22.114
NSTITUTO DE QUÍMICA
NIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

DETERMINAÇÃO A BAIXO CUSTO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS EM CALDO-DE-CANA, EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO, COM O USO DE DNS

Osmar Soares Barros

Dissertação de Mestrado

Prof. Dr. Jaim Lichtig

Orientador

São Paulo

2005

Osmar Soares Barros

DETERMINAÇÃO A BAIXO CUSTO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS EM CALDO-DE-CANA, EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO, COM O USO DE DNS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de mestre em Química Analítica

Área de concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Jaim Lichtig

São Paulo

2005

T0
543.08
B277d

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012423

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Barros, Osmar Soares
B277d Determinação a baixo custo de açúcares redutores totais em caldo-de-cana, empregando sistemas de análise por injeção em fluxo, com o uso de DNS / Osmar Soares Barros. -- São Paulo, 2005.
62p .

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Lichtig, Jaim

1. Análise por injeção em fluxo : Química 2. Açúcar : Análise : Tecnologia de alimentos 3. Espectrofotometria I. T. II. Lichtig, Jaim, orientador.

543.08 CDD

"Determinação a baixo custo de açúcares redutores totais em caldo-de-cana, empregando sistema de análise por injeção em fluxo com o uso de DNS"

OSMAR SOARES BARROS

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Analítica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. JAIM LICHTIG
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. FABIO RODRIGO PIOVEZANI ROCHA
IQ - USP

Profa. Dra. ADRIANA VITORINO ROSSI
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
28 DE ABRIL DE 2005.

Dedico às Teresas,

Igor, Fabiana e Simone

“ Concedei-nos Senhor,
a serenidade necessária para aceitar
as coisas que não podemos modificar,
coragem para modificar aquelas que podemos e
sabedoria para distinguir umas das outras”

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jaim Lichtig, pelo apoio cientifico, amizade e fraternidade durante todo o tempo;

Ao Prof. Dr. Jorge César Masini, pela colaboração nas horas de incerteza e pela amizade na hora do convívio;

Ao amigo irmão John Keneddy pela amizade e carinho;

A EMESCAM pelo apoio ao conceder uma bolsa de estudos;

Aos amigos Gilberto Abate e Carlos Infante pelas orientações precisas e sinceras;

Aos demais colegas que participam a cada hora do nosso crescimento.

SUMÁRIO

Listas de Figuras i
Listas de Tabelas iii
Resumo v
Abstract vi

I. INTRODUÇÃO 01
I.1. Considerações gerais 01
I.2. Determinação quantitativa de açúcares 05
I.2.1. Métodos que se baseiam na oxidação de açúcares por reagentes químicos 05
I.2.1.1. Oxidação por Cu^{2+} 05
I.2.1.2. Oxidação por halogênios 07
I.2.1.3. Oxidação por hexacianoferrato(III) 07
I.2.1.4. Oxidação por cério(IV) 08
I.2.1.5. Oxidação por metaperiodato 08
I.2.2. Métodos que se baseiam nas reações coloridas de furfural e seus derivados 09
I.2.3. Métodos baseados em reações diversas 09
I.2.4. O reagente ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) 10
I.2.5. Métodos diversos 11
I.3. Sistemas FIA 12
I.3.1. Introdução 12
I.3.2. Sistemas FIA para determinação de glicose, frutose e glicerol 13
I.3.3. Métodos enzimáticos 14
I.3.4. Métodos Diversos 17
II. OBJETIVOS 18
III. MATERIAIS E MÉTODOS 19
III.1. MATERIAIS 19
A. Equipamentos e acessórios 19
B. Reagentes 19
C. Soluções 19
D. Amostras 21

III.2. MÉTODOS 21
III.2.1.Sistema em Batelada 21
a) Espectro de absorção molecular 21
b) Ensaio com DNS 22
c) Estudo do tempo de aquecimento 22
d) Ensaio com bissulfito, fenol e sal de Rochelle 23
III.2.2. Sistema FIA 24
III.2.2.1. Glicose 26
a) Vazão do líquido transportador e concentração do reagente DNS 26
b) comprimento do reator 27
c) Volume injetado da amostra 27
d) Estudo da repetitividade 27
e) Curva analítica para glicose 28
f) Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação 28
III.2.2.2.Sacarose 28
a) Volume injetado da amostra 29
b) Estudo da repetitividade 30
c) Freqüência de amostragem 30
d) Curva de calibração para sacarose 30
e) Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação 30
f) Estudo da exatidão das amostra de sacarose hidrolisadas 31
III.2.2.3. Análise de caldo de cana-de-açúcar 31
III.2.3. Método de Lane-Eynon 31
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES 33
IV.1. Sistema em batelada 33
a) Espectro de absorção molecular 33
b) Ensaio com DNS 34
c) Estudo do tempo de aquecimento 34
b) Ensaio com bissulfito, fenol e sal de Rochelle 35

IV.2. FIA 35
IV.2.1. Glicose 35
a) Vazão do líquido transportador e concentração do reagente DNS 36
b) Comprimento do reator 36
c) Volume injetado da amostra 38
d) Estudo da repetitividade 40
e) Curva analítica para glicose 41
f) Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação 42
IV.2.2. Sacarose 45
a) Volume injetado da amostra 45
b) Estudo da repetitividade 46
c) Freqüência de amostragem 48
d) Curva de calibração para sacarose 49
e) Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação 51
f) Estudo da exatidão das amostra de sacarose hidrolisadas 52
IV.2.3. Caldo de cana-de-açúcar 55
IV.3. Comparação entre Método de Lane-Eynon e Método DNS associado à FIA 57
V. CONCLUSÕES 58
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59
VII. CURRÍCULUM VITAE 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de Fischer, Tollens e Haworth para glicose com destaque para hidroxila anomérica no C1[6]. 2

Figura 2. Estruturas de Fischer, Tollens e Haworth para frutose com destaque para hidroxila anomérica no C2[6]. 3

Figura 3. Estrutura de Haworth para sacarose (glicose + frutose) com destaque para ausência de hidroxila anomérica nos C1 e C2 da glicose e frutose, respectivamente[6]. 3

Figura 4. Estrutura de Haworth para lactose (galactose + glicose) com destaque para hidroxila anomérica no C1 da β-D-Glicopiranose[6]. 4

Figura 5. Estrutura de Haworth para maltose (glicose + glicose) com destaque para hidroxila anomérica no C1 da α-D-Glicopiranose[6]. 4

Figura 6. Reação de oxidação de açúcares redutores com ácido 3-5 dinitrosalicílico em meio alcalino. 10

Figura 7. Representação esquemática do sistema de análise em fluxo utilizando bomba de aquário para a propulsão de líquidos. 24

Figura 8. Representação esquemática da cela de fluxo utilizada. 25

Figura 9. Diagrama de fluxos do sistema FIA utilizado para avaliação das condições de reação. 25

Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema FIA utilizado para avaliação das condições de reação. 29

Figura 11. Espectro de absorção molecular de solução de DNS 1% m/v em reação com glicose 1,8 g L-1. 33

Figura 12. Estudo do tempo de reação no banho-maria entre 1; 1,5; 2; 3 e 5minutos. 34

Figura 13. Estudo do comprimento do reator (20 a 200 cm). 36

Figura 14. Registros de sinais transientes para avaliação do comprimento ideal do reator (a) 20; (b) 50; (c) 100; (d) (150) e (e) 200 cm. 37

Figura 15.	Registros de sinais transientes para avaliação do efeito do volume de amostra injetada: (a) 50, (b) 100, (c) 150, (d) 200 e (e) 250 mL.	38
Figura 16.	Estudo do volume injetado de amostra (50 a 250mL).	39
Figura 17.	Registros de sinais transientes para obtenção da repetitividade.	40
Figura 18.	Registros de sinais transientes para obtenção da curva analítica para glicose.	41
Figura 19.	Curva analítica para glicose com a equação linear e coeficientes linear e angular, assim como o coeficiente de correlação.	42
Figura 20	Registros de sinais transientes de 10 leituras para o branco.	43
Figura 21	Estudo do volume injetado de amostra (50, 100, 150, 200 e 250 mL).	45
Figura 22	Sinais transientes para o estudo do volume injetado de amostra (50, 100, 150, 200 e 250 mL).	46
Figura 23	Registros de sinais transientes para a obtenção da repetitividade do método em estudo.	47
Figura 24	Sinal transiente mostrando a que momento é injetado uma amostra.	48
Figura 25	Registros de sinais transientes para obtenção da curva analítica para sacarose.	49
Figura 26	Curva analítica para sacarose construída segundo as condições citadas na figura 25.	50
Figura 27	Registros de sinais transientes de 10 leituras para o branco.	51
Figura 28	Registros de sinais transientes de três amostras de solução de sacarose previamente hidrolisada (a) branco, (b) 20; (c) 100 e (d) 180 $g.L^{-1}$.	53
Figura 29	Registros de sinais transientes de três amostras de caldo de cana-de-açúcar previamente clarificado.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaios para determinar a melhor concentração de DNS para reagir com glicose 22

Tabela 2. Valores em absorbância para glicose usando DNS e testando três ensaios: a) glicose pura; b) glicose + bissulfito + fenol e c) glicose + sal de Rochelle, leitura a 510 nm, média de três repetições. 35

Tabela 3. Estudo da repetitividade de 10 amostras de glicose, condições como na figura 16. 40

Tabela 4. Curva de calibração para glicose, cinco repetições, condições como na figura 17. 42

Tabela 5. Estudo do limite de detecção e limite de quantificação. Dez leituras para o branco serão realizadas nas mesmas condições da figura 19, valores em absorbância. 43

Tabela 6 Estudo da repetitividade de 10 amostras de sacarose, usando as mesmas condições da figura 21, valores em absorbância. 47

Tabela 7 Estimativa do limite de detecção e limite de quantificação. Dez leituras para o branco foram realizadas nas mesmas condições da figura 26, valores em absorbância. 51

Tabela 8. Determinação da concentração de sacarose, previamente hidrolisada, em 3 amostras de concentração conhecida: 20, 100 e 180 g/L, com 5 repetições, usando FIA da Figura 10. 54

Tabela 9. Determinação da concentração de sacarose em 3 amostras de concentração conhecida: 20, 100 e 180 g/L com 5 repetições, usando FIA da Figura 28. 54

Tabela 10 Comparação de métodos para 3 amostras de concentração conhecida: 20, 100 e 180 g/L com 5 repetições. 54

Tabela 11 Valores em absorbância na determinação de açúcares redutores totais em caldo-de-cana, previamente clarificado, usando sistema FIA da Figura 10, com 5 repetições. 56

Tabela 12 Cálculo dos valores de açúcares redutores totais, em g/L, em caldo de cana previamente clarificado, usando sistema FIA da Figura 10, e a equação de regressão da sacarose e fator de diluíção igual 2, com 5 repetições. 56

Tabela 13 Cálculo dos valores de açúcares redutores totais, em g/L, em três amostras de caldo-de-cana usando metodologia proposta pelo MAPA. 57

RESUMO

Determinação a baixo custo de açúcares redutores totais em caldo-de-cana, empregando sistema de análise por injeção em fluxo com o uso de DNS

Um sistema de análise por injeção em fluxo foi utilizado para a determinação de açúcares redutores totais em caldo-de-cana. O método é baseado na hidrólise da sacarose, seguido da oxidação dos açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em meio alcalino, e determinação espectrofotométrica em 510 nm.

Visando obter melhor sensibilidade e seletividade, os parâmetros volume de amostra e comprimento dos reatores foram estudados para avaliar o comportamento das curvas analíticas.

Foram utilizados mini-compressores de aquários no lugar de bomba peristálticas e cela espectrofotométrica em acrílico no lugar de cela de vidro importada, a fim de minimizar o consumo de reagentes e o custo do sistema FIA.

O presente sistema foi comparado ao método Lane-Eynon recomendado pelo Ministério da Agricultura. Usando o teste-t, não foram constatadas diferenças significativas entre os resultados dos dois métodos, sendo que os desvios relativos foram ao redor de 1%. O método permite analisar cerca de 14 amostras h^{-1}, com desvio padrão relativo inferior a 1,35%.

ABSTRACT

Low cost determination of total reducing sugars in sugar cane broth using a flow injection analysis system with DNS

A flow injection analysis system was employed for determination of total reducing sugars in sugar cane broth. The method is based on hydrolysis of sucrose followed by oxidation of reducing sugars by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) in alkaline solution and spectrophotometric determination at 510 nm.

In order to obtain better sensitivity and selectivity, the parameters sample volume and reactor length were studied to evaluate the behavior of the analytical curves.

Aiming the use of low reagents amount and a low cost in FIA system, fish aquarium mini-compressors were used instead of peristaltic pumps and acrylic spectrophotometric cell instead of imported glass cell.

