

21. Determinación de glúcidos

Isaac Túnez¹, Aurora Galván², Pedro Montilla¹

¹Dep. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 – Córdoba, España.

²Dep. de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio C-6 (Severo Ochoa), Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, España

RESUMEN

Siendo aldehídos o cetonas, los glúcidos se clasifican también atendiendo a la cantidad de unidades que los constituyen en: monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. El monosacárido más abundante y de especial relevancia para el ser humano es la glucosa, debido a su participación en diferentes trastornos metabólicos y endocrinos, siendo la diabetes sacarina la causa más común de las afecciones del metabolismo de los hidratos de carbono. Esta práctica analiza los glúcidos, sus reacciones coloreadas, importancia, metabolismo y fisiopatología, así como al conocimiento de las principales medidas para su identificación y seguimiento.

Título Corto: Glúcidos

Palabras Clave: Hidratos de carbono, glucosa, diabetes, reacciones coloreadas

Abreviaturas:

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los glúcidos, también conocidos como azúcares, sacáridos, carbohidratos o hidratos de carbono, constituyen el grupo de biomoléculas más abundantes sobre la superficie terrestre y representan los principales componentes de tipo energético-nutricional. Estas moléculas responden a la composición genérica $C_n (H_2O)_n$, con una relación entre H y O que le ha valido el término de carbohidrato.

Desde el punto de vista químico, los glúcidos son *polihidroxialdehídos* o *polihidroxicetonas*, esto es, alcoholes polivalentes (polialcoholes) que contienen un grupo carbonilo aldehídico (si lo porta el carbono del extremo) o cetónico (si lo porta un carbono interno).

Entre las propiedades físicas destaca la de su poder edulcorante y el desviar, como después analizaremos, la luz polarizada en el seno de las soluciones. Sus funciones biológicas principales son:

- * Reserva energética: hígado, musculatura...
- * Papel estructural o plástica en el mundo vegetal y animal
- * Fuente inmediata de energía para la inmensa mayoría de las células
- * Suministradores de átomos para formar otras moléculas en rutas anapletóricas

El objetivo perseguido en esta práctica será una correcta comprensión del concepto

de glúcido y de su clasificación. Asimismo, se pretende una introducción a la fisiopatología y relevancia clínica relacionadas con estas macromoléculas, así como a las reacciones que han servido y sirven para su reconocimiento.

1.1. Metabolismo de los glúcidos.

La digestión de los polisacáridos se inicia en la boca, en donde la **amilasa** de la saliva hidroliza el almidón para dar dextrinas y maltosa. En el estómago, la amilasa de la saliva se inactiva por el pH. En el intestino, a pH más alcalino, actúan las enzimas procedentes del páncreas como la amilasa pancreática. Finalmente, enzimas de la mucosa intestinal concluyen la degradación (disacaridasas).

Posteriormente los monosacáridos son absorbidos a través de la pared intestinal hacia el torrente sanguíneo y llevados al hígado por medio de la circulación portal.

1.2. Regulación hormonal

Las hormonas que regulan la concentración de glucosa en sangre son:

- a. Insulina (células beta del páncreas), hipoglucemiante
- b. Glucagon (células alfa del páncreas), hiperglucemiante
- c. Adrenalina (médula suprarrenal), hiperglucemiante
- d. Tiroxina (glándulas tiroides), efecto insignificante
- e. Hormona del crecimiento, GH (pituitaria anterior o hipófisis anterior), hiperglucemiante
- f. Hormona adrenocorticotropa, ACTH (pituitaria anterior), hiperglucemiante
- g. Cortisol (corteza suprarrenal), hiperglucemiante
- h. Somatostatina (células del páncreas, otros tejidos) leve
- i. Somatomedinas (hígado), leve

1.3. Alteraciones del metabolismo de la glucosa

- **Hiperglucemias**

*** Diabetes sacarina o *Mellitus* (clasificación según el comité de expertos de la ADA y la OMS)**

Diabetes *Mellitus* tipo 1

Diabetes Mellitus tipo 2

Diabetes gestacional

Otros tipos específicos de diabetes:

Defectos genéticos de la función de la célula beta

Defectos genéticos en la acción de la insulina

Enfermedades del páncreas exocrino

Endocrinopatías

Inducida por químicos o drogas

Infecciones

Formas no comunes de diabetes mediada por fenómenos inmunes

Otros síndromes genéticos asociados a veces con diabetes

* **Afecciones en la tolerancia a la glucosa**

* **Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa**

* **Anormalidad potencial de la tolerancia a la glucosa**

- **Hipoglucemias**

Reactiva

Facticia

Posprandial

Espontánea o de ayuno

- **Errores innatos del metabolismo**

- **Afectaciones del Almacenamiento del Glucógeno**

- Tipo I (von Gierke)

- Tipo II (Pompe)

- tipo III (Cori)

- Tipo IV (Andersen)

- Tipo V (McArdle)

- Tipo VI (Hers)

- Tipo VII (Tauri)

- Tipo VIII, IX y X

- **Galactosemia**

Incapacidad de metabolizar la galactosa por deficiencia o ausencia de las tres enzimas que participan en su metabolismo. La galactosemia clásica es diagnosticada en lactantes. Tras la ingestión de leche se presentan vómitos, diarrea, cirrosis, cataratas y retraso mental.

