# DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES POR EL METODO DE LA ANTRONA

## INTRODUCCION

Uno de los métodos más comunmente usados para cuantificar azúcares totales es el de la Antrona (Dimler y col. 1952). Este procedimiento nos permite determinar cuantitativamente hexosas, aldopentosas, acidos urónicos ya sea en forma libre o formando parte de polisacáridos. Para que la medición sea digna de confianza, deben controlarse cuidadosamente las concentraciones de antrona y de ácido en el reactivo así como el tiempo y la temperatura de reacción. Es aconsejable que la muestra se encuentre libre de proteinas ricas en triptofano para evitar interferencias en la reacción colorida.

## OBJETIVO

Pretendemos en este experimento estimar cuantitativamente la presencia de azúcares en diferentes muestras problemas.

## FUNDAMENTO

En presencia del ácido sulfúrico del Reactivo de Antrona, los carbohidratos experimentan deshidratación convirtiéndose en furfural ó hidroximetilfurfural. Estos productos pueden condensarse con aminas aromáticas, fenoles, antrona, etc; produciendo compuestos coloreados. La formación del furfural ó sus derivados acomplejados con estas sustancias puede utilizarse como método cualitativo ó cuantitativo para estimar azúcares, ya que la intensidad de color desarrollado durante la condensación va a estar en función de la concentración de carbohidrato presente en la muestra.

Hemos de mencionar, que los polisacáridos por acción del ácido son primeramente hidrolizados a monosacáridos los cuales se deshidratan formando furfural ó hidroximetilfurfural; éstos ulteriormente se condensan con la antrona generando complejos coloreados.

La cuantificación de azúcares se hace en base al color desarrollado por la muestra, utilizando espectrofotómetros ó fotocolorímetros para determinar la intensidad o la energía de la luz que ha pasado a través de la celda ó tubo de fotocolorímetro conteniendo la solución coloreada. Para esta determinación se debe fijar un valor de longitud de onda que es donde el complejo colorido muestra su máxima absorción, y además disponer de un blanco para calibrar el aparato, esta solución solamente contiene agua destilada y reactivo de antrona sometido al protocolo indicado.

La cantidad de luz que absorbe la muestra se denomona ABSORBANCIA, y la luz que pasó a través de la solución se llama TRANSMITANCIA. Existe una fórmula que nos relaciona a ambas:

$$A = -\log T$$

$$T = \frac{1}{\text{antilog } A}$$

Para cuantificar la cantidad de azúcar presente en una muestra, primeramente se prepara una curva de calibración con los valores de absorbancia mostrados por distintas soluciones de concentracion conocida. Estos valores se ajustan a una recta usando Regresión Lineal, y con la ecuación de la recta se determina la concentración de azúcar según haya sido el valor de absorbancia que mostró.

MATERIAL POR EQUIPO DE CUATRO PERSONAS

Espectrofotómetro ó Fotocolorímetro equipado con filtro rojo
Celdas para espectrofotómetro ó fotocolorímetro
15 tubos de ensaye de 18 x 150
1 mechero, tripie, tela de asbesto
1 vaso de precipitados de 600 ml
1 vaso de precipitados de 1 litro
2 pipetas de 10 ml
2 pipetas de 1 ml
15 canicas
1 gradilla
pinzas para tubo de ensaye
Hielo
Kleenex

REACTIVOS

1.- ANTRONA AL 0.2% EN ACIDO SULFURICO CONCENTRADO: En 50 ml de ácido sulfúrico concentrado y frío disolver poco a poco y con agitación 0.2 gramos de antrona; y luego aforar a 100 ml con el ácido. La solución se debe guardar en un frasco oscuro y bajo refrigeración.

2.- SOLUCION PATRON DE GLUCOSA 100 mg/litro: Disolver 0.100 gramos de glucosa en 50 ml de agua destilada y luego aforar a 1 litro con agua. Guardar en refrigeración.

3.-SOLUCION PROBLEMA:Preparar soluciones apropiadas usando agua destilada como diluyente.

