; esta prueba, así como la reacción II de la difenilamina y la reacción II del (alfa)-naftol, se efectuaron con una solución que contenía los 4 azúcares de la mezcla y con otra que sólo contenía levulosa, manosa y galactosa; con la 3 reacciones se obtuvo idéntica coloración en ambas soluciones. También se ensayó la reacción con el nitrato de plata amoniacal, pero las dos soluciones comparadas produjeron un precipitado negro de plata reducida; se probó la reacción con la 2-4-dinitrofenilhidrazina, obteniéndose en las dos soluciones cristales del mismo tipo y poco definidos.

Otras pruebas que dieron idéntica coloración con ambas soluciones fueron: prueba del ácido pícrico: color rojo oscuro; prueba con el reactivo Nylander (35): color negro. Para preparar este reactivo se disuelven 2 g. de subnitrato de bismuto y 4 g. de sal de Rochelle en 100 g. de

solución de NaOH al 8%; la prueba se efectúa hirviendo 10 ml. del problema con 1 ml. de reactivo; reacción de Lum (36): produjo un tinte café; esta reacción se hace calentando la solución problema con resorcinol y  $\text{SO}_2\text{H}_2$  concentrado; las reacciones de: Ihl (37), con (beta)-naftol, de Hager-Gawalewsky (38) con molibdato de amonio y de Rosenbach (39) con nitroprusiato sódico y NaOH, produjeron una coloración verde-azulosa con las dos soluciones probadas.

Además se hizo una prueba de fermentación con levadura de cerveza: se dispusieron 4 tubos conteniendo 10 ml. de: agua destilada, agua destilada + glucosa, solución problema y solución problema — glucosa respectivamente; a cada uno de estos tubos se le agregó 1 ml. de levadura fresca. Se les dejó 24 horas a la temperatura ambiente, al cabo de las cuales se observó fermentación en todos ellos, excepto en el que contenía agua destilada solamente.

En vista del resultado negativo de las pruebas descritas, la mezcla sólida de los 4 azúcares se trató durante 45 minutos con 50 ml. de alcohol etílico al 90%, según el método de Whitehead y Bradbury; se filtró la mezcla y en el filtrado se identificó la levulosa por la prueba de Seliwanoff: usamos esta prueba en vez de la del ácido 3,5-dinitrosalicílico indicada en el esquema, por carecer de este reactivo; el intenso color rojo desarrollado indicó la presencia de levulosa. La reacción de Seliwanoff no requiere la evaporación del alcohol en la solución problema. El residuo fué disuelto en 20 ml. de agua destilada; en esta solución se identificó la manosa por medio de su fenilhidrazona en la forma antes dicha. En otra porción de 10 ml. de solución, previamente evaporado el alcohol que contenía, se hizo la prueba del ácido múcico, añadiendo 1 ml. de  $\text{NO}_2\text{H}$ , concentrado y procediendo como anteriormente, identificando de este modo la galactosa. En esta misma fracción, la glucosa, por la oxidación con el  $\text{NO}_2\text{H}$ , forma el ácido sacárico, soluble. Se separaron los cristales de ácido múcico, y se formó la sal potásica del ácido sacárico con la adición de un pequeño volumen de solución de  $\text{CO}_3\text{K}_2$ ; los cristales de sacarato potásico, que confirmaban la presencia de glucosa, se obtuvieron evaporando cuidadosamente la solución, siendo identificados al microscopio.

En este caso, no podía identificarse la glucosa por medio de su osazona, pues tanto la galactosa como la manosa, producen con la fenilhidrazina agujas amarillas sumamente parecidas a las de la glucosazona, y estando presentes en la misma solución, daría por lo tanto una prueba falsa de glucosa.

