

19. Identificación de algunos grupos funcionales orgánicos de interés bioquímico

Conrado Moreno Vivián

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

RESUMEN

Las propiedades bioquímicas y las reacciones características de las diferentes biomoléculas dependen de los distintos grupos funcionales que las constituyen. En esta práctica se explicarán los principales grupos funcionales orgánicos que suelen formar parte de los compuestos biológicos y se realizarán algunas reacciones químicas específicas que permiten la identificación de dichos grupos.

Palabras clave: ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres.

Abreviaturas empleadas: DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La composición química de los seres vivos es muy diferente a la de la materia inanimada, y aunque presenta diferencias muy significativas entre las distintas especies, también muestra muchas semejanzas en todos los organismos. De los 92 elementos químicos naturales, sólo 27 son esenciales para los seres vivos, casi todos ellos de número atómico bajo. Estos elementos químicos presentes en los seres vivos se denominan **bioelementos**, y se suelen clasificar en **macroelementos** (C, H, O y N), cada uno de los cuales aparece en una proporción superior al 5% del peso seco de la materia viva y en total constituyen aproximadamente el 90% de la biomasa; **microelementos** (Ca, P, K, S, Cl, Na y Mg), que varían entre el 0,3 y el 5% del peso seco y suponen casi el 10% de la biomasa; y **oligoelementos** o **trazas** (B, F, Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Mo, I, entre otros), que están presentes en cantidades muy pequeñas. Estos bioelementos suelen formar parte de moléculas, denominadas **biomoléculas**, que pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Entre las inorgánicas están el agua, aniones (cloruros, fosfatos, carbonatos, etc.), cationes (sodio, potasio, calcio, amonio, etc.) y algunos gases como el O₂ y el CO₂. Entre las biomoléculas orgánicas destacan los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, y sus correspondientes constituyentes básicos, y metabolitos como el piruvato, el 2-oxoglutarato, el malato, etc.

La química de los seres vivos se organiza en torno al carbono, que al igual que el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, puede formar enlaces covalentes por compartición de electrones. Para completar sus respectivos niveles electrónicos externos, el H necesita un electrón, el O dos, el N tres y el C cuatro, por lo que estos elementos pueden formar, respectivamente, uno, dos, tres o cuatro enlaces covalentes, entre sí o con otros elementos. Además, el C

puede formar enlaces simples (C-C), dobles (C=C) o triples (C≡C), según compartan entre sí 1, 2 ó 3 pares de electrones. Un átomo de C puede ser primario, secundario, terciario o cuaternario según se enlace con 1, 2, 3 ó 4 átomos de C distintos, independientemente del número de valencias (enlaces simples o dobles) usadas en cada enlace. Estos átomos de C unidos covalentemente entre sí pueden formar cadenas lineales, ramificadas o cíclicas que dan lugar a una enorme diversidad de compuestos orgánicos. Por lo tanto, la mayoría de las biomoléculas son un “esqueleto carbonado” al que se unen distintos conjuntos de átomos formando los denominados **grupos funcionales** orgánicos, de los que dependen las características, propiedades y reacciones químicas propias y específicas de cada biomolécula. Además, las biomoléculas suelen ser polifuncionales ya que poseen diferentes tipos de grupos funcionales, cada uno con propiedades y reactividad propia. Así, un aminoácido se comporta como un ácido carboxílico ya que posee un grupo carboxilo (–COOH) y como una amina porque también posee un grupo amino (–NH₂). A partir de los grupos funcionales presentes en una biomolécula, se puede predecir su comportamiento químico y sus posibles reacciones. Las enzimas reconocen la presencia y la disposición específica de estos grupos funcionales en las moléculas y catalizan las transformaciones químicas características de estos grupos.

Los principales grupos funcionales orgánicos de interés bioquímico son los siguientes:

Hidroxilo (alcoholes): –OH

Carbonilo (aldehídos y cetonas): –COH (aldehído) y –CO– (cetona)

Carboxilo (ácidos carboxílicos): –COOH

Metilo: –CH₃

Éster: –CO–O–

Éter: –O–

Amino (aminas): –NH₂

Amido (amidas): –CO–NH₂

Sulfhidrilo (tioles): –SH

Disulfuro: –S–S–

Fosforilo: –PO₃H₂

Nitrilo (cianhidrinas): –C≡N

Nitro (nitroderivados): –NO₂

El objetivo de la práctica es familiarizar al alumno con los grupos funcionales de interés bioquímico y con el reconocimiento y la identificación de dichos grupos en compuestos orgánicos importantes. En concreto, se realizará la identificación de alcoholes, aldehídos y cetonas, ácidos orgánicos y ésteres mediante las reacciones específicas de estos grupos que se indican a continuación. Para el estudio de las propiedades y características de los principales grupos funcionales orgánicos se recomienda consultar la bibliografía básica que aparece al final de este capítulo.