The present system was compared to Lane-Eynon method recommended by the Brazilian Ministry of Agriculture. Using the t-test no significant differences were observed between both methods, with relative deviations around of 1%. The method allows analyses of ca. 14 samples h^{-1} with relative standard deviation lower than 1.35%.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais

Os carboidratos ou hidratos de carbono, principais substâncias produzidas durante o processo de fotossíntese, são os primeiros compostos formados na incorporação de carbono inorgânico, hidrogênio e energia luminosa nos seres vivos [1]. Constituem os compostos orgânicos mais conhecidos pelo homem, sendo biologicamente os mais importantes no metabolismo vegetal e animal. Apresentam-se como compostos carbonílicos polihidroxilados e são classificados segundo o número de átomos de carbono por molécula. Assim, citam-se os monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos [2].

Os monossacarídeos são os açucares mais simples e geralmente são apresentados com fórmula $C_nH_{2n}O_n$ onde *n* varia de 3 até 8 na maioria dos casos. São classificados de acordo com o número de átomos de carbono na cadeia e segundo a função carbonílica. Prefixos tri-tetra-, etc., designam o número de carbonos por molécula e o sufixo –ose é designação geral do carboidrato. Desta forma, são citadas as trioses, tetroses, pentoses, hexoses, etc. As pentoses, ou açúcares de cinco carbonos, são amplamente distribuídas em todos os organismos e estão presentes como intermediários nas vias metabólicas e, ainda, como parte de moléculas mais complexas, tais como ácidos nucléicos e coenzimas[2]. As hexoses, com seis átomos de carbono são muito comuns nos organismos, desempenhando papéis fisiológicos de importância fundamental. A (+) glicose, de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, é o monossacarídeo mais representativo.

Os oligossacarídeos são compostos por sub-unidades de monossacarídeos, contendo de dois a dez resíduos de monossacarídeos, ligados uns aos outros por um átomo de oxigênio que faz parte da ligação glicosídica (hidroxila de um açúcar e o carbono 1). Dependendo da configuração do carbono 1, a ligação glicosídica é chamada alfa ou beta. Sacarose e lactose são os oligossacarídeos mais comuns. A primeira, principalmente constituída de glicose e frutose, ocorre nas plantas produto da

fotossíntese e é obtida comercialmente a partir da cana-de-açúcar ou da beterraba[3].

Todos os monossacarídeos e a maioria dos dissacarídeos são oxidáveis pelos reagentes de Tollens, Benedict e Fehling, sendo denominados "açúcares redutores"[4,5]. Para ser analisada como tal, a sacarose necessita de hidrólise prévia, que resulta em quantidades equimolares de D(+)glicose (dextrose) e D(-)frutose (levulose). Como esta hidrólise resulta em mudança no sinal de rotação ótica para valor negativo, a reação é denominada inversão da sacarose e à mistura resultante dá-se o nome de "açúcar invertido"[3].

Observa-se nas figuras 1 e 2 as estruturas de Fischer, Tollens e Haworth para glicose e frutose, respectivamente. Nas estruturas nota-se o surgimento de um novo carbono assimétrico (C1 na glicose e C2 na frutose), chamado carbono anomérico, e uma hidroxila em substituição a carbonila (C=O), chamada hidroxila anomérica. A hidroxila anomérica por ser altamente instável cede o H^+ junto com seu elétron provocando redução em certos reagentes (poder redutor)[6].

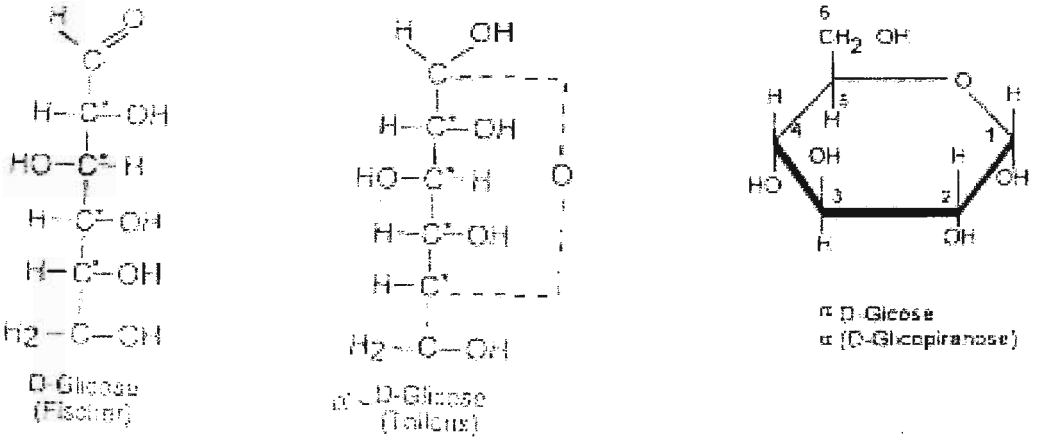

Figura 1. Estruturas de Fischer, Tollens e Haworth para glicose com destaque para hidroxila anomérica no C1[6].

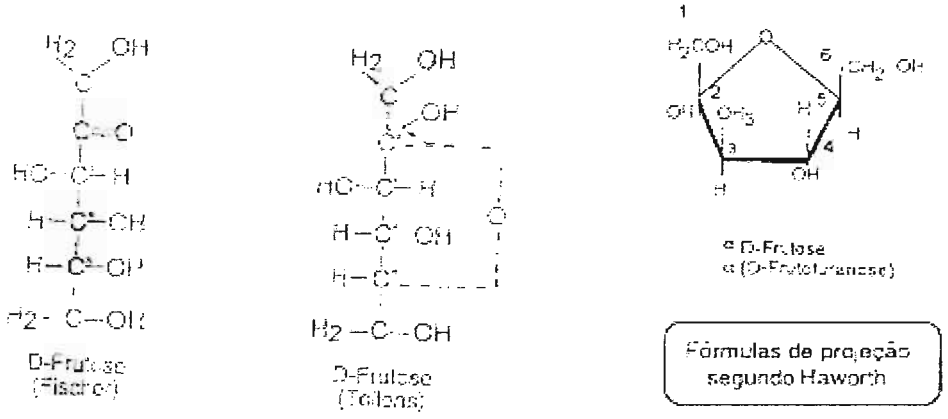

Figura 2. Estruturas de Fischer, Tollens e Haworth para frutose com destaque para hidroxila anomérica no C2[6].

Na formação de uma ligação glicosídica, há sempre o comprometimento de uma hidroxila anomérica, lactose (figura 4) e maltose (figura 5). Na sacarose as duas hidroxilas anoméricas estão comprometidas na ligação glicosídica, figura 3.

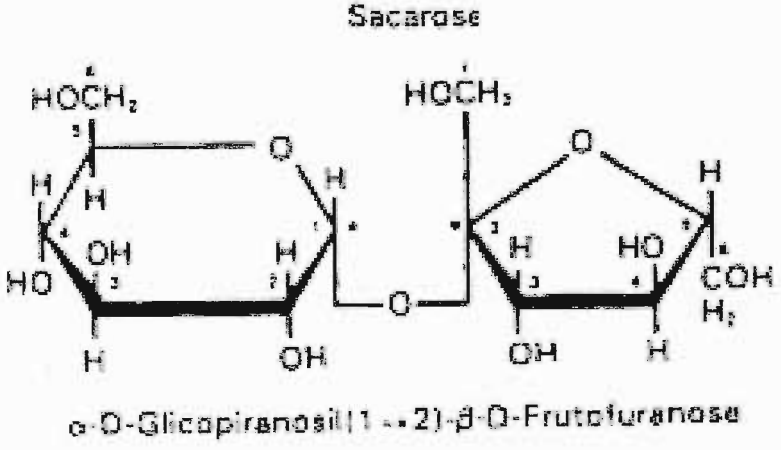

Figura 3. Estrutura de Haworth para sacarose (glicose + frutose) com destaque para ausência de hidroxila anomérica nos C1 e C2 da glicose e frutose, respectivamente[6].

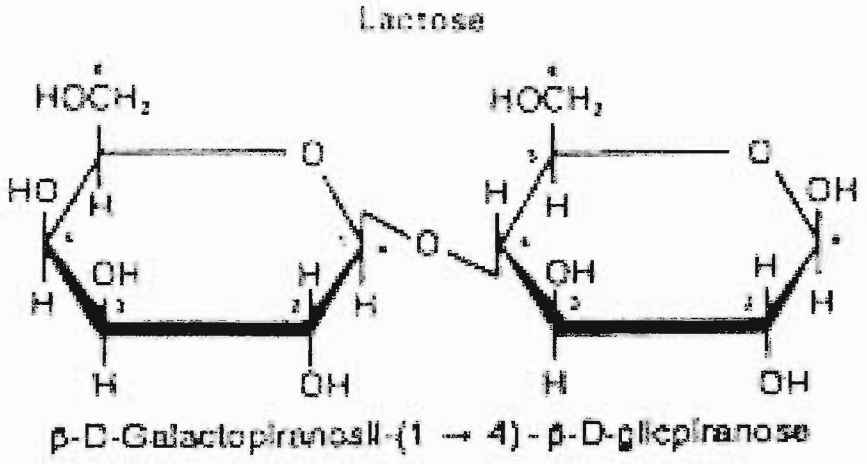

Figura 4. Estrutura de Haworth para lactose (galactose + glicose) com destaque para hidroxila anomérica no C1 da β-D-Glicopiranose[6].

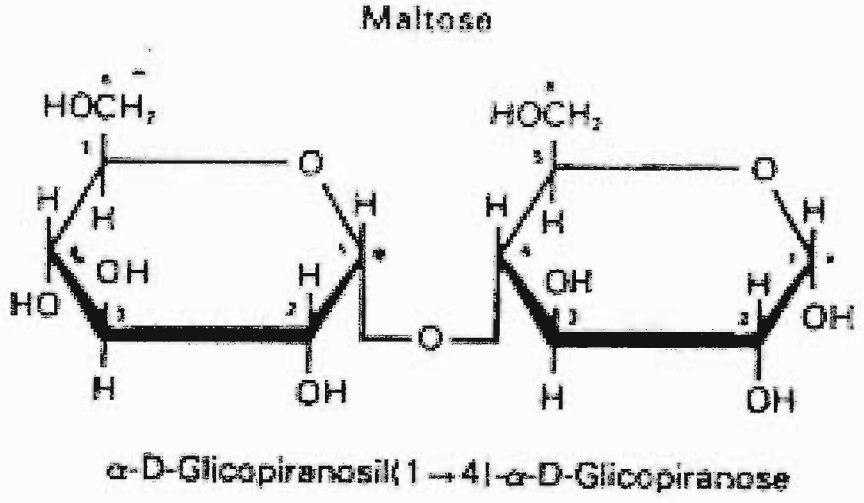

Figura 5. Estrutura de Haworth para maltose (glicose + glicose) com destaque para hidroxila anomérica no C1 da α-D-Glicopiranose[6].

Os polissacarídeos são carboidratos que, após hidrólise, fornecem um grande número de unidades de monossacarídeos e dissacarídeos por molécula. Diferem dos oligossacarídeos quanto ao comprimento da cadeia e a complexidade estrutural associados às freqüentes ramificações das sub-unidades. A característica estrutural dos polissacarídeos é a repetição da unidade monossacarídica.

A composição do caldo de cana é variável e depende de diversos fatores como o tipo de solo, clima e variedade de cana, entre outros.

Desta forma, os valores expressos referem-se a uma composição provável do caldo indicando a diversidade de seus componentes[3,7]. Ainda, a composição do melaço, além de depender da composição da cana da qual se originou, é influenciada pelo processamento industrial a que o caldo de cana foi submetido.

I.2. Determinação quantitativa de açúcares

Os principais métodos de determinação quantitativa de açúcares são predominantemente fundamentados nas reações também utilizadas na sua identificação qualitativa. Dentre os métodos qualitativos clássicos, muito se utilizam das propriedades redutoras dos açúcares e determinam os produtos da reação titrimétrica ou gravimetricamente. Estas reações são baseadas, por exemplo no poder redutor do grupo carbonila, na quebra de ligações entre grupos glicólicos vicinais e ainda, nas reações de produtos de degradação dos açúcares por ácidos minerais fortes[8].

I.2.1. Métodos que se baseiam na oxidação de açúcares por reagentes químicos.

I.2.1.1. Oxidação por Cu^{2+}

A oxidação pelo íon cúprico é a base da grande maioria dos métodos para determinação de açúcares redutores e provavelmente nenhum outro tenha sido utilizado em tantas modificações[8].