PARTE EXPERIMENTAL

## I.-CURVA DE CALIBRACION

1.-En una gradilla coloque 8 tubos de ensaye de 18 x 150. A los tubos numerados del 1 al 6 adicione los volumenes de glucosa y agua indicados en la tabla siguiente, y mezcle. En los tubos 7 y 8 transfiera su muestra apropiadamente diluida. LLEVE TODOS LOS TUBOS A UN BAÑO DE HIELO DURANTE 10 MINUTOS.

| Tubo No. | Concentración ug/ml | ml de Glucosa 100 mg/ml | ml. de agua destilada |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | - - - | 2.0 |
| 2 | 10 | 0.2 | 1.8 |
| 3 | 20 | 0.4 | 1.6 |
| 4 | 30 | 0.6 | 1.4 |
| 5 | 40 | 0.8 | 1.2 |
| 6 | 50 | 1.0 | 1.0 |
| 7 | - - - | 2 ml de muestra | 0 |
| 8 | - - - | 1 ml de muestra | 1.0 |

2.-Una vez que todos los tubos están bien fríos, adicioneles 4 ml de Antrona a cada uno; para agregarla incline el tubo y por las paredes internas del tubo deje fluir lentamente la antrona de manera que el reactivo se estratifique debiendo aparecer una capa inferior amarilla y una superior blanca lechosa. DESCARTE AQUELLOS TUBOS DONDE NO SE SEPARARON LAS CAPAS O QUE SE HAYAN TORNADO VERDES.

3.-Despues de adicionar la antrona, todos los tubos deberán permanecer en el baño de hielo durante 5 minutos.

4.-Enseguida, agite vigorosamente cada tubo en un vórtex, de manera que se mezclen perfectamente las dos capas y la solución adquiera un color amarillo homogéneo. DESPUES DE AGITAR EL TUBO REGRESELO AL BAÑO DE HIELO. Elimine los tubos que se tornen verdes.

5.-Cuando haya agitado todos los tubos, transfiéralos a un baño de agua que ya se encuentre hirviendo, y déjelos ahí durante 10 minutos. Para evitar la evaporación, tape la boca de los tubos de ensaye con una canica.

6.-Después de ese tiempo, saque los tubos del baño de agua, y llévelos al baño de hielo para que se enfríen rapidamente.

7.- Cuando ya estén fríos los tubos, pase al espectrofotómetro ó fotocolorímetro para leer la absorbancia de cada uno de ellos. Utilice los tubos especiales de lectura que le serán proporcionados, fijando una longitud de onda de 640 nm.

8.- Hay que ajustar primeramente a cero de absorbancia su aparato, para ello emplee el contenido del tubo No. 1 que es su BLANCO.

RESULTADOS

I.-UTILICE LA TABLA SIGUIENTE PARA REGISTRAR LAS LECTURAS DE SUS TUBOS

| Tubo | Concentración ug/ml | ABSORBANCIA | UNIDADES KLETT |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 10 | | |
| 3 | 20 | | |
| 4 | 30 | | |
| 5 | 40 | | |
| 6 | 50 | | |
| 7 | - - | | |
| 8 | - - | | |

II.-Anote los siguientes datos: Dilución de la muestra: _____

Modelo del Aparato: _____

III.-Considerando como X a la concentración de los estándares y Y la absorbancia ó U.K. respectivas, trabaje estadísticamente esos datos como se pide en la tabla siguiente:

| Concentración (ug/ml) X | Absorbancia U.K. (Y) | $X^2$ | XY | $Y^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | | | | |
| 20 | | | | |
| 30 | | | | |
| 40 | | | | |
| 50 | | | | |
| $\Sigma X =$ | $\Sigma Y =$ | $\Sigma X^2 =$ | $\Sigma XY =$ | $\Sigma Y^2 =$ |

N = 6

III.-Con las ecuaciones dadas enseguida, someta sus resultados experimentales a regresión lineal, para obtener la ecuación de la linea recta (Y= mx +b) a la cual se ajustan sus datos. Calcule tambien la correlación existente entre ambas variables.

$$\text{intersecto} = b = \frac{\Sigma X^2 \Sigma Y - \Sigma X \ \Sigma XY}{N\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2} \qquad \text{pendiente} = m = \frac{N \Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y}{N\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$\text{correlacion} = r = \frac{N\Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y}{\sqrt{\left[N\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2\right]\left[N\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2\right]}}$$

ECUACION DE LA RECTA:

$Y = mx + b$

m = pendiente
b = intersecto