El diagnóstico se efectúa por la identificación de galactosa en orina o suero y se confirma al encontrar una deficiencia enzimática.

- **Afecciones del metabolismo de la fructosa**

La fructosa puede aparecer en orina después de la ingesta de frutas, miel y jarabes. Hay tres grupos específicos de afectaciones; todos ellos se transmiten como rasgo autosómico recesivo.

- **Enfermedades de almacenamiento de los mucopolisacáridos**

Los mucopolisacáridos son componentes estructurales de cartílagos, hueso, piel y otros tejidos conjuntivos. Los tres tipos que participan son: dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato.

El Síndrome de Hurler es el prototipo; se trata de un almacenamiento progresivo que conlleva el enturbiamiento de la cornea y la muerte antes de los 10 años. Los individuos presentan anomalías esqueléticas, retraso en el desarrollo y hepatoesplenomegalia. Se diagnostica mediante la determinación de mucopolisacáridos en la orina.

2. MATERIAL Y REACTIVOS

2.1 Material

- Ácido clorhídrico
- Agua destilada
- Arabinosa
- Baño maría
- Cloruro férrico
- Fructosa
- Glucosa
- Orcinol
- α -Naftol
- Pipetas 1 – 5 ml
- Pipetas automáticas 25 – 1000 μ L
- Pipetas Pasteur
- Puntas desechables
- Resorcino
- Sacarosa
- Tubos de ensayo de vidrio
- Xilosa

3. PROCEDIMIENTO

3.1. Reacciones coloreadas de los glúcidos

La reactividad de los hidratos de carbono es debida fundamentalmente, a los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo.

3.1.1. Prueba de Molisch

Determina la presencia de glúcidos en el medio. El ácido sulfúrico es utilizado como agente de deshidratación. El proceso consiste en la formación de un producto de condensación color púrpura, que se obtiene al reaccionar el hidrato de carbono en el medio ácido con el reactivo de Molisch que contiene α -naftol.

* **Preparación del reactivo de Molisch:** disolver 100 g de α -naftol en 1000 ml de alcohol etílico (95%).

* Enumerar diferentes tubos

* Incorporar 1 ml de las siguientes soluciones:

- Glucosa 5 por 100
- Arabinosa 5 por 100

- Fructosa 5 por 100
- Sacarosa 5 por 100
- Azúcar problema
- Agua destilada

- * Añadir dos gotas del reactivo (inclinando los tubos de ensayo durante la adición)
- * Depositar lentamente en cada tubo, a lo largo de su pared, 2 ml de ácido sulfúrico concentrado
- * Agitar ligeramente
- * Observar los cambios que acontecen en la interfase entre las dos disoluciones

3.1.2. Reacción de Barfoed

El reactivo basa su capacidad en la reducción de los iones Cu^{2+} presentes en una dilución. Este reactivo contiene Cu^{2+} en un medio ligeramente ácido y es una prueba característica de monosacáridos.

* **Preparación del reactivo de Barfoed:** Disolver 66 g de acetato cúprico y 10 ml de ácido acético glacial en 800 ml de agua. Completar la solución hasta 1 litro con agua.

- * Tomar tres tubos
- * Poner 2 ml de una disolución que contenga respectivamente:

- Glucosa 5 %
- Sacarosa 5%
- Problema

- * Incorporar 3 ml del reactivo
- * Poner en baño maría.

Posteriormente, observar el cambio de color. Retirar los tubos una vez iniciado dicho cambio o cuando comiencen a precipitar. Anotar el tiempo transcurrido hasta que tuvo lugar la reacción positiva.

3.1.3. Prueba de Seliwanoff

El resorcinol condensa con los frufurales derivados de cetosas originando un color rojo intenso. Este fenómeno es desencadenado porque las cetosas se deshidratan a mayor velocidad que las aldosas.

* **Preparación del reactivo de Seliwanoff:** Tomar 0.5 g de resorcinol en 330 ml de HCl concentrado y diluir con agua destilada hasta 1 litro.