### 3a. Mezcla: Sacarosa-Lactosa-Glucosa-Galactosa-Levulosa.

Se utilizaron 200 mg. de cada glúcido. Siguiendo el método de Whitehead y Bradbury, la mezcla se trató con 50 ml. de alcohol etílico de 90% durante 45 minutos, agitando ocasionalmente para asegurar la disolución de la levulosa; al cabo de este tiempo se filtró la mezcla, identificando la levulosa en el filtrado con la prueba de Seliwanoff. El residuo se trató con 20 ml. de alcohol etílico de 50% filtrándose a continuación. El residuo, después de ser lavado con 50 ml. de alcohol de 50% divididos

en varias porciones, fué disuelto en 5 ml. de agua destilada, añadiéndose a continuación 0.5 ml. de solución de ácido acético y 0.5 ml. de solución de fenilhidrazina; el tubo de ensaye que contenía esta mezcla fué colocado en baño maría manteniendo la temperatura de la solución a 87° C. durante 45 minutos al término de los cuales se enfrió a unos 20° C. y se le añadieron 25 ml. de agua formándose un precipitado amarillo que confirmó la presencia de lactosa.

El filtrado resultante del tratamiento del primer residuo con 20 ml. de alcohol de 50%, se dividió en 2 porciones; en una de ellas, de 5 ml., se agregaron 4 gotas de solución de  $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$  y 2 gotas de solución de KOH al 50%, produciéndose una coloración azul-amatista que identifica la sacarosa. En otra porción de la solución, previamente evaporado el alcohol que contenía, se hizo la prueba de ácido múico que resultó positiva, identificándose así la galactosa. Una vez separados los cristales de ácido múico de esta solución, se identificó en ella la glucosa por medio de la sal potásica del ácido sacárico, en la misma forma que en el problema anterior.

#### 4a. Mezcla: Maltosa-Glucosa-Sacarosa.

La muestra se formó con 200 mg. de cada uno de estos azúcares y fué tratada directamente con 20 ml. de alcohol etílico de 50% en los que se disolvió totalmente. En 5 ml. de esta solución se identificó la sacarosa por medio de la reacción con el nitrato de cobalto y el hidróxido de potasio; en el resto de la solución, previa evaporación a la mitad de su volumen, se formó la osazona de la glucosa añadiendo 1.5 ml. de solución de ácido acético y 1.5 ml. de solución de fenilhidrazina, calentando en baño de maría a 87°C. durante 45 minutos; al terminar este tiempo, se filtró la solución a 87°C. rápidamente con objeto de evitar que al enfriarse la solución precipite también la osazona de la maltosa, que a esa temperatura de 87°C. permanece en solución; en el filtro quedó un residuo constituido por cristales amarillos de glucosazona, que identificaban la glucosa; al filtrado después de ser enfriado, se le añadieron 25 ml. de agua, produciéndose entonces un precipitado amarillo (maltosazona) que confirmaba la presencia de maltosa.

#### 5a. Mezcla: Sacarosa-Glucosa-Levulosa.

Se compuso la muestra de 200 mg. de cada azúcar. Primeramente se le agregaron 50 ml. de alcohol etílico de 90%, dejándose durante 45 minutos. A continuación se filtró, investigándose la levulosa en el filtrado con el reactivo de Seliwanoff, habiendo resultado positiva la prueba. El residuo fué disuelto en 20 ml. de alcohol etílico de 50%; esta solución fué dividida en 2 fracciones: en una de ellas fué identificada la sacarosa por la característica coloración azul-amatista que produce con las soluciones de  $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$  y de KOH al 50%. A la otra fracción de la solución una vez que le fué eliminado el alcohol por evaporación, se le añadieron 1.5 ml. de ácido acético 1:1, 1.5 ml. de solución de fenilhidrazina, y se puso a digerir a 87°C. por 45 minutos, formándose al cabo de este tiempo los cristales de glucosazona que fueron identificados al microscopio como

prueba positiva de glucosa.

**6a. Mezcla: Sacarosa-Arabinosa-Xilosa-Glucosa-Levulosa.**

Se usaron 200 mg. de cada azúcar. En primer término se removió la levulosa de la mezcla por medio del tratamiento con alcohol etílico de 90%; se filtró, identificándose en el filtrado la levulosa con la reacción de Seliwanoff; el residuo se trató con 10 ml. de alcohol etílico de 96% calentando; de esta manera se disuelve la xilosa, pero no los otros azúcares. A continuación se filtró, y el filtrado, que contiene la xilosa en solución alcohólica, se diluyó con agua para evaporar más fácilmente el alcohol; a medida que éste va siendo eliminado, se reemplaza con agua, hasta dejar la xilosa en solución acuosa; ya eliminado totalmente el alcohol, se le agregaron 1.5 ml. de ácido acético 1:1 y 1.5 ml. de solución de fenilhidrazina; se colocó el tubo en baño maría durante 45 minutos, formándose la xilosazona, cuyos cristales en forma de agujas delgadas dispersas fueron identificados al microscopio, reconociendo de este modo la xilosa.