Os reagentes utilizados nessas propostas baseiam-se na formação de complexos de cobre divalente com ácidos orgânicos, principalmente tartárico e cítrico. O mais conhecido deles é a solução de Fehling, constituída por duas soluções, uma de sulfato de cobre e outra de tartarato duplo de sódio e potássio. Os açúcares redutores reagem com os íons cúpricos da solução de Fehling, reduzindo-os a íons cuprosos, sob a ação do calor em meio alcalino. Ao reagir com os íons cúpricos, os açúcares sofrem oxidação, enquanto o cobre é reduzido, formando-se um precipitado vermelho

de óxido cuproso. Os açúcares não redutores devem sofrer uma prévia hidrólise com ácido clorídrico[9].

A reação do cobre com os açúcares não é estequiométrica e por esta razão, a quantidade de óxido cuproso separado não é diretamente proporcional à quantidade de açúcar presente[10]. Os açúcares diferem nos seus poderes redutores na solução de íons Cu^{2+} e, conseqüentemente, iguais quantidades de duas diferentes hexoses nas mesmas condições de reação poderão resultar em diferentes quantidades de óxido cuproso. Em geral, métodos estequiométricos são empíricos e exigem que as condições experimentais permaneçam constantes. Assim, se estas forem adaptadas, proporcionalidades aos teores de açúcares envolvidos, dentro de um intervalo de concentração, poderão ser obtidas. Desta forma, para que a reação possa ser empregada como base de um método analítico para determinação de açúcar, vários fatores devem ser rigorosamente controlados tais como pH, concentração dos reagentes, tipo de açúcar e do oxidante empregado, temperatura, tempo de reação, método de aquecimento, etc[11,12,13].

A reação é em geral conduzida sob ebulição visando minimizar os efeitos da variação de temperatura sobre a velocidade de reação e dificultar a re-oxidação do óxido cuproso formado pelo contato com o oxigênio do ar atmosférico[7].

Os métodos fundamentados na oxidação pelos íons cobre podem ser divididos em dois grupos.

O primeiro baseia-se na redução completa de um volume medido da solução de Fehling e do açúcar em investigação. O final da reação é monitorado por um componente adequado, como por exemplo, azul de metileno, o qual é descolorido por um excesso de açúcar após a redução completa dos íons Cu^{2+} [13]. O final da titulação pode também ser detectado potenciometricamente[8].

O segundo baseia-se na determinação de óxido cuproso após sua filtração da mistura de reação quando a redução está completa. Esta determinação pode ser efetuada por diferentes formas: gravimétrica, eletrodeposição, pela dissolução em ácido nítrico com posterior quantificação colorimétrica do complexo formado pela adição de etilenodiamina e pela determinação dos íons Cu^{+} produzidos com permanganato[14,8]. Pode ainda

haver a oxidação do Cu^+ com dicromato e determinação do excesso pela titulação com sais de ferro divalente[15]. O precipitado óxido cuproso pode ser também determinado complexometricamente com EDTA[8].

Certos métodos prescindem da separação do precipitado formado e o óxido cuproso é dissolvido num excesso de solução de fosfomolibdato medindo a intensa cor azul formada[16].

Métodos sem filtração para a determinação do excesso de cobre na solução são menos utilizados. Nesse caso, citam-se a determinação de cobre divalente iodometricamente ou com hidroquinona[17].

I.2.1.2. Oxidação por halogênios

Esta reação, conduzida sob certas condições, pode ser empregada para a determinação específica de aldoses, as quais, em contraste com cetoses, são quantitativamente oxidadas a ácido aldônico em solução alcalina [8,17]. A oxidação é realizada empregando-se excesso de iodo e o iodo remanescente é quantificado com tiossulfato.

I.2.1.3. Oxidação por hexacianoferrato(III)

O íon hexacianoferrato(III) é reduzido pelos açúcares redutores a hexacianoferrato(II), sendo a reação empregada como base de vários métodos analíticos. Neste sentido, a redução deste íon em solução alcalina é muito empregada para titulação direta do açúcar com uso de um indicador adequado (ácido pícrico ou azul de metileno), ou o hexacianoferrato(II) produzido é estimado colorimetricamente após conversão em azul de Prússia[18].

Modificações no método de Park-Johnson para determinação de açúcares redutores foi proposta por Porro e colaboradores[19]. Este método modificado utilizava ácido oxálico como solvente para hexacianoferrato(III) em lugar de dodecil sulfato de sódio o qual fora utilizado no trabalho original para evitar turbidez persistente de forma a permitir a determinação colorimétrica. Baseando-se também neste método modificado, a

determinação automatizada de sacarose e açucares redutores foi proposta por Mattos e colaboradores[20].

I.2.1.4. Oxidação por cério(IV)

A determinação cerimétrica de açúcares pode ser conduzida estimando-se o consumo de cério (IV), pela titulação com ácido oxálico ou arsênico com nitroferroína como indicador[21]. Ou ainda, pelo aquecimento de uma solução em sulfato de cério (IV) em ácido sulfúrico diluído[22]; neste caso, titula-se o excesso com uma solução de Fe^{2+}. Nestas condições, glicose é convertida a ácido fórmico como produto de oxidação, enquanto as cetoses são prontamente oxidadas a dióxido de carbono.

I.2.1.5. Oxidação por metaperiodato

O princípio deste método consiste na oxidação de grupos hidroxil vicinal ou componentes alfa-hidroxicarbinol com posterior determinação dos produtos de reação obtidos.

A oxidação de um mol de poli-álcool do tipo CH_2OH-$(CHOH)_n$-CH_2OH, com *n* variando de zero até quatro, reduz (n+1) mols de HIO_4 até HIO_3 com formação de dois mols de aldeído fórmico e *n* mols de ácido fórmico. Cada ligação C-C requer um mol de íon metaperiodato o qual é reduzido a íon iodato[23,8].

Na determinação espectrofotométrica de dióis vicinais o metaperiodato é reduzido a iodato que reage com iodeto para formar triiodeto, sendo que o excesso de oxidante é mascarado com molibdato[24].

Honda e colaboradores[25] propuseram a determinação potenciométrica do consumo de metaperiodato por meio de um eletrodo seletivo para iodeto. O excesso de metaperiodato reage com excesso de iodeto e o consumo deste é determinado por potenciometria. Neste sentido, respostas lineares dentro de um intervalo de concentrações de 10^{-6} a 10^{-2} $molL^{-1}$ foram observadas. Logo após, trabalhando com eletrodo seletivo para perclorato como sensor para metaperiodato, Efstathiou e Hadjiioannou[26] monitoraram a reação entre metaperiodato e carboidratos. Assim, obtiveram

uma curva analítica no intervalo de concentrações de 7 a 54 mg L^{-1} entre 20 e 140 segundos com desvio-padrão relativo ao redor de 0,5%.

I.2.2. Métodos que se baseiam nas reações coloridas de furfural e seus derivados.

A desidratação de açúcares em meio fortemente ácido produz furfural e os procedimentos analíticos baseados neste princípio, ou utilizam o espectro da região do ultravioleta dos produtos de reação[27], ou determinam os mesmos colorimetricamente[28,29].

Na reação de redução da antraquinona com carboidratos forma-se antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno). A antrona em meio sulfúrico reage com muitos carboidratos produzindo uma cor azul esverdeada característica[30].

A lei de Beer é seguida para carboidratos como glicose, glicogênio e maltose (620nm) [31] e a coloração é devido à formação de compostos de furfural em ácido sulfúrico, particularmente hidroximetilfurfural e furfural[32]. Ainda baseando-se neste método, Witthauer[33] propôs a determinação de carboidratos em ácidos húmicos.

Compostos fenólicos tais como alfa-naftol, resorcinol, timol e orcinol são alguns dos componentes que em solução de ácido sulfúrico produzem com os açúcares e similares um coloração amarelada que é apropriada para determinações colorimétricas[34].

I.2.3. Métodos baseados em reações diversas

A reação de Kiliani consiste na adição de cianeto ao grupo carbonila dos açúcares e é empregada em métodos analíticos, efetuando-se a hidrólise alcalina das cianidrinas formadas, seguindo-se a titulação da amônia liberada[35].

Skell & Crist[36] apresentaram uma proposta para determinação de açúcares baseada na redução do grupo carbonila dos carboidratos pelo borohidreto de sódio. Após a reação, a fração do reagente

que não foi consumida era determinada medindo-se o volume de hidrogênio produzido pela reação de borohidreto de sódio com ácido.

Um método manual para determinação espectrofotométrica de carboidratos redutores com 2-cianoacetamida foi apresentado por Honda e colaboradores[37].

Melo[38] determinou açúcar redutor em açúcar refinado, demerara, melaço e caldo de cana-de-açúcar empregando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio.

A determinação de açúcares redutores em tecidos de plantas foi proposta por Koziol[39]. O método baseia-se na reação dos açúcares redutores com ácido hidroxibenzóico de hidrazida em meio alcalino.

I.2.4. O reagente ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS)

O reagente ácido 3-5 dinitrosalicílico, DNS, foi desenvolvido em 1921 por Summer [40]. Inicialmente Miller [41] utilizou uma mistura composta contendo o DNS, sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), fenol, bissulfito e hidróxido de sódio para a determinação de açúcares redutores. Segundo ele o sal de Rochelle é usado para evitar a reação do ácido 3-5 dinitrosalicílico com o oxigênio dissolvido; o fenol é usado para intensificar a cor produzida e o bisulfito para estabilizar a cor obtida na presença do fenol. O meio alcalino é necessário para ocorrer a ação redutora da glicose sobre o ácido 3-5 dinitrosalicílico, conforme figura 6.

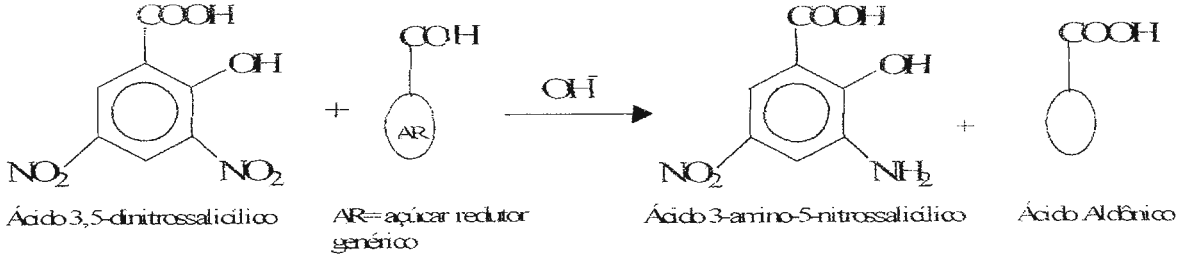

Figura 6. Reação de oxidação de açúcares redutores com ácido 3-5 dinitrosalicílico em meio alcalino.

A possibilidade do uso do DNS para a determinação de açucares redutores totais foi estudada[42], mas não em cana de açúcar ou caldo de cana.

I.2.5. Métodos diversos.

Na atualidade existem diversos métodos desenvolvidos para a determinação de açucares.

Nilsson e colaboradores[43] apresentam um para a determinação de polissacarídeos baseado na atividade catalítica da Oligossacarídeo Dehidrogenase.

Rodríguez e Rivas[44] apresentaram um biosensor enzimático para glicose baseado na co-deposição de ródio, irídio, e glicose oxidase em um eletrodo de carbono vítreo.

A técnica conhecida como BIA (batch injection analysis) foi utilizada para a determinação de sacarose em caldo de cana[45], neste caso um pequeno volume de amostra é introduzido sobre o detector imerso em um grande volume de solução inerte, o sinal obtido é proporcional à concentração da amostra, neste caso o detector utilizado foi um "termisor" para monitorar a variação da temperatura da reação de hidrolise da sacarose em frutose e glicose na enzima invertase imobilizada na superfície de um filme de plástico acima do detector.

Courtin e colaboradores[46] utilizam a cromatografia liquida e gasosa para estudar resíduos das cadeias de oligossacarídeos e polissacarídeos depois da hidrólise com enzimas, o método por eles desenvolvido permite diferenciação de açucares redutores e não redutores depois de uma derivatização.

Si e colaboradores[47] propõem um sensor piezelétrico de cristal de quartzo para a determinação de açucares redutores totais em urina. Neste método observa-se uma variação na freqüência quando uma propriedade do analito é modificada possibilitando estabelecer uma relação quantitativa. O método indireto mede a quantidade de $Ag(NH_3)_2^+$ produzida na reação com glicose que é depositada na superfície do cristal piezelétrico de quartzo.

I.3. Sistemas FIA

I.3.1. Introdução

Quando se pretender analisar grande número de amostras por unidade de tempo, melhorar a precisão dos resultados analíticos com menor tempo, minimizar o consumo de amostras e reagentes, eliminar algumas possibilidades de contaminação, diminuir o custo operacional e empregar método de análise cujo produto de reação a ser medida é instável, deve-se considerar a alternativa de automatizar os procedimentos tradicionais de manipulação.