1.1. Identificación de alcoholes

Se realizará la identificación de alcoholes mediante la reacción con el cloruro de acetilo, en la que se forma un éster y se libera HCl, lo que produce el

calentamiento de la muestra y una acidificación que puede detectarse mediante un papel indicador de pH.



Además, es posible realizar la diferenciación entre alcoholes primarios (RCH_2OH), secundarios ($\text{R,R}'\text{CHOH}$) y terciarios ($\text{R,R}',\text{R}''\text{COH}$) mediante el reactivo de Lucas (cloruro de Zn en HCl), que en el caso de alcoholes terciarios produce rápidamente un cloruro apolar insoluble, lo que se manifiesta por un aumento de la turbidez y la separación de una fase polar y otra apolar. Los alcoholes secundarios reaccionan mucho más lentamente y los alcoholes primarios no reaccionan.

1.2. Identificación de los grupos carbonílicos de aldehídos y cetonas

Estos compuestos se identificarán mediante el denominado test de Brady, basado en la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas tras la reacción de los compuestos carbonílicos con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Los compuestos carbonílicos saturados producen un color amarillo, los insaturados dan color naranja y los aldehídos o cetonas aromáticos forman un color rojo. La diferenciación entre aldehído y cetona se puede realizar mediante el test de Tollens, que en presencia de un aldehído produce un precipitado oscuro de plata mientras que las cetonas no reaccionan.

1.3. Identificación de ácidos carboxílicos

Se realizará por el método del yodato-yoduro y una solución de almidón, un ensayo que produce un color azul en presencia de ácidos orgánicos débiles.

1.4. Identificación de ésteres

La determinación de ésteres se realizará mediante la reacción con hidroxilamina para formar ácidos hidroxámicos que producen una coloración rojiza en presencia de iones férricos. Los ácidos carboxílicos y los fenoles también reaccionan, por lo que la presencia de estos compuestos interfiere en la determinación.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

Para la realización de esta práctica son necesarios los siguientes materiales y productos:

2.1. Material

- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Pipetas automáticas o pipetas de diferentes volúmenes con propipetas.
- Pinzas.
- Papel indicador de pH.
- Vasos de precipitado de 100 ml.
- Baños de agua termostatizados.

Viales eppendorf.
Bloque térmico.
Guantes.
Agitador Vortex.
Agitador magnético/calentador.
Campana de extracción de gases.

2.1. Reactivos y productos

Agua destilada.
Cloruro de acetilo.
Reactivo de Lucas (cloruro de Zn en HCl).
Reactivo de Brady (DNPH en ácido sulfúrico, agua y etanol).
Hidróxido sódico (NaOH) al 10%.
Nitrato de plata (AgNO_3) al 5%.
Hidróxido amónico (NH_4OH) 2 M.
Yoduro potásico (KI) al 2%.
Yodato potásico (KIO_3) al 4%.
Hidrocloruro de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 1N.
Disolución de hidróxido potásico (KOH) 2N en metanol.
Ácido clorhídrico (HCl) 2N.
Cloruro férrico (FeCl_3) al 10%.
Disolución de almidón al 0,1%.
Muestras problema con los compuestos orgánicos que hay que identificar (por ejemplo, glucosa, fructosa, etanol, acetaldehído, acetona, acetato, piruvato, alanina, acetato de metilo, u otros compuestos elegidos por el profesor).
Metanol.
Etanol.
Isopropanol.
Alcohol terbutílico.
Acetaldehído.
Acetona.
Ácido acético.
Acetato de metilo.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

Cada grupo posee una serie de tubos con las 6 muestras problema que contienen diferentes compuestos orgánicos. Se trata de identificar el grupo funcional presente en cada una de ellas. Además, en cada una de las determinaciones se realizarán controles con compuestos orgánicos conocidos. Como norma general, no se debe emplear la misma pipeta o la misma punta de pipeta automática para tomar reactivos o muestras diferentes. Además, es obligatorio el uso de bata de laboratorio y se recomienda la utilización de guantes durante la realización de la práctica. La utilización de algunos reactivos se realizará en la campana de extracción.

3.1. Identificación de alcoholes

Se procederá a la realización del ensayo con cloruro de acetilo en las muestras problema para determinar cuales de ellas poseen grupos hidroxilos, y en los que se obtenga un resultado positivo, se realizará el test de Lucas para comprobar si el alcohol es primario, secundario o terciario. Estos ensayos también se realizarán en controles con etanol (alcohol primario), isopropanol (alcohol secundario) y alcohol terbutílico (alcohol terciario).