- * Tomar 4 tubos de ensayo
- * Incorporar 3 ml del reactivo
- * Depositar 3 gotas, con pipeta Pasteur, de:

- Glucosa 2%
- Sacarosa 2%

- Problema

- * Poner 10 min al baño maría
- * Anotar tiempo en el que tiene lugar la reacción

3.1.4. Test de Bial

Se caracteriza por la presentación, mediante condensación, de un producto de color azulado originado por la reacción del furfural, derivado de la pentosa, en su reacción con HCl y el orcinol. Se trata de una reacción característica tanto de pentosas como de ácidos urónicos.

* **Preparación del reactivo de Bial:** disolver 3 g de orcinol en 1 litro de HCl concentrado y añadir posteriormente FeCl_3 al 1 %.

- * Preparar 6 tubos de ensayo
- * Añadir 1 ml de:

- Glucosa 2%
- Xilosa 2%
- Arabinosa 2%
- Fructosa 2%
- Sacarosa 2%
- Problema

- * Añadir 3 ml del reactivo
- * Calentar en baño maría
- * Observar cambio de color

3.2. Aislamiento y cuantificación del glucógeno hepático

Los hidratos de carbono son almacenados como sustancia de reserva por los seres vivos en forma de polisacáridos; el almidón y la inulina son las formas de almacenamiento en vegetales, mientras que el glucógeno es la reserva glucídica de los animales.

El glucógeno consta de unidades de glucosa unidas por enlace glucosídico $\alpha(1-4)$ formando cadenas; cada 8 ó 10 unidades de glucosa, la cadena presenta ramificaciones que se unen mediante enlace $\alpha(1-6)$. El glucógeno es especialmente abundante en el hígado (entre 3-5 g por 100 g de tejido fresco) y en, en menor medida, el músculo. El ayuno disminuye las reservas de glucógeno fundamentalmente hepático.

El objetivo de la práctica es el aislamiento del glucógeno hepático de ratas alimentadas y de ratas sometidas a 48 horas de ayuno. Su cuantificación (como equivalente de glucosa) se realiza mediante la técnica de la glucosa-oxidasa. Antes de

realizar la determinación de glucosa es necesario hidrolizar el glucógeno de manera enzimática (con α -amilasa) o bien por hidrólisis ácida con ClH (la que se propone en este protocolo).

3.2.1 Aislamiento del glucógeno

El glucógeno puede ser aislado de los tejidos por digestión de éstos con una solución concentrada de KOH (30%), en la cual el glucógeno es estable. Se separa después de proteínas y otros metabolitos solubles por su propiedad de precipitar con alcohol etílico (al 66%, concentrado final).

1. Tomar 0.2 g de hígado de rata en un tubo de vidrio con 2 ml de KOH (30%) caliente. Introducir el tubo en agua hirviendo durante 30-40 min con agitación ocasional, hasta la completa digestión del tejido. Dejar 1 g de hígado para su homogenización y cuantificación de proteínas por la técnica de Biuret.
2. Centrifugar 5 min a 3000 rpm y eliminar el precipitado.
3. El sobrenadante se pasa cuidadosamente a otro tubo de vidrio limpio, al que se añade 0.2 ml de SO_4Na_2 15% y 4 ml de alcohol etílico. Agitar para mezclar bien todos los componentes (no utilizar parafilm). Dejar en hielo 15-20 min para que precipite el glucógeno.
4. Centrifugar 5 min a 3000 rpm. Desechar el sobrenadante. El precipitado de color blanco-marrón es el glucógeno (la purificación completa del glucógeno implica 3-5 precipitaciones alcohólica y una ácida).
5. Disolver el precipitado (en el mismo tubo) con 1 ml de agua (una vez eliminado bien todo el sobrenadante de potasa).

3.2.2. Hidrólisis del glucógeno a glucosa

Se realiza una hidrólisis ácida del glucógeno para romper, al azar, los enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$. Si la hidrólisis no es completa tendrá lugar la formación intermedia de todos los oligosacáridos posibles de glucosa. Si la hidrólisis es total solo se obtendrían restos de glucosa. En las condiciones experimentales se considera total

1. Añadir 1 ml de HCl 5N al tubo que contiene 1 ml de la solución acuosa del glucógeno,. Agitar.
2. Incubar en un baño de agua hirviendo y luego enfriar en hielo
3. Añadir 1 ml de NaOH 5N con el fin de neutralizar la solución.
4. Tomar 1 ml de la solución anterior y añadir 2 ml de un tampón fosfato 100 mM. (esta será la solución A y representa una dilución 1:3 de la inicial)
5. Tomar 1 ml de la solución A y añadir 2 ml del tampón fosfato 100 mM. Esta será la solución B.

3.2.3. Cuantificación

La cuantificación de la glucosa se realiza por la técnica de la glucosa oxidasa tomando 0,1 ml de las soluciones A y B

3.2.4. Cálculo de las concentraciones de glucógeno

Se deberán calcular las concentraciones de glucógeno, expresado en gramos de glucosa por 100 g de tejido.

La comparación del glucógeno hepático entre ratas alimentadas y ayunadas debe resultar sorprendente.

3.3. Caso clínico

Varón de raza blanca de 16 años de edad llegó a la sala de urgencias del hospital en estado estuporoso. Al efectuar el examen físico se observó que presentaba respiración profunda y taquipnea, su aliento tenía olor a frutas y su piel y membranas mucosas estaban secas.

Datos de laboratorio

Sodio 128 mmol/L (138-145 mmol/L)
Calcio 10 mg/dL (8-25 mg/dL)
Potasio 6,1 mmol/L (3,1-5,5 mmol/L)
Fósforo 3,6 mg/dL (3.0 -4.5 mg/dL)
Cloruro 88 mmol/L (95-105 mmol/L)
Bicarbonato 9 mmol/L (21-27 mmol/L)
Urea en sangre 50 mg/dL (8-25 mg/dL)
pH 7,12 (7,35-7,45)
pCO₂ 28 mmHg (35-45 mmHg)
Glucosa sérica 750 mg/dL (70-110 mg/dL)
Acetona sérica 3+ (0)
Hematocrito 53% (42-45%)
Hemoglobina 17,6 g/dL (14-16 g/dL)
Recuento leucocitos 12000/mm³ (4.300-10000 mm³)
Recuento eritrocitos 6 millones /mm³ (4,5-5,2/mm³)

1. Identificar los datos de laboratorio y los signos y síntomas anormales

Respiración profunda y rápida, piel y mucosas secas, olor a fruta en el aliento, madre diabética y hermano, sodio bajo, potasio alto, cloruro bajo, bicarbonato bajo, urea alta, pH bajo, pCO₂ baja, glucosa sérica alta, acetona sérica alta, hematocrito alto, hemoglobina alta, recuento de leucocitos alto y recuento de hematíes alto

2. Con base a los antecedentes clínicos de la paciente, las observaciones clínicas y datos de laboratorio, el tipo de intolerancia a la glucosa se clasificaría como:

Diabetes tipo I

3. ¿Por qué aumentan los cuerpos cetónicos?

Por el incremento de la lipólisis para obtener energía de los lípidos. Este fenómeno induce un incremento en el acetil coenzima A que satura al ciclo de Krebs e induce la unión de unos con otros originando ácido grasos parcialmente catabolizados denominados cuerpos cetónicos.

4. ¿Qué observaciones indican pérdida de agua?

Piel y mucosas secas, aumento de urea, aumento de hematocrito, aumento de hemoglobina, aumento de eritrocitos, aumento de leucocitos, descenso de sodio y descenso de cloro

5. Qué parámetro nos indica un buen control sobre los estados de glucemia en los últimos 120 días.

La hemoglobina glucosilada (HBA_{1c})

4. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Berezov TT, Korovkin BF (1992): Chemistry and metabolism of carbohydrates. En Berezov TT, Korovkin BF (eds): Biochemistry, 1ª Ed. Editorial Mir Publishers Moscow (Moscú, Rusia), pp. 215 – 256.

D'Ocon MC, García MJ, Vicente JC (1998): Estudio general del metabolismo de los hidratos de carbono. En D'Ocon MC, García MJ, Vicente JC (eds): Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico, 1ª Ed. Editorial Paraninfo (Madrid, España), pp. 53 – 72.

Hanson NQ (1995): Carbohidratos. En Anderson SC, Cockayne (eds): Química Clínica, 1ª Ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill (México D.F., México), pp. 141 – 166.

Harris RA (2004): Metabolismo glucídico I: Principales rutas metabólicas y su control. En Devlin TM (eds): Bioquímica, 4ª Ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp. 597 – 664.

Muñoz E (1988): Propiedades químicas de los azúcares. En Lozano JA, Tudela J (eds): Prácticas de bioquímica. Experimentación y Simulación, 1ª Ed. Editorial Síntesis (Madrid, España), pp. 65 – 70.

McKee T, McKee JR (2003): Hidratos de carbono. En McKee T, McKee JR (eds): Bioquímica. La base molecular de la vida, 3ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana (Madrid, España), pp. 200 – 233.

Suárez MD (1998): Alteraciones de la digestión, absorción y metabolismo de los hidratos de carbono. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade M, Sánchez A (eds): Bioquímica Clínica, 1ª Ed. Editorial Alhambra (Madrid, España), pp. 145 – 160.