O trabalho pioneiro de Ruzicka e Hansen [48] apresentado em 1975 introduz na literatura a Análise por Injeção em Fluxo (FIA), o ponto de partida desta metodologia analítica amplamente difundida e principalmente empregada na pesquisa na atualidade.

Os sistemas FIA, além de serem uma alternativa aos procedimentos convencionais de manipulação de soluções[49], apresentam vantagens que o recomendariam como uma metodologia muito interessante de ser aplicada também no ensino e na indústria, mas é preciso para isso uma preparação adequada para o desenvolvimento, operação e manutenção. A construção geralmente é feita segundo as necessidades em materiais de custo baixo como o acrílico[50]. Os sistemas assim desenvolvidos demonstram alta versatilidade. O consumo de amostras, padrões e reagentes é usualmente muito menor que em batelada e a freqüência de amostragem é geralmente muito maior. O controle estrito dos tempos de reação possibilita uma elevada precisão e pode ser facilmente acoplado a diversos tipos de detectores [51], sendo que um dos mais utilizados é o detector espectrofotométrico. Os limites de detecção obtidos com FIA para a espectrofotometria podem ser comprometidos pelo aumento da dispersão do sistema, de modo que é sempre importante avaliar a dispersão nos sistemas desenvolvidos.

I.3.2. Sistemas FIA para determinação de glicose, frutose e glicerol

A determinação automatizada de glicerol em águas industriais foi proposta por Betteridge e Ruzicka[52]. Neste trabalho, os autores demonstraram um novo modo de medir viscosidade. Relações entre vazões, volumes injetados de amostra e percurso analítico foram definidas de forma a correlacionar linearmente o sinal analítico registrado com a concentração de glicerol utilizada. Como os teores investigados foram muito elevados (15 a 100% m/m), a proposta não se aplica a baixas concentrações de glicerol.

Betteridge e colaboradores[53] propuseram a separação de açúcares redutores por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguida de determinação espectrofotométrica. Amostras de 5 μL eram injetadas por meio de microseringa, no topo da coluna, com amostragem do eluato (12 μL) e inserção automática no sistema FIA. Estes intervalos de amostragem e injeção foram ajustados para a obtenção da melhor sensibilidade. Curvas analíticas no intervalo de concentrações de 0,1 a 1,0% m/v em frutose ou glicose e 0,1 a 2,0% m/v em maltose ou lactose foram apresentadas.

Maquieira e colaboradores[54] apresentaram uma comparação de métodos clássicos para determinação automatizada de açúcares redutores em vinhos de várias procedências. Os métodos do ácido pícrico, neocuproina e Somogyi-Nelson foram comparados em termos de intervalos de concentrações, desvio padrão relativo e freqüência de amostragem. As variáveis químicas e físicas foram discutidas no sentido da obtenção do método mais indicado. Segundo os autores, o terceiro método, apesar de ter apresentado o maior desvio-padrão, foi o que apresentou a maior freqüência de amostragem; isto ocorreu devido ao fato deste último não requerer descoloração prévia da amostra.

Zagatto e colaboradores[55] propuseram a determinação espectrofotométrica de sacarose em caldo de cana-de-açúcar e melaço baseando-se na oxidação pelo íon metaperiodato. O sistema foi projetado com dois fluxos transportadores de forma a promover a hidrólise ácida da sacarose em linha. Desta forma, uma zona de amostra era transportada diretamente aos fluxos confluentes e a outra em direção ao reator tubular helicoidal aquecido

onde ocorria a inversão parcial e reprodutível da sacarose. O teor de sacarose presente na amostra era proporcional à diferença dos sinais analíticos registrados. Trinta amostras de caldo de cana, sem necessidade de clarificação, foram analisadas por hora com resultados precisos (desvio padrão relativo< 1%) e concordantes com HPLC.

Mattos e colaboradores[20] propuseram a determinação de sacarose e açúcares redutores totais em caldo de cana-de-açucar e melaço, baseando-se na oxidação não seletiva de açúcares pelo íon hexacianoferrato(III), em meio alcalino, a 95°C; após adição de 1,10 fenantrolina e sulfato férrico, sendo o complexo hexacianoferrato(II) espectrofotometricamente monitorado a 512 nm. Dois sinais eram reportados por ciclo, refletindo o teor de açúcares redutores da amostra antes e após a inversão da sacarose. O sistema permitia que fosse realizada a inversão ácida da sacarose em linha em poucos segundos. Cerca de 40 amostras por hora foram reportadas, com desvio-padrão relativo inferior a 1% e resultados concordantes com HPLC.

I.3.3. Métodos enzimáticos.

Os métodos enzimáticos em função da alta seletividade entre outras características, têm sido muito utilizados especialmente em propostas automatizadas. Destas destacam-se aplicações em determinações de glicose, frutose, sacarose ou rafinose[3].

Ruzicka & Hansen[56] apresentaram uma nova forma automatizada de determinação enzimática de glicose baseando-se na técnica "stopped-flow". Para isto, 30 μL de solução aquosa com 0,01 a 20,0 mmol L^{-1} glicose foram utilizadas.

Hansen e colaboradores[57] propuseram a determinação de glicose em soro de sangue empregando *glicose-dehidrogenase* imobilizada. Curva analítica linear no intervalo de 3 a 20 mmol L^{-1} e freqüência de amostragem de 120 amostras por hora foram obtidas.

Uma proposta amperométrica para determinação de glicose em soro de sangue humano com eletrodo enzimático quimicamente modificado foi apresentada por Yao[58]. Detalhes da construção do sensor

amperométrico e do procedimento para imobilização da *glicose-oxidase*, assim como interferências observadas foram discutidas. Segundo o autor, substâncias redutoras que poderiam ser classificadas como interferentes deveriam ser eliminadas com a introdução de uma coluna de ditiocarbamato de cobre(II) imediatamente antes do sensor amperométrico. Curva analítica linear no intervalo de concentrações de 50-400 mg/L e desvio-padrão relativo inferior a 1% foram obtidos.

Wieck e colaboradores[59] apresentaram a determinação automatizada de glicose utilizando como detector um eletrodo com enzima imobilizada e eletrodo de calomelano saturado como referência. Respostas lineares no intervalo de concentrações de 2,5 a 10,0 mmol L^{-1} em glicose com sensibilidade ao redor de 400 nA/mmol L^{-1} e desvio-padrão relativo menor do que 2% foram reportados.

Combinando o uso de um reator com *glicose-oxidase* imobilizada e um eletrodo com *peroxidasse*, Yao e colaboradores[60] propuseram a determinação automatizada de glicose. O eletrodo media o hexacianoferrato(III) produzido pelo peróxido de hidrogênio o qual era gerado pela introdução de 2 μL de amostra em um reator com *glicose-oxidase* imobilizada:

$$H_2O_2 + 2\,[Fe(CN)_6]^{4-} + 2\,H^+ \rightleftharpoons 2\,H_2O + 2\,[Fe(CN)_6]^{3-}$$

O hexacianoferrato(III) era medido amperometricamente e como o eletrodo era polarizado a baixo potencial, havia uma pequena interferência de outros constituintes normalmente presentes em fluídos biológicos. Corrente de pico linear relativa à concentração de glicose no intervalo de concentrações de 0,05 a 10,0 g/L foi observada e não foi presenciada interferência de ácido ascórbico até 0,5 mmol L^{-1}. A seguir Masoon e Townshend[61] trabalhando com *glicose-oxidase* imobilizada em vidro de porosidade controlada, descreveram a determinação automatizada de glicose. O detector era uma célula de fluxo em vidro contendo dois eletrodos retangulares de platina polarizados em 0,6 V. A corrente observada era proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio, originário da reação

enzimática. Os resultados foram concordantes com aqueles obtidos convencionalmente.

A determinação amperométrica automatizada de glicose em alimentos foi também proposta por Moody e colaboradores[62]. O trabalho apresentava *glicose-oxidase* imobilizada e eletrodo padrão de platina formando a base do eletrodo enzimático. Galactose, maltose, arabinose, frutose, sacarose, lactose e sacarina nas concentrações 10 e 100 mmol L^{-1} foram testadas como interferentes e uma curva analítica linear no intervalo de concentrações 0,01-3,00 mmol L^{-1} em glicose foi obtida.

Kiba e colaboradores[63] propuseram um método fluorimétrico com *monitol-dehidrogenase* imobilizada. Esta enzima imobilizada catalisava a redução de D-frutose a monitol como:

$$\text{D-frutose} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{D-manitol} + \text{NAD}$$

A oxidação do NADH ocorria simultaneamente e o desaparecimento deste último era medido por fluorimetria. Curva analítica linear no intervalo de concentrações de 6 a 600 mmol L^{-1} em frutose e 30 amostras analisadas por hora foram reportadas.

A determinação de sacarose e glicose em produtos alimentícios foi proposta por Koerner e Nieman[64] onde a sacarose era determinada após conversão em glicose, através da reação com *invertase* e *mutarase*. O peróxido de hidrogênio, originário da oxidação da glicose pela *glicose-oxidase*, reagia com luminol sob pH 11, e era determinado por quimiluminescência. Em análises de produtos alimentícios contendo sacarose e glicose, era necessário distinguir-se a glicose originalmente presente na amostra daquela originária da inversão da sacarose. Neste sentido, uma alíquota de amostra atravessava somente a coluna com *mutarotase* e *glicose-oxidase* e a outra fluía através da coluna com *invertase* e *mutarotase* imobilizadas, permitindo a determinação isoladamente. Análises de sacarose e glicose em refrigerantes, cereais e outros produtos alimentícios foram apresentados sendo os resultados concordantes com aqueles obtidos por métodos convencionais.

Masson e Worsfold[65] propuseram um método automatizado baseado em zonas coalescentes para determinação de glicerol e triglicerídeos. Foram utilizadas as enzimas imobilizadas *glicerol-dehidrogenase* e *lipase* para glicerol e triglicerídeos respectivamente.

$$\text{Triglicerídeos} + 3\ H_2O \rightleftharpoons \text{glicerol} + \text{produtos}$$

$$\text{Glicerol} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{dihidroxiacetona} + NADH + H^+$$

A formação de NADH era monitorada a 340 nm e, sob condições apropriadas, a taxa de reação é proporcional à concentração de glicerol e triglicerídeos presentes na amostra.

I.3.4. Métodos Diversos.

Oliveira e colaboradores[66] propuseram um novo método, assistido por microondas e com câmara de separação liquido-vapor para a determinação de açúcares redutores totais em vinho, neste caso o reator construído em teflon (PTFE) foi posicionado na saída da antena do magneto de um forno de microondas comum. A oxidação com hexacianoferrato(III) de potássio, assistida por microondas, com excesso de agente oxidante, permitiu a determinação por espectrofotometria de absorção molecular.

Lopes e colaboradores[67] utilizaram um eletrodo tubular como detector; este é baseado no picrato de bis-trifenilfosforanilideno de amônio depositado sobre um filme de PVC. Incorporado no sistema FIA foi possível, segundo os autores, a determinação de açúcares redutores totais em vinho do Porto, para amplas faixas de concentração.

II. OBJETIVOS

O objetivo principal da presente dissertação foi o desenvolvimento de métodos simples e de baixo custo para análise de caldo de cana-de-açúcar.

Nesse sentido, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a reatividade do ácido 3-5 dinitrosalicilico (DNS) verificando a necessidade do uso do fenol, bissulfito e sal de Rochele para determinações espectrofotométricas de açúcares redutores, primeiramente para glicose.
- Propor um sistema FIA utilizando DNS como reagente para a determinação dos açúcares redutores totais em caldo de cana-de-açúcar, incorporando a hidrólise ácida da sacarose em linha.
- Avaliar o uso de mini-compressores, tipicamente usados em aquários, para propulsão de fluidos em substituição da bomba peristáltica.
- Trabalhar na fabricação de uma cela de fluxo para espectrofotômetro em acrílico e lamínula.
- Comparar o método desenvolvido, sistema FIA com o reagente DNS, com a metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), baseada no Método de Lane-Eynon.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. MATERIAIS

A. Equipamentos e acessórios

a) Espectrofotômetro Micronal modelo B382, com uma cela de fluxo de acrílico revestida com vidro, de 10 mm de percurso óptico;
b) Registrador potenciométrico Micronal modelo B292;
c) Injetor comutador;
d) Mini-compressores (bomba de aquário) da Betta, modelo silento;
e) Tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para construção dos reatores, das linhas de transmissão e das alças de amostragens;
f) Balança analítica Mettler modelo PC180;
g) Aparelho pH-metro digital Micronal modelo B375;
h) Termômetro;
i) Banho termostatizado FANEM modelo 147;
j) Chapas de aquecimento;
k) Vidraria de uso rotineiro em laboratórios de Química Analítica.

B. Reagentes

Neste trabalho, os reagentes eram de grau analítico e a água destilada em destilador de vidro.

C. Soluções

Todas as soluções, abaixo determinadas, eram preparadas com água destilada e acondicionadas em frascos de vidro.

- Solução estoque de DNS 2% m/v: dissolver 2 g de DNS em 30 mL de NaOH 10% m/v e adicionar lentamente água destilada aquecida a 40°C. Completar até 100 mL com água destilada;

- Solução estoque de glicose 0,10 $molL^{-1}$: dissolver 18,0155 g de glicose em aproximadamente 100 mL de água destilada e completar para 1 L;

- Solução estoque de glicose 180 g L^{-1}: dissolver 180 g de glicose em aproximadamente 500 mL de água destilada e completar para 1 L;

- Solução estoque de sacarose 180 g L^{-1}: dissolver 180 g de sacarose em aproximadamente 600 mL de água destilada e completar para 1000 mL;

- Solução de fenol 0,2% (m/v): dissolver 0,2 g de fenol em aproximadamente 60 mL de água destilada e completar para 100 mL;

- Solução de bissulfito de sódio 0,05% (m/v): dissolver 0,05 g de bissulfito de sódio em aproximadamente 60 mL de água destilada e completar para 100 mL;

- Sal de Rochelle 18,25% (m/v): dissolver 18,25 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetraidratado em aproximadamente 80 mL de água destilada e completar para 100 mL;

- Solução de ácido clorídrico 2,0 mol.L^{-1}: pipetar 166,0 mL de ácido clorídrico PA e adicionar em 600 mL de água destilada, resfriar e completar para 1 L;

- Solução de hidróxido de sódio 6,0 mol L^{-1}: dissolver 240 g de hidróxido de sódio em aproximadamente 800 mL de água destilada e completar para 1 L;

- Solução de acetato de chumbo 20% m/v: dissolver 20 g de acetato de chumbo em aproximadamente 60 mL de água destilada e completar para 100 mL;

- Solução A de Fehling: dissolver 17,32 g de sulfato cúprico pentaidratado em aproximadamente 400 mL de água destilada e completar a 500 mL;

- Solução B de Fehling: dissolver 86,5 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetraidratado e 62,5 g de hidróxido de sódio em aproximadamente 400 mL de água destilada e completar a 500 mL;

- Solução de azul de metileno a 1% (m/v): dissolver 1 g de azul de metileno em aproximadamente 60 mL de água destilada e completar o volume para 100 mL.

D. Amostras

As amostras de caldo de cana-de-açúcar eram procedentes do comércio urbano de garapa em São Paulo(SP) e em Vitória(ES) e foram previamente clarificadas usando o método do MAPA[9]. Para isso uma alíquota de 5,00 mL da amostra foi acondicionada junto com 2 mL de acetato de chumbo e uma pequena quantidade de carvão ativo. Depois de agitação vigorosa se deixou em repouso por 10 minutos, completando-se o volume para 100,00 mL em balão volumétrico e procedendo-se a filtração sobre 0,8 g de fosfato monoácido de sódio.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. Sistema em Batelada

Inicialmente foram realizados provas em batelada usando a metodologia proposta por Miller[41], verificando a necessidade do uso de fenol, bissulfito de sódio e sal de Rochelle. Foram verificados também: a menor concentração de DNS, o menor tempo no banho-maria e o comprimento de absorção no espectro de absorção molecular.

a) Espectro de absorção molecular

Tomaram-se dois tubos de ensaio e adicionaram-se ao primeiro 2,0 mL de solução de DNS 1% m/v e 1 mL de solução 10% m/v de NaOH, ao outro adicionaram-se 2,0 mL de solução de DNS 1% m/v e 1 mL de solução de glicose 1,8 g L^{-1}. Os tubos foram aquecidos a 80°C por 20 minutos e diluídos para 100,0 mL.

b) Ensaio com DNS

Visando à determinação da melhor concentração de solução de DNS para reagir com glicose realizaram-se os ensaios propostos na tabela 1. Os tubos foram aquecidos a 80°C durante 20 minutos e, depois, diluídos para 50,0 mL.

Tabela 1. Ensaios para determinar a melhor concentração de DNS para reagir com glicose.

Ensaio	DNS 1% (m/v) (mL)	NaOH 10% (m/v) (mL)	Glicose 0,01 mol L^{-1} (mL)
A	0,30	0,70	1,00
B	0,45	0,55	1,00
C	0,50	0,50	1,00
D	0,60	0,40	1,00
E	0,75	0,25	1,00
F	0,90	0,10	1,00
G	1,00	0,00	1,00

c) Estudo do tempo de aquecimento

Para determinar o menor tempo de aquecimento do banho-maria variou-se o tempo em 1, 2, 3 e 5 minutos. Três tubos receberam 1,00 mL de solução de glicose 0,0100 mol L^{-1} e 1,0 mL de solução de DNS a 0,75% (m/v). Foram aquecidos a 80°C durante os tempos anteriormente citados e, depois de resfriados, foram diluídos para 50,0 mL, seguindo-se leitura da absorbância a 510 nm.

d) Ensaio com bissulfito, fenol e sal de Rochelle

Para estudar a necessidade do uso de bissulfito, fenol e sal de Rochelle na determinação de glicose com DNS, foram propostos três ensaios:

d.1) apenas glicose;

d.2) glicose com bissulfito + fenol

d.3) glicose com sal de Rochelle.

Os volumes adicionados a cada tubo estão relacionados abaixo:

- Glicose – 1,00 mL de solução 0,45; 0,90; 1,35 e 1,80 mg mL^{-1};
- DNS – 2,00 mL de solução 1% (m/v);
- Fenol – 1,00 mL de solução 0,2% (m/v);
- Bissulfito – 1,00 mL de solução 0,05% (m/v);
- Sal de Rochelle – 1,00 mL de solução 18,25% (m/v).

As concentrações usadas nas soluções de fenol, bissulfito e sal de Rochelle foram propostas por Summer e citadas por Miller[41].

Os tubos foram aquecidos em banho-maria por 2 minutos a 80°C e diluídos para 50,00 mL para realizar a leitura da absorbância.

III.2.2. Sistema FIA

Neste trabalho, faz-se uso de mini-compressores de ar do tipo bomba de diafragma originalmente destinados ao borbulhamento de ar em aquários domésticos. Um diagrama esquemático da adaptação de mini-compressores de ar para impulsionar soluções, originalmente desenvolvido por Matos[68], é ilustrado na figura 7.

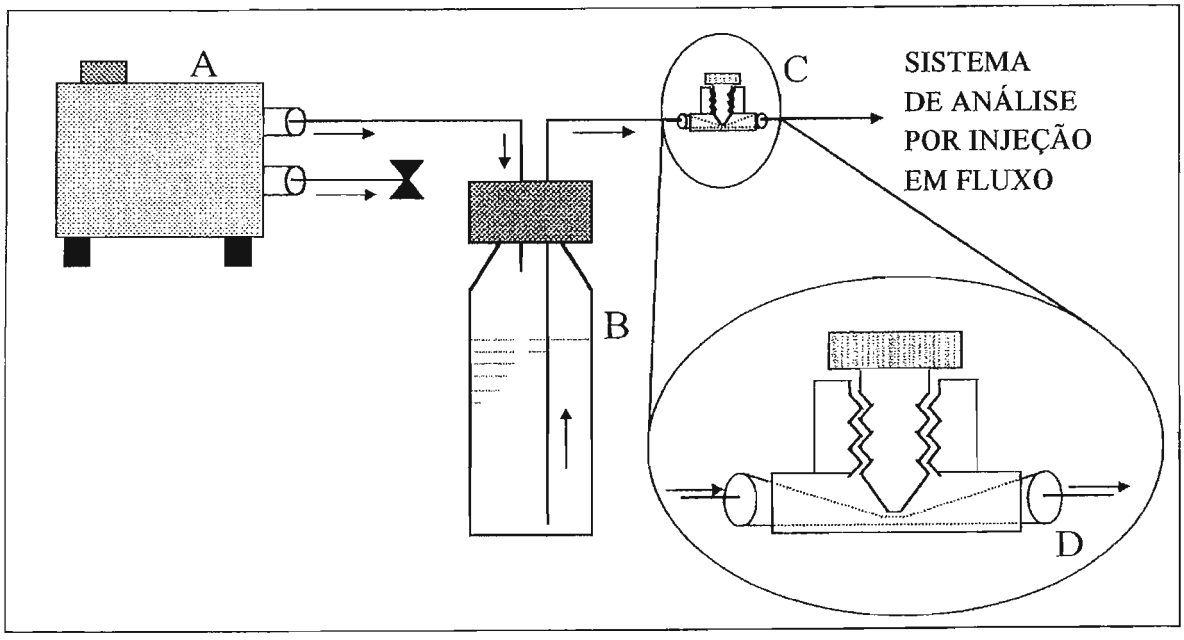

Figura 7. Representação esquemática do sistema de análise em fluxo utilizando bomba de aquário para a propulsão de líquidos. (A) Mini-compressor de ar; (B) Reservatório de eletrólito; (C) Válvula reguladora de vazão; (D) Tubo flexível de Tygon[68].

No espectrofotômetro, usou-se uma cela de baixo custo feita em acrílico e revestida com lamínula (Fig. 8).

O sistema FIA da figura 9 apresenta setas escuras que indicam pontos de atuação dos mini-compressores. Para cada ponto usou-se um mini-compressor independente.

A letra T indica um sistema para retirar bolhas formadas após o reator. Esse sistema é feito com um corte longitudinal em um tubo de Tygon, e coberto com fita de Teflon.

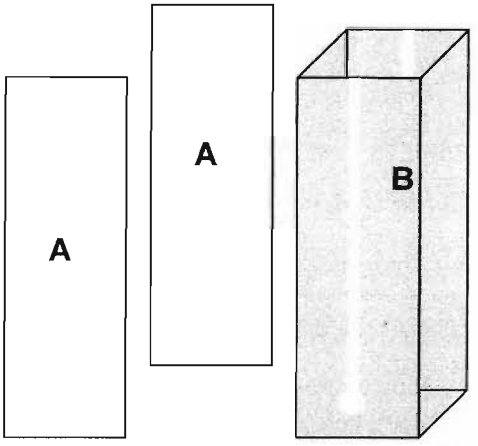

Figura 8. Representação esquemática da cela de fluxo utilizada (A) lamínulas de vidro (B) bloco de acrílico com linhas trabalhadas para o ingresso e saída de soluções e passo de luz, os tubos de conexão foram colados na parte superior

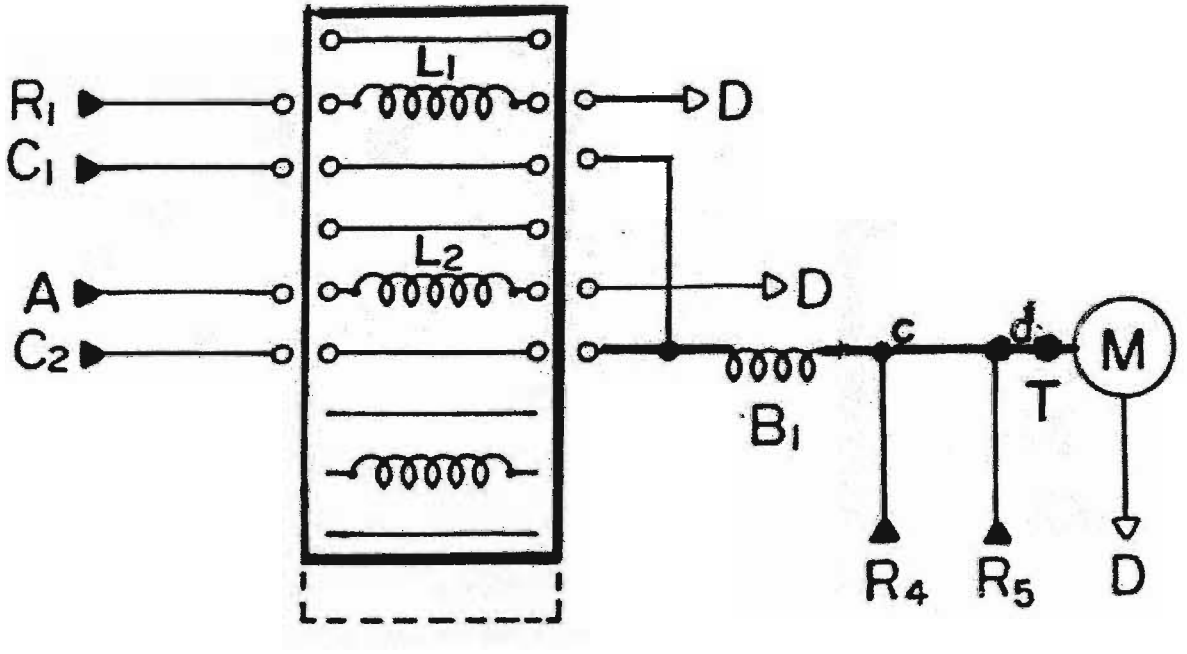

Figura 9. Diagrama de fluxos do sistema FIA utilizado para avaliação das condições de reação. A – amostra; C_1 e C_2 – líquido carregador (H_2O); L – alças de amostragem; D – descarte; B_1 – reator; R_1 – solução alcalina de DNS (0,75% m/v); R_4 e R_5 – água destilada; T – retirador de bolhas; M – detector (510 nm); c e d – pontos de confluência. Os componentes no interior do retângulo estão associados à porção central móvel do comutador, cujo deslocamento permissível é indicado pela linha interrompida. Setas escuras indicam pontos de atuação dos mini-compressores de aquário.

Na posição especificada na figura 9, o reagente e a solução do analito eram aspirados a uma vazão de 0,35 mL min^{-1}, preenchendo a alça de amostragem, e o seu excesso era descartado. Nesses experimentos, foram pesquisados valores de 10 a 50 cm como comprimentos da alça de amostragem, que correspondem a volumes injetados de aproximadamente 50 a 250 μL. Na posição alternativa, o volume selecionado de reagente e analito eram inseridos no fluxo carregador (água destilada, 0,35 mL min^{-1}), sendo transportado à detecção através da linha de transmissão e do reator B_1. Foi também pesquisado o tamanho do reator em 20, 50, 100, 150 e 200 cm.

III.2.2.1. Glicose

O sistema FIA da figura 9 foi empregado para investigação das principais variáveis envolvidas na oxidação de glicose, sendo projetado para promover alta dispersão, de forma a se evitar acentuada diluição prévia da amostra. Foram verificadas as influências das concentrações de DNS (R_1) associadas às reações de oxidação de açúcares redutores. Parâmetros tais como proporções entre fluxo transportador e confluente; curva de calibração da glicose; repetitividade e limite de detecção e quantificação foram também estudados.

a) Vazão do líquido transportador e concentração do reagente DNS

A concentração de DNS usada no sistema em batelada ultrapassava a escala do espectrofotômetro quando usado no sistema FIA, conforme a figura 9. Assim a concentração de DNS foi reduzida a 0,1% (m/v) para obter leitura por volta de 0,300 de absorbância. Entretanto, nessa concentração de DNS cessava a reação com a glicose. Assim, a concentração de DNS foi mantida a 0,75% m/v e foi adicionada água destilada, após o reator, para diluir a solução em linha após a reação. A diluição foi feita em duas etapas, em R_4 e R_5 (Figura 9), com vazões de 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente.

A vazão do líquido transportador C_1 e C_2 foi também ajustada em 0,35 mL min^{-1} para evitar acentuada diluição prévia do reagente DNS.

b) Tamanho do reator

Visando verificar o tamanho ideal do reator, variou-se o seu comprimento em 20, 50, 100, 150 e 200 cm. As demais condições foram: solução de glicose 0,50 mol L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de amostragem de 20 cm (100 μL); espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

c) Volume injetado da amostra

Para determinar o volume ideal de amostra foram injetados 50, 100, 150, 200 e 250 μL. As demais condições foram: solução de glicose 0,50 mol L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

d) Estudo da repetitividade

Para averiguar a repetitividade do método empregado, realizaram-se 10 leituras para uma mesma amostra nas seguintes condições: solução de glicose 0,50 mol L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm (100 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

e) Curva analítica para glicose

Soluções padrões de glicose foram preparadas por diluição de uma solução estoque de concentração 180 g L^{-1}, nas concentrações de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 g L^{-1}.

As demais condições foram as seguintes: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

f) Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Dez leituras do branco foram realizadas para estimar o limite de detecção e limite de quantificação. As demais condições foram as seguintes: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm (100 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

III.2.2.2. Sacarose

O sistema FIA da figura 10 foi empregado para investigação das principais variáveis envolvidas na determinação da sacarose. Com este sistema foram avaliados os seguintes parâmetros: influência do volume da amostra, repetitividade, freqüência de amostragem, curva analítica, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

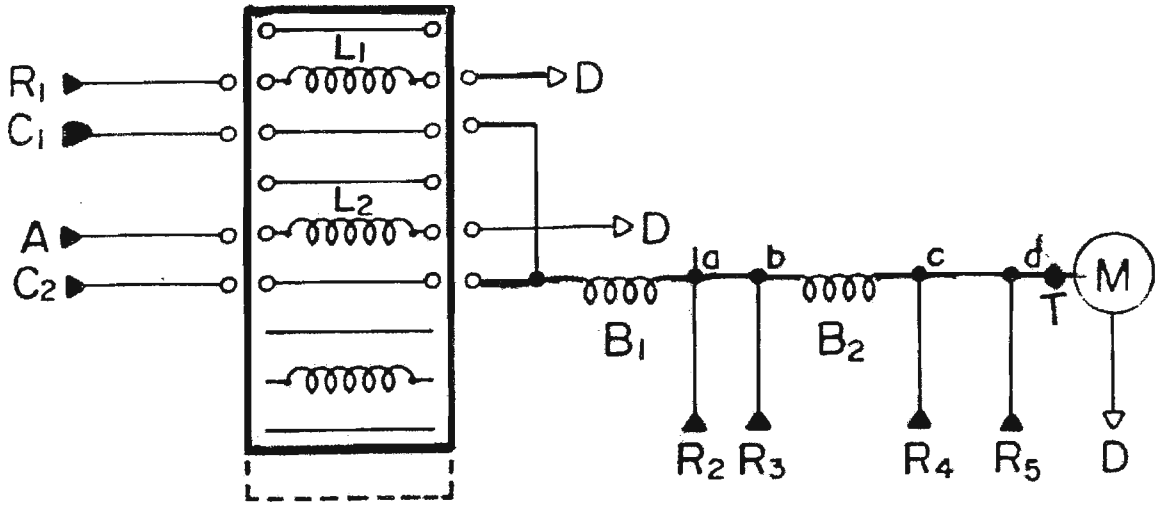

Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema FIA utilizado para avaliação das condições de reação. A – amostra; C_1 e C_2 – líquido carregador (H_2O); L – alças de amostragem; D – descarte; B_1 e B_2 – reatores; R_1, R_2 e R_3 – solução de HCl (2,0 mol L^{-1}); solução de NaOH (6,0 mol L^{-1}); solução alcalina de DNS 0,75% (m/v), respectivamente; R_4 e R_5 – água destilada; T – retirador de bolhas; M – detector (510 nm); a, b, c e d – pontos de confluência. Os componentes no interior do retângulo estão associados à porção central móvel do comutador, cujo deslocamento permissível é indicado pela linha interrompida. Setas escuras indicam pontos de atuação dos compressores de aquário.

a) Volume injetado da amostra

Para determinar o volume ideal de amostra foram injetados na alça 50, 100, 150, 200 e 250 μL. As demais condições foram: solução de sacarose 90 g L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

b) Estudo da repetitividade

Para averiguar a repetitividade do método empregado, realizaram-se 10 leituras para uma mesma amostra nas seguintes condições: solução de sacarose 90 g L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm (150 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

c) Freqüência de amostragem

Para determinação da freqüência de amostragem foram realizadas três leituras para uma mesma amostra e o tempo foi anotado. Condições: solução 90 g L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm (150 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

d) Curva analítica para sacarose

Prepararam-se soluções padrões de sacarose por diluição de uma solução estoque padrão de concentração 180 g L^{-1}, nas concentrações de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 g L^{-1}.

As demais condições foram as seguintes: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm (150 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

e) Estimativa do Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Dez leituras do branco foram realizadas para estimar o limite de detecção e limite de quantificação. As demais condições foram as seguintes: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada;

alça de 30 cm (150 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

f) Estudo da exatidão das amostras de sacarose hidrolisadas

Para averiguar a validade do método FIA foram preparadas três amostras de sacarose de concentrações iguais a 20, 100 e 180 g L^{-1}, com três repetições. As demais condições foram as seguintes: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm (150 μL); reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

III.2.2.3. Análise de caldo de cana-de-açúcar

Amostras de caldo de cana-de-açúcar foram analisadas para determinar a quantidade de açúcares redutores totais. Três amostras analisadas de caldo de cana-de-açúcar, previamente clarificadas, foram hidrolisadas e reagiram com DNS. As demais condições foram as seguintes: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm; reator 100 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,40, 0,40, 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL/min para C_1, C_2, R_2, R_3, R_4 e R_5, respectivamente.

III.2.3. Método de Lane-Eynon

A metodologia de Lane-Eynon, publicada na portaria nº 76 de 26 de Novembro de 1986 no Diário Oficial, sugerida pelo MAPA[9] – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foi adotada para determinação de Açúcares Redutores Totais em caldo de cana-de-açúcar, e reproduzida a seguir.

Titulação do branco:

Em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 20 mL de solução de Soxhlet (10 mL de Felhing A + 10 mL de Felhing B), 50 mL de água destilada e 10,00 mL da solução padrão de glicose e algumas esferas de vidro. Levar o frasco ao aquecimento, de modo que entre em ebulição dentro de 4 minutos. Iniciada a ebulição, adicionar 3 gotas de azul metileno. Decorrido um minuto do inicio da fervura, proceder a titulação até o desaparecimento da coloração azul. Repetir a operação até que os resultados em duplicata sejam iguais.

Titulação da amostra:

a) Prévia

Em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 20 mL da solução de Soxhlet, 40 mL de água destilada e 10,00 mL da amostra preparada. Levar o frasco ao aquecimento, de modo que entre em ebulição dentro de 4 minutos. Iniciada a ebulição, titular com solução de glicose até o desaparecimento da coloração azul do sulfato de cobre. Adicionar 2 gotas de azul de metileno, após 1 minuto, continuar a titulação até o desaparecimento da coloração azul. Seja K o volume gasto da solução de glicose.

b) Titulação

Em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 20 mL da solução de Soxhlet, 40 mL de água destilada e 10,00 mL da amostra preparada. Levar o frasco ao aquecimento, de modo que entre em ebulição dentro de 4 minutos, e imediatamente transferir (K-1) mL de glicose. Iniciada a fervura, adicionar 2 gotas de azul de metileno. Após 1 minuto, continuar a titulação até o desaparecimento do azul da solução, gastando no final da titulação aproximadamente o mesmo tempo gasto na determinação do branco. Repetir a operação até que os resultados em duplicata sejam iguais.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. Sistema em batelada

a) Espectro de absorção molecular

O espectro de absorção molecular apresentado, obtido entre 300 e 700 nm, mostra máximos de absorção muito intensos em 440nm para o DNS puro e em 450 nm para o DNS em reação com a glicose (Fig. 11).

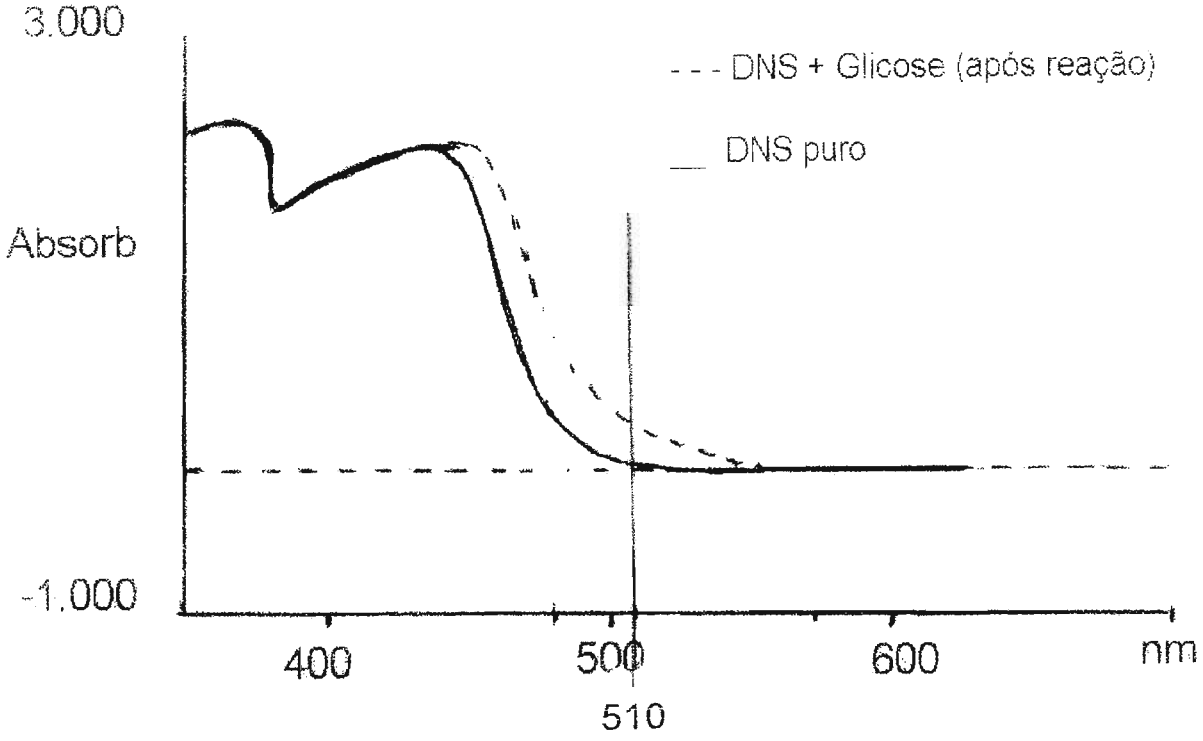

Figura 11. Espectro de absorção molecular de solução de DNS 1% (m/v) em reação com glicose 1,80 g L^{-1}, após aquecimento de 2 minutos a 80°C por 20 minutos e diluídos para 100,0 mL.

Procurando minimizar o valor do branco se fez a escolha de 510 nm, para o comprimento de onda analítico, o qual será utilizado nas próximas experiências.

b) Ensaio com DNS

Verificou-se que a melhor concentração do DNS para a reação com glicose no comprimento de onda de leitura 510 nm foi igual a 0,75% (m/v). Para concentrações maiores foi virtualmente impossível conseguir zerar o espectrofotômetro.

c) Estudo do tempo de aquecimento

Segundo pode verificar-se na figura 12, por volta de dois minutos de aquecimento no banho-maria são suficientes para ter uma absorbância apreciável. Mesmo observando-se um aumento na absorbância para tempos maiores, a variação é pequena e a freqüência de amostragem ficaria muito diminuída. Nos estudos posteriores, 2 minutos de aquecimento foram utilizados para o tempo de reação.

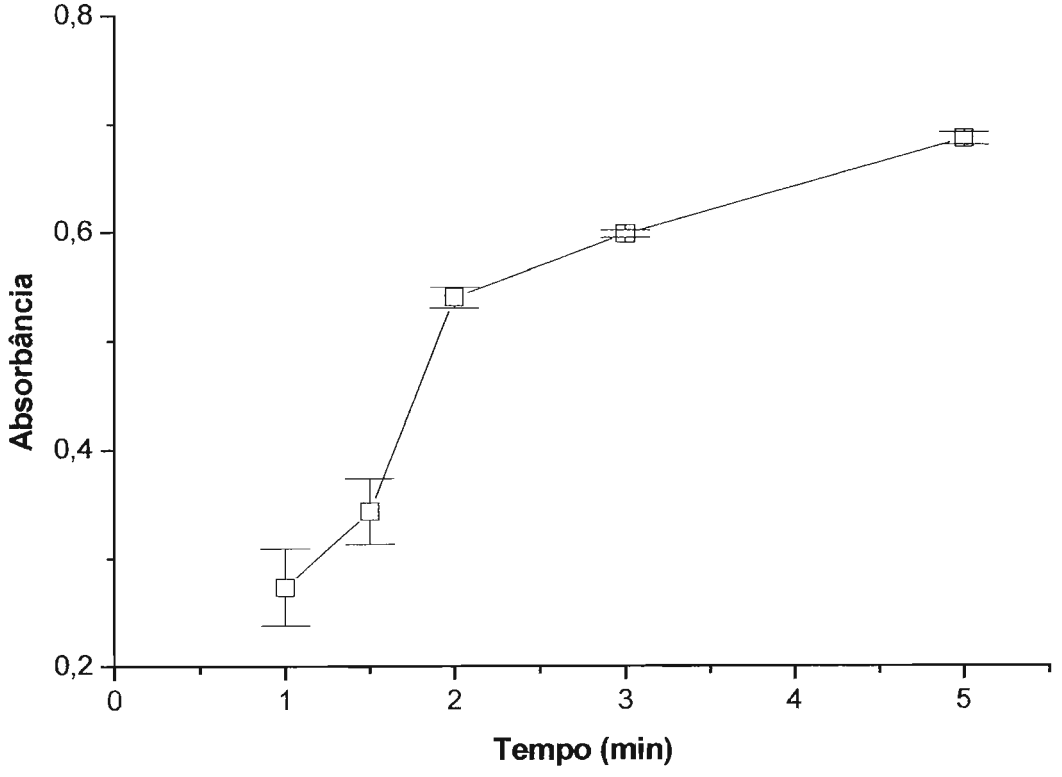

Figura 12. Estudo do tempo de reação no banho-maria entre 1; 1,5; 2; 3 e 5 minutos. Condições: 1,00 mL de glicose 0,010 mol/L e 1 ml de DNS 0,75% (m/v), aquecidos a 80°C, resfriados e diluídos a 50,0 mL. Os resultados correspondem a média de três repetições.

d) Ensaio com bissulfito, fenol e sal de Rochelle

Na tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para esta experiência, segundo o planejamento apresentado na seção anterior.

Tabela 2. Valores em absorbância para glicose usando DNS e testando três ensaios: a) glicose pura; b) glicose + bissulfito + fenol e c) glicose + sal de Rochelle, com leitura a 510 nm (média de três repetições).

Glicose	Glicose pura	Glicose+bissulfito+ Fenol	Glicose+Sal de Rochelle
(mg mL^{-1})		absorbância	
0	0	0	0
0,45	0,097	0,098	0,098
0,90	0,170	0,170	0,179
1,35	0,271	0,270	0,282
1,80	0,349	0,349	0,356

As absorbâncias da glicose pura e da glicose com bissulfito + fenol são iguais. Para glicose pura comparada com glicose + sal de Rochelle aplicou-se teste t a 95% de confiança[69], verificando-se que não existe diferença significativa entre as médias de três repetições.

Verifica-se assim que não é necessário o uso de bissulfito, fenol e sal de Rochelle na análise de glicose com DNS. Isto tem um grande impacto na possível aplicação do método, dada a drástica diminuição no consumo de reagentes e a simplicidade do sistema necessário para realizar as determinações.

IV.2. FIA

IV.2.1. Glicose

a) Vazão do liquido transportador e concentração do reagente DNS

As necessidades operativas foram atendidas para o DNS, com 0,75% (m/v) de concentração e vazões em R4 e R5 (Figura 9) de 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente. A vazão do transportador C1 e C2 (Figura 9) foi de 0,35 mL min^{-1}. A vazão que se pode obter com as bombas de aquário utilizadas é baixa.

b) Comprimento do reator

Os resultados obtidos se apresentam a seguir na figura 13

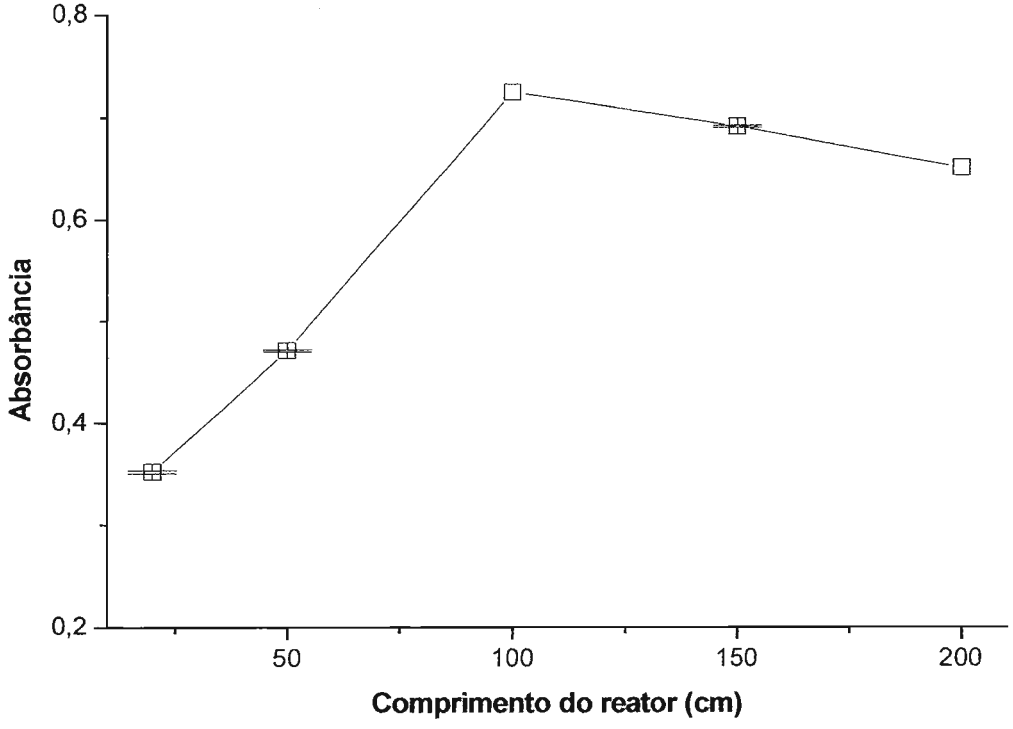

Figura 13.Estudo do comprimento do reator (20 a 200 cm). Condições: solução de glicose 0,50 mol L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

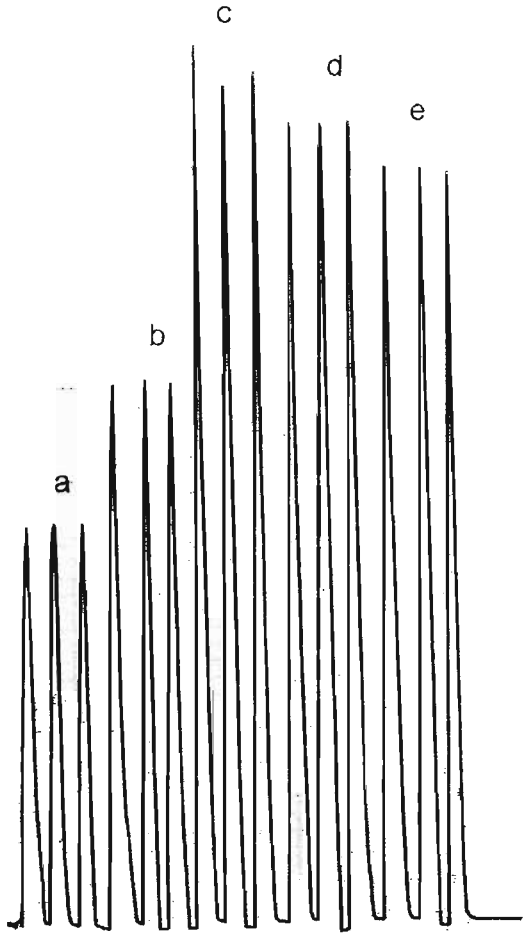

Figura 14. Registros de sinais transientes para avaliação do comprimento ideal do reator (a) 20; (b) 50; (c) 100; (d) (150) e (e) 200 cm. Condições: solução de glicose 0,50 mol.L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL/min para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente. Escala 1 cm: A= 0,065 de absorbância.

O tamanho do reator influencia no tempo de residência e na dispersão do sistema. Observa-se, nas figuras 13 e 14 que o reator com comprimento da ordem de 100 cm apresentam o melhor sinal. Comprimentos superiores a 100 cm aumentam a dispersão diminuindo o sinal.

c) Volume injetado de amostra

A influência do volume injetado da amostra foi estudada. A figura 15 apresenta os registros dos sinais analíticos observados neste estudo.

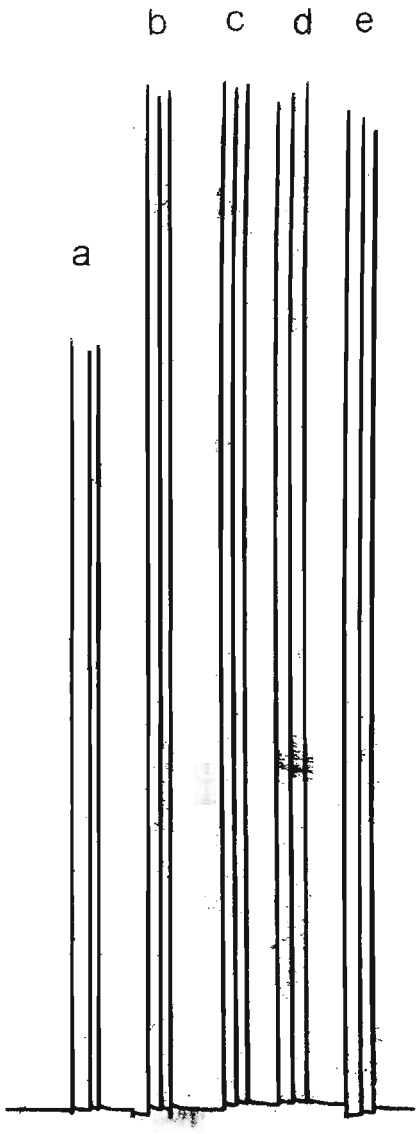

Figura 15.Registros de sinais transientes para avaliação do efeito do volume de amostra injetada: (a) 50, (b) 100, (c) 150, (d) 200 e (e) 250 μL. Condições: solução 0,5 mol L^{-1} de glicose; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente. Escala 1 cm: A = 0,065.

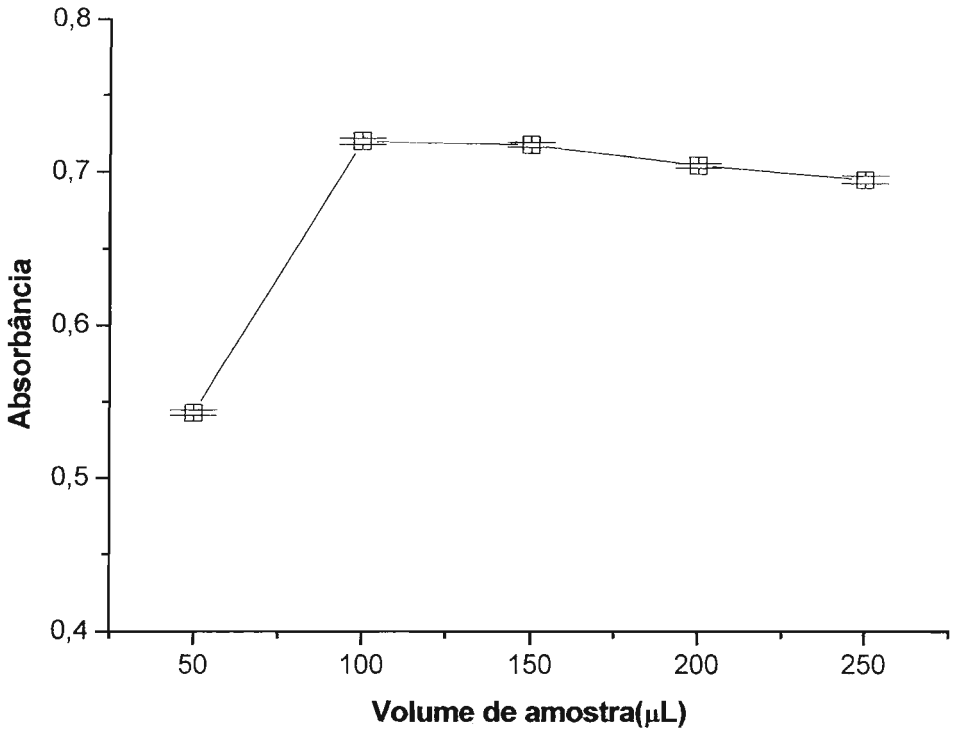

Figura 16. Estudo do volume injetado de amostra (50 a 250µL). Condições: solução 0,5 mol.L^{-1} de glicose; solução de DNS 0,75% (m/v); transportador: água destilada; comprimento de onda 510 nm, vazões 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL/min para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente.

O volume injetado da amostra está relacionado com a dispersão. Na tabela 5 e nas figuras 15 e 16, verifica-se o aumento do sinal até 100 µL. Após 100 µL (20 cm de alça) verifica-se uma leve queda no sinal. O volume de 100 µL foi escolhido para os seguintes estudos levando em conta que fornece bom sinal analítico e possibilita a obtenção das melhores freqüências de amostragem.

d) Estudo da repetitividade

Verifica-se, na figura 17, que os sinais transientes são bem próximos, o método apresenta boa repetitividade, com desvio-padrão relativo menor que 1% (Tabela 3).

Tabela 3. Estudo da repetitividade de 10 amostras de glicose, condições como na figura 16.

Leituras(Absorbância)		
0,987		
0,988		
0,984		
0,972		
0,977		
0,974		
0,971		
0,995	0,980	Média
0,981	0,008	Desvio-padrão
0,972	0,839	Desvio-padrão relativo(%)

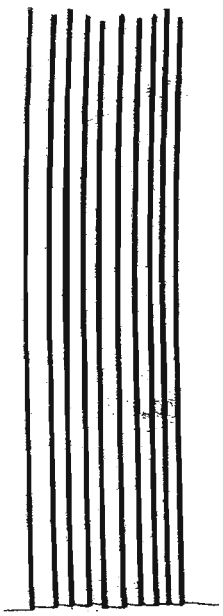

Figura 17.Registros de sinais transientes para obtenção da repetitividade. Condições: solução de glicose 0,50 mol.L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente. Escala 1 cm: 0,063 de absorbância.

e) Curva analítica para glicose

Com os estudos anteriores, determinaram-se os parâmetros de operação adequados para o sistema FIA proposto nesse trabalho. Assim, iniciou-se o estudo quantitativo, com a preparação das curvas analíticas.

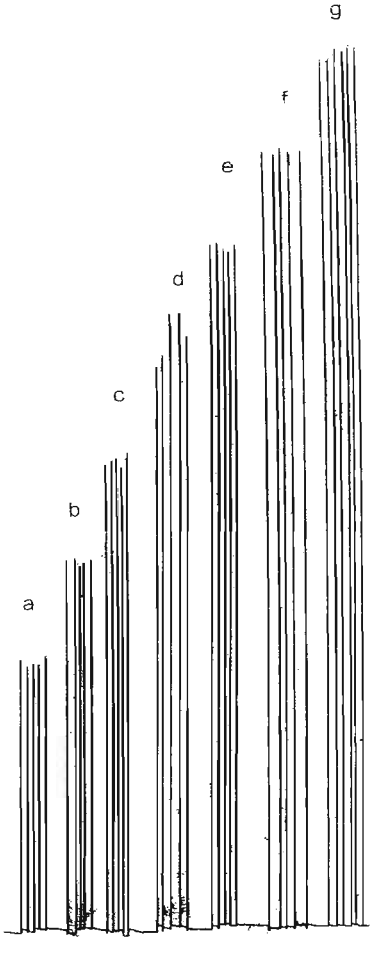

Figura 18.Registros de sinais transientes para obtenção da curva analítica para glicose. Condições: (a) branco (b) solução 30, (c) 60, (d) 90, (e) 120, (f) 150 e (g) 180 g L^{-1} de glicose; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5, respectivamente. Escala 1cm: 0,063 de absorbância.

Tabela 4. Curva de calibração para glicose. Condições experimentais descritas na legenda da figura 17 (média de 5 experimentos).

Glicose g L^{-1}	Média(Absorbância)	D. P.	D.P.relativo(%)
0	0,398	0,006	1,542
30	0,546	0,004	0,662
60	0,692	0,004	0,644
90	0,856	0,028	3,318
120	0,985	0,008	0,782
150	1,133	0,002	0,174
180	1,278	0,007	0,566

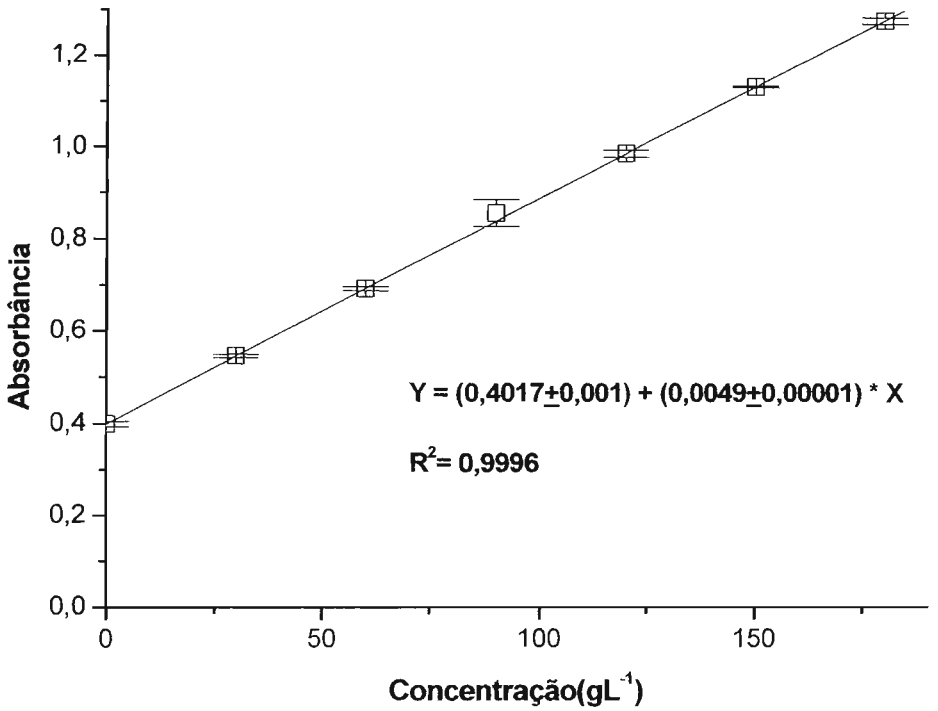

Figura 19.Curva analítica para glicose com a equação linear e coeficientes linear e angular, assim como o coeficiente de correlação, segundo condições citadas na figura 17.

Com os dados da tabela 6, elaborou-se a curva analítica para glicose colocando no gráfico a média das absorbâncias no máximo do pico, em função da respectiva concentração (figuras 18 e 19). Calcularam-se, nesta etapa, os respectivos coeficientes angulares e lineares, assim como o coeficiente de correlação.

f) Estimativa Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação são calculados quando 10 leituras são feitas no branco e calcula-se o desvio-padrão das leituras.

Tabela 5. Estudo do limite de detecção e limite de quantificação. Dez leituras para o branco serão realizadas nas mesmas condições da figura 19, valores em absorbância.

Leituras		
0,399		
0,392		
0,395		
0,396		
0,410		
0,397		
0,394		
0,405		
0,397	0,399	Média
0,404	0,005	Desvio padrão

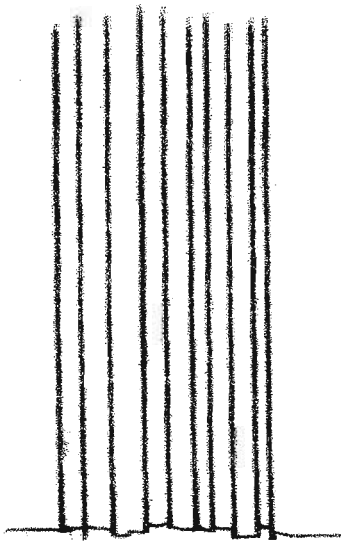

Figura 20 – Registros de sinais transientes de 10 leituras para o branco. Condições: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões de 0,35, 0,35, 0,50 e 0,80 mL min^{-1} para C_1, C_2, R_4 e R_5,respectivamente.Escala:1cm : 0,063 de absorbância.

Usando dados da tabela 5 e os coeficientes da equação da reta, calculam-se o limite de detecção e o limite de quantificação.

- **Cálculo do limite de detecção**:

Equação da reta A = 0,0049 x + 0,4017

LD = [(valor médio da leitura do branco + 3 x desvio padrão do branco) – coeficiente linear] / coeficiente angular da reta

LD = [(0,3989 + 3x0,0056) – 0,4017] / 0,0049 → LD = 2,86 g L^{-1}

a. Cálculo do limite de quantificação:

LQ = [(valor média da leitura do branco + 10 x desvio

Padrão do branco) – coef. linear]/coeficiente angular

LQ = [(0,3989 + 10x0,0056) – 0,4017] /0,0049

LQ = 10,86 g L^{-1}

IV.2.2. Sacarose

O sistema FIA da figura 10 foi empregado para quantificar teores de sacarose em caldo de cana-de-açúcar previamente clarificado. A hidrólise da sacarose ocorre durante o primeiro percurso. No segundo percurso ocorre oxidação dos açúcares redutores totais. Os valores dos teores de sacarose encontrados foram comparados com o método de Lane-Eynon, recomendado pelo MAPA[9].

a) Volume de amostra injetado

Com o aumento do volume de amostra podemos diminuir a dispersão. Na figura 21 observa-se que 150 μL é o volume ideal de amostra a ser usado