3.1.1. Ensayo con cloruro de acetilo para la detección de alcoholes

En 6 tubos de ensayo (numerados del 1 al 6) se colocan 0,5 ml de cada una de las 6 muestras problema. En otros 3 tubos control (marcados con las letras Et, Ip y Tb) se añaden 0,5 ml de etanol, isopropanol y alcohol terbutílico, respectivamente. A todos los tubos se les añaden 0,3 ml de cloruro de acetilo, gota a gota con una pipeta automática, empleando guantes y en una campana de extracción.

La reacción positiva de los alcoholes se manifiesta por un ligero calentamiento de la mezcla de reacción y sobre todo por la acidificación debida a la producción de HCl en la reacción, lo que se puede apreciar al aplicar una gota de la mezcla sobre el papel indicador de pH. Esta reacción debe ocurrir en los 3 tubos control (Et, Ip y Tb) y en las muestras problema que contengan compuestos orgánicos con grupos alcohólicos.

3.1.2. Test de Lucas para la distinción de alcoholes primarios, secundarios y terciarios

Preparación del reactivo de Lucas (para la práctica, se suministra ya preparado por el profesor): Se añaden 68 g de $ZnCl_2$ a 45 ml de HCl concentrado, manteniendo fría la disolución.

En tubos de ensayo marcados con los números en los que se observó reacción positiva en la determinación anterior se añaden 0,5 ml de las correspondientes muestras problema y en 3 tubos control marcados con Et, Ip, y Tb se añaden 0,5 ml de etanol, isopropanol y alcohol terbutílico, respectivamente. A todos los tubos se les adicionan 3 ml del reactivo de Lucas y se agitan durante 15 segundos. Si la solución se enturbia rápidamente por la formación de un cloruro apolar insoluble en la reacción, se trata de un alcohol terciario (alcohol terbutílico); si se enturbia muy lentamente, el compuesto es un alcohol secundario (isopropanol); y si no hay reacción y la mezcla permanece clara, el alcohol es de tipo primario (etanol).

3.2. Identificación de aldehídos y cetonas

Se realizará el test de Brady (reacción con DNPH) en las muestras problema para identificar cuales de ellas poseen grupos carbonilos. A las muestras que den reacción positiva se les realizará el test de Tollens con un reactivo de plata para la distinción entre aldehído y cetona. Estos ensayos también se realizarán en controles con acetaldehído y acetona.

3.2.1. Test de Brady (formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas)

Preparación del reactivo de Brady (para la práctica se suministra ya preparado por el profesor): Se disuelve 1 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)

en 5 ml de H_2SO_4 concentrado y se añaden lentamente a una mezcla de 7 ml de agua y 25 ml de etanol. Se filtra la mezcla para eliminar las partículas en suspensión.

En 6 tubos de ensayo (numerados del 1 al 6) se colocan 0,5 ml de metanol y en cada uno se añaden 50 μl de las correspondientes muestras problema. En otros 2 tubos control (marcados con las letras Al y Ce) se añaden 0,5 ml de metanol y 50 μl de un aldehído (acetaldehído) o una cetona (acetona), respectivamente (utilizar la campana de extracción). Se añade 1 ml del reactivo de Brady a todos los tubos y se agita vigorosamente. La reacción positiva de los compuestos con grupos carbonilos da lugar a una coloración amarilla, naranja o roja, y debe ocurrir en los 2 tubos control (Al y Ce) y en las muestras problema que contengan compuestos carbonílicos.

3.2.2. Test de Tollens para la distinción de aldehídos y cetonas

Preparación del reactivo de Tollens (para la práctica, se suministra ya preparado por el profesor, pero debe utilizarse recién preparado): Se añaden 150 μl de NaOH al 10% a 10 ml de una disolución acuosa de AgNO_3 al 5%. Tras agitar, se añade gota a gota y con agitación, NH_4OH 2 N hasta que se disuelve el precipitado de AgOH formado previamente. Es conveniente tirar los restos sobrantes de la disolución y lavar bien los tubos utilizados, a ser posible con ácido nítrico diluido.

En tubos de ensayo limpios, en los que previamente se ha hervido NaOH al 10% (ya se suministran limpios y tratados con NaOH) y marcados con los números de las muestras que dieron reacción positiva en la determinación anterior, se añaden 0,5 ml de las correspondientes muestras problema. En otros 2 tubos limpios, que se utilizarán como controles y se marcarán con las letras Al y Ce, se añaden 0,5 ml de acetaldehído o de acetona, respectivamente, en lugar de las muestras problema. A todos los tubos se les adicionan 2,5 ml del reactivo de Tollens recién preparado y tras agitar se espera 10 minutos. Si no se observa reacción, se calientan los tubos en un baño de agua a 60 $^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Si se forma un precipitado oscuro o un tono de plata en las paredes del tubo, el compuesto presente es un aldehído.