El residuo del tratamiento con alcohol caliente después de ser lavado con 2 porciones de 5 ml. de alcohol de 96% en las mismas condiciones, a fin de eliminar la xilosa lo más completamente posible, se disolvió en 20 ml. de alcohol etílico de 50%, identificándose en 5 ml. de esta solución la sacarosa por la prueba con nitrato de cobalto é hidróxido de potasio; la arabinosa se investigó en esta misma solución por la reacción de Tauber en la siguiente forma: se colocó en un tubo de ensaye 0.5 ml. del reactivo de Tauber, agregando unas gotas de la solución de glúcidos; se hizo hervir fuertemente, enfriando a continuación; se desarrolló un color rojo intenso muy estable, que indica la presencia de pentosas, en este caso de arabinosa.

En el resto de la solución alcohólica al 50%, se investigó la glucosa una vez evaporado el alcohol de la solución, por medio de su osazona, con ácido acético y fenilhidrazina en la forma usual. Los cristales de glucosazona fueron identificados al microscopio.

## CAPITULO V. APLICACIONES PRACTICAS.

Se hicieron aplicaciones de los anteriores procedimientos analíticos en una muestra de melaza sulfitada, en leche condensada azucarada y en una muestra de miel de abejas.

En el primer caso, el propósito fué investigar la presencia en la melaza además de la sacarosa, glucosa y levulosa siempre presentes en las mieles finales, de dos pentosas: xilosa y arabinosa. La primera, procedente del xilano, un pentosano que después de la celulosa y la lignina es el compuesto orgánico más ampliamente distribuido en la naturaleza (corteza de árboles, salvado, paja, gomas vegetales, etc.), probablemente presente también en la fibra de la caña, y que en el curso de la fabricación del azúcar podría producir por hidrólisis, xilosa.

La arabinosa se origina de las gomas que contiene el jugo de la caña de azúcar en cantidad variable según la variedad, edad y estado de la caña; estas gomas son sólo parcialmente eliminadas del jugo en el proceso de defecación, pero cierta cantidad de ellas persiste hasta las melazas ó mieles finales.

Para efectuar el análisis procedimos de acuerdo con el método de Whitehead y Bradbury; para ello es necesario en primer lugar tener la muestra en estado sólido; se coloca cierta cantidad de la muestra en una cápsula de porcelana calentándola en baño maría durante varias horas, hasta quedar la muestra sólida. No puede hacerse esto a alta temperatura porque se carameliza la miel, alterándose en consecuencia su composición. Una vez que se tuvo la muestra en estado sólido, se pesaron 2 g. de ella rápidamente, con el objeto de evitar que absorba humedad y adquiera consistencia pastosa, lo que dificulta su manipulación. A continuación se pasó la muestra a un pequeño vaso de precipitados, cubriéndola con 50 ml. de alcohol etílico de 90% y agitándola ocasionalmente con una varilla de vidrio para asegurar la disolución de la levulosa. Después de 45 minutos de este tratamiento, se filtró. En el filtrado se ensayó la reacción de Seliwanoff añadiendo a 5 ml. del reactivo en un tubo de ensaye 5 gotas de filtrado alcohólico, y calentando hasta la ebullición se desarrolló el color rojo que nos indicó levulosa.

El residuo fué lavado con 2 porciones de 5 ml. cada una de alcohol etílico de 90% para eliminar la levulosa lo más completamente posible.

A continuación se trató el residuo con 10 ml. de alcohol etílico de 96%, y se calentó la mezcla durante un minuto aproximadamente, con el fin de disolver la xilosa; se filtró, y en el filtrado se investigó la xilosa por medio de su osazona; para hacer esta prueba es necesario primero eliminar el alcohol en que se halla disuelta la xilosa, substituyéndolo gradualmente con agua; a esta solución se le agregaron 1.5 ml. de ácido acético 1:1 y 1.5 de solución de fenilhidrazina, calentando en baño maría durante 45 minutos. Al terminar este tiempo se colocaron unas gotas de la solución en un portaobjetos para examinarlas al microscopio pero no se encontraron las formaciones características de xilosazona, resultando **negativa** la prueba de xilosa.

El residuo del tratamiento con alcohol de 96% se lavó 2 veces con 5 ml. de alcohol de 96% también caliente para eliminar residuos de xilosa. Después del lavado, el residuo se trató con 20 ml. de alcohol etílico de 50%, habiéndose disuelto completamente. Esta disolución tomó un color café obscuro que nos hubiera impedido apreciar las coloraciones producidas en las reacciones siguientes, por lo cual fué necesario defecarla con acetato básico de plomo. Una vez filtrada, se tomaron 5 ml. de la solución clara para investigar sacarosa: en un tubo de ensaye se colocaron los 5 ml. de muestra agregándose 4 gotas de solución de nitrato de cobalto y 2 gotas de solución de KOH al 50%, produciéndose la coloración azulamatista típica de esta reacción, determinando así la presencia de sacarosa en la muestra.

De la misma solución defecada se tomaron unas gotas agregándolas a 0.5 ml. del reactivo de Tauber en un tubo de ensaye, haciendo hervir fuertemente la mezcla y enfriándola a continuación; se observó la aparición del color rojo que indica la presencia de pentosas, en este caso, de **arabinosa**.

A la porción restante de la solución defecada, después de haberle sido eliminado el alcohol por evaporación, se le añadieron en un tubo de ensaye 1.5 ml. de solución de ácido acético y 1.5 ml. de solución de fenilhidrazina, calentando la mezcla en baño maría a 87° C. durante 45 minutos; se formó el precipitado amarillo de glucosazona cuyos cristales fueron identificados al microscopio como prueba positiva de **glucosa**.

## 20. Caso.

En el análisis de los azúcares contenidos en una muestra de leche condensada azucarada, se investigó la presencia de la sacarosa añadida a esta leche para su preparación, de la lactosa propia de la leche, y de los monosacáridos originados por la hidrólisis de aquellos azúcares: **glucosa**, **levulosa** y **galactosa**.

La muestra fué secada a baño maría hasta quedar transformada en gránulos que fueron pulverizados, procediendo a pesar 2 g. de muestra así preparada. Se llevan a un vaso pequeño, añadiendo 50 ml. de alcohol etílico de 90% para remover la levulosa. Después de 45 minutos se filtró, investigando en el filtrado la levulosa por la prueba de Seliwanoff, que resultó **positiva**, indicándonos la presencia de levulosa en la muestra.

El residuo después de ser lavado con 10 ml. de alcohol de 90% para eliminar las huellas de levulosa, se trató con 20 ml. de alcohol etílico de 50%, filtrando a continuación esta mezcla. El residuo, previo lavado con alcohol de 50%, se disolvió en 5 ml. de agua destilada, añadiéndole a continuación 0.5 ml. de solución de ácido acético y 0.5 ml. de solución de fenilhidrazina, para investigar la lactosa por medio de su osazona. La mezcla fué calentada en baño maría por 45 minutos, manteniendo su temperatura a 87° C. Al cabo de este tiempo, se enfrió la solución a la temperatura ambiente y al agregarle 25 ml. de agua fría se formó un precipitado amarillo de la lactosazona, confirmando de este modo la presencia de lactosa.

El filtrado resultante del tratamiento del primer residuo con alcohol de 50%, fué dividido en 2 fracciones: en una de ellas, de 3 ml. se hizo una prueba de sacarosa por la reacción con el nitrato de cobalto y el hidróxido de potasio, la cual dió resultado positivo indicando sacarosa. En otra fracción de 8 ml. del filtrado, se investigó la galactosa por medio de la prueba del ácido múcico; para ello se eliminó por evaporación el alcohol de la solución, agregando entonces 1 ml. de  $\text{NO}_2\text{H}$  concentrado y calentándola en baño maría durante hora y media. Se dejó reposar la solución durante una noche; transcurrido este tiempo y después de raspar las paredes del tubo con una varilla de vidrio, no se observó formación de cristales; esto nos indicó la ausencia de galactosa en la muestra. Teniendo en cuenta este resultado, la glucosa puede ser investigada por medio de su osazona, pues no hay en esta solución ningún otro azúcar que produzca con la fenilhidrazina formas cristalinas análogas a las de la glucosa. En la fracción restante del filtrado después de haberle evaporado el alcohol, se hizo la prueba con la fenilhidrazina en la forma acostumbrada, obteniéndose un precipitado cristalino que fué identificado al microscopio como glucosazona, teniendo de este modo una prueba de la presencia de glucosa en el problema.

### 3er. Caso.

Otra aplicación de los métodos descritos en capítulos anteriores fué la que se hizo en miel de abejas. La miel de abejas es azúcar invertido natural, estando cristalizada en ella la glucosa.

La muestra se secó en baño maría como en los casos anteriores, pesando 2 g. del residuo seco rápidamente para evitar la absorción de humedad. Esta muestra se pasa a un vaso donde se le agregan 50 ml. de alcohol etílico de 90%, dejándose durante 45 minutos y agitando la mezcla algunas veces con lo que se extrae la levulosa de la muestra. Se filtra la mezcla, investigándose la levulosa en el filtrado con el reactivo de Selivanoff, resultando una intensa coloración roja, considerada como prueba positiva de levulosa. El residuo puede ser disuelto en alcohol de 50% ó en agua indistintamente; en el presente caso en que sólo nos interesaba además de la levulosa, confirmar la presencia de sacarosa y glucosa, después de lavado con unos ml. de alcohol de 90%, fué disuelto en agua, efectuando en una parte de esta solución la reacción de la sacarosa con las soluciones de  $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$  y de  $\text{KOH}$  al 50%. La aparición del color

azul-amatista nos indicó la presencia de sacarosa en la miel.

En otra porción de 12 a 15 ml. de la solución se agregó 1.5 ml. de ácido acético 1:1 e igual cantidad de solución de fenilhidrazina, mezclando todo y calentando la mezcla a 87° C en baño maría por 45 minutos. Del precipitado obtenido se colocó una pequeña cantidad en un portaobjetos identificándose al microscopio los cristales de glucosazona, teniendo así una prueba positiva de glucosa en la muestra.

## CAPITULO VI.

### — CONCLUSIONES. —

1a.—Hacemos una exposición general de las estructuras químicas de los diversos azúcares y carbohidratos con el objeto de demostrar la gran dificultad que ofrece la separación de ellos, cuando se encuentran mezclados, y la identificación de cada uno, debido a la gran semejanza de sus estructuras químicas, ya que se trata en la mayor parte de los casos, de mezclas de isómeros.

2a.—El número de reacciones típicas de las distintas clases de azúcares y de carbohidratos es tan considerable que requiere, para su estudio, una clasificación. Esto es lo que llevamos a cabo en el Capítulo II de este trabajo.

3a.—La clasificación de reacciones obedece al criterio de considerar en secciones distintas aquellas que son generales de todos estos cuerpos, las que son especiales de cada uno de ellos, y las que son típicas de algún azúcar en particular.

4a.—Hemos consultado y revisado una bibliografía extensa y creemos haber logrado informarnos de la casi totalidad de reacciones de azúcares que se han publicado hasta la fecha. La mayor parte de ellas las hemos practicado en el laboratorio, con muestras químicamente puras de azúcares diversos.

5a.—Se conocen muy pocas marchas analíticas de separación e identificación de azúcares. Las que consignamos en el Capítulo III son las únicas publicadas. Todas ellas las hemos practicado conforme se detalla.

6a.—No encontramos satisfactoria ninguna de las marchas analíticas. Sin embargo, la de Dische, la de Hawk y Bergeim y la de Whitehead y Bradbury son las más seguras.

7a.—Fundándonos en las marchas analíticas anteriormente mencionadas, hemos procedido en los diversos casos que estudiamos. Algunas modificaciones que introdujimos en ellas se consignan en el Capítulo IV.

8a.—Hemos resuelto los problemas de identificación de distintos azúcares mezclados, de modo satisfactorio. Las mezclas que analizamos fueron: sacarosa-lactosa-maltosa; glucosa-levulosa-manosa-galactosa; sacarosa-lactosa-glucosa-galactosa-levulosa; maltosa-glucosa-sacarosa; sacarosa-glucosa-levulosa; sacarosa-arabinosa-xilosa-glucosa-levulosa.

9a.—Hicimos aplicación práctica de todas las reacciones y marchas analíticas a mieles incristalizables y sulfitadas de caña de azúcar, a leche condensada y azucarada y a miel de abejas.

10a.—Hemos conseguido buenos resultados e identificación completa de los azúcares que se mencionan en todos los casos citados.

## CAPITULO VII.

### — BIBLIOGRAFIA. —

- (1) G. A. Hill and L. Kelley.—Organic Chemistry. 470 (1943).
- (2) W. W. Pigman and R. M. Goepf, Jr.—Chemistry of the Carbohydrates. 43 (1948).
- (3) W. W. Pigman and R. M. Goepf, Jr.—Loc. Cit. 43.
- (4) J. Giral y O. Fernández.—Tratado de Química Orgánica. 197 (1923).
- (5) J. Giral y O. Fernández.—Loc. Cit. 197.
- (6) J. Giral y O. Fernández.—Loc. Cit. 197.
- (7) J. Giral y O. Fernández.—Loc. Cit. 198.
- (8) J. Giral y O. Fernández.—Loc. Cit. 198.
- (9) J. Giral y O. Fernández.—Loc. Cit. 198.
- (10) R. Dreywood.—Ind. and Eng. Chemistry, Analytical Edition, 18, 499, (1946).
- (11) L. Sattler and F. W. Zerban.—J. Am. Chem. Soc., 72, 3814, (1950).
- (12) J. B. Sumner and G. F. Somers. — Laboratory Experiments. 51 (1949).
- (13) N. C. Turner.—Science, 108, 302, (1948).
- (14) A. M. Staub.—Techniques de Laboratoire. 590 (1949).
- (15) B. Harrow.—Tratado y Prácticas de Bioquímica. 2a. trad. esp. 26 (1950).
- (16) J. B. Sumner and G. F. Somers.—Loc. Cit. 39.
- (17) A. M. Staub.—Loc. Cit. 585.
- (18) S. Siggia.—Quantitative Organic Analysis via Functional Groups. 10 (1949).
- (19) R. L. Shriner and R. C. Fuson.—The Systematic Identification of Organic Compounds. 59 (1940).
- (20) W. W. Pigman and R. M. Goepf, Jr.—Loc. Cit. 144.
- (21) W. W. Pigman and R. M. Goepf, Jr.—Loc. Cit. 70 .
- (22) A. M. Staub.—Loc. Cit. 586.
- (23) A. M. Staub.—Loc. Cit. 608.
- (24) P. A. Shaffer and A. F. Hartmann.—J. Biol. Chem., 45, 365, (1920-21) in A. M. Staub.—Loc. Cit. 608.
- (25) H. C. Hagedorn-B. N. Jensen.—Bioch. Zeit., 135, 46, (1923) in A. M. Staub.—Loc. Cit. 608.
- (26) Ch. Dumazert.—Thèse de Pharmacie de Marseille (1936) in A. M. Staub.—Loc. Cit. 608.
- (27) F. Fischl.—Chem. Ztg., 57, 333, (1932) in A. M. Staub.—Loc. Cit. 613.

- (28) W. R. Campbell and M. I. Hana.—J. Biol. Chem., 69, 703, (1926)  
in A. M. Staub.—Loc. Cit. 613.
- (29) A. M. Staub.—Loc. Cit. 591-92.
- (30) C. Neuberg—I. Mandl.—Archives of Biochemistry, 11, 451, (1946).
- (31) C. Neuberg—E. Strauss.—Archives of Biochemistry, 11, 457, (1946).
- (32) A. M. Staub.—Loc. Cit. 588.
- (33) T. W. Whitehead and W. C. Brabdry.—Analytical Chemistry, 5,  
651-53 (1950).
- (34) E. Hanhausen.—Tests, U. N. A. M.—E. C. Q. (1950).
- (35) The Merck Index.—Fifth Edition. 851 (1940).
- (36) The Merck Index.—Loc. Cit. 820.
- (37) The Merck Index.—Loc. Cit. 771.
- (38) The Merck Index.—Loc. Cit. 769.
- (39) The Merck Index.—Loc. Cit. 886.