3.3. Identificación de ácidos carboxílicos

Se empleará el método del yodato-yoduro para la detección de ácidos orgánicos. En viales eppendorf marcados del 1 al 6 se añaden 25 μl de las muestras, 25 μl de una solución acuosa de KI al 2% y otros 25 μl de una solución de KIO_3 al 4% en agua. Como control, en otro vial marcado con Ac se añaden 25 μl de ácido acético (u otro ácido orgánico) e idénticas cantidades de las soluciones de yoduro y de yodato. Se tapan todos los viales y se introducen en un bloque térmico a 100 $^\circ\text{C}$ durante 1 minuto. Se enfrían los viales y se añaden otros 25 μl de una solución reciente de almidón al 0,1%. En el vial control y en las muestras que sean ácidos orgánicos la reacción producirá un color azul.

3.4. Identificación de ésteres

Se realizará una determinación con hidroxilamina que produce un complejo de color púrpura o rojo en presencia de Fe(III). En tubos de ensayo limpios numerados del 1 al 6 se añaden 0,5 ml de una solución de clorhidrato de hidroxilamina 1 N en etanol y 50 µl de las correspondientes muestras a valorar. En un tubo control marcado con Am se colocan los 0,5 ml de la solución de hidroxilamina y 50 µl de acetato de metilo. A cada tubo se le añade, gota a gota, una solución de KOH 2 N en metanol hasta que la mezcla tenga un pH de 9-10 (utilizar el papel indicador de pH) y se completan con otras 4 gotas adicionales de la misma solución de KOH 2 N. Se calientan los tubos hasta iniciar la ebullición colocándolos en un vaso de precipitado con agua en un agitador/calentador. Se enfrían y se añade gota a gota HCl 2 N hasta un pH aproximado de 3 (usar papel indicador de pH). Finalmente, se añade una gota (unos 15 µl) de una solución de FeCl₃ al 10%. En el control y en las muestras con ésteres se produce una coloración roja. Hay que tener en cuenta que los ácidos orgánicos detectados en la determinación anterior (apartado 3.3) también producirán reacción en este ensayo, por lo que para concluir que la muestra a valorar es un éster debe dar positivo sólo en este ensayo y no en el anterior.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones son sólo cualitativos (reacción positiva o negativa) ya que se trata de identificar la sustancia en cuestión y no se pretende cuantificar la concentración a la que se encuentra en la muestra. Se debe completar la Tabla 1 (con signos +/-) para las 6 muestras desconocidas y los respectivos controles en cada una de las determinaciones realizadas y concluir qué grupo funcional está presente en las sustancias de dichas muestras.

Tabla 1. Resultado de la identificación de grupos funcionales en las diferentes muestras.

Muestra o control	Alcoholes		Grupos carbonilos (aldehído/cetona)		Ácidos	Ésteres	Grupo funcional presente
	Cloruro de acetilo	Test de Lucas	Test de Brady	Test de Tollens			
1							
2							
3							
4							
5							
6							
Et							
Ip							
Tb							
Al							
Ce							
Ac							
Am							

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

El alumno debe realizar una memoria de prácticas personal en la que se presenten los resultados obtenidos y se discutan y comenten los mismos con la ayuda de la información contenida en este protocolo experimental, la bibliografía básica recomendada y las explicaciones impartidas durante la práctica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Brewster RQ, Van der Werf CA, McEwen WE (1978): Curso de Química Orgánica Experimental. Editorial Alambra.
- Carey FA (1999): Química Orgánica, 3ª ed. Editorial McGraw-Hill.
- Durst HD, Gokel GW (1985) Química Orgánica Experimental. Editorial Reverté.
- Ege S (1997): Química Orgánica: Estructura y Reactividad. Editorial Reverté.
- Fox MA, Whitesell JK (2000): Química Orgánica. Editorial Pearson Education.
- Garrido Pertierra A (1991): Fundamentos de Química Biológica. Editorial Interamericana.
- Gillespie RJ, Humhreys DA, Baird NC, Robinson EA (1990): Química. Editorial Reverté.
- Lehman J (1999): Operacional Organic Chemistry: A Problem Approach to the Laboratory Course, 3ª ed. Editorial Prentice-Hall.
- McMurry J (2000): Química Orgánica, 5ª ed. Editorial Thomson Paraninfo.
- Morrison RT, Boyd RN (1995): Química Orgánica. Editorial Addison Wesley.
- Schmid GH (1986): Química Biológica: Las Bases Químicas de la Vida. Editorial Interamericana.
- Shriner RJ, Fuson RC, Curtin DY, Morrill TC (1980): The Systematic Identification of Organic Compounds, 6ª ed. Editorial John Wiley and Sons.
- Wade LG (2004): Química Orgánica, 5ª ed. Editorial Pearson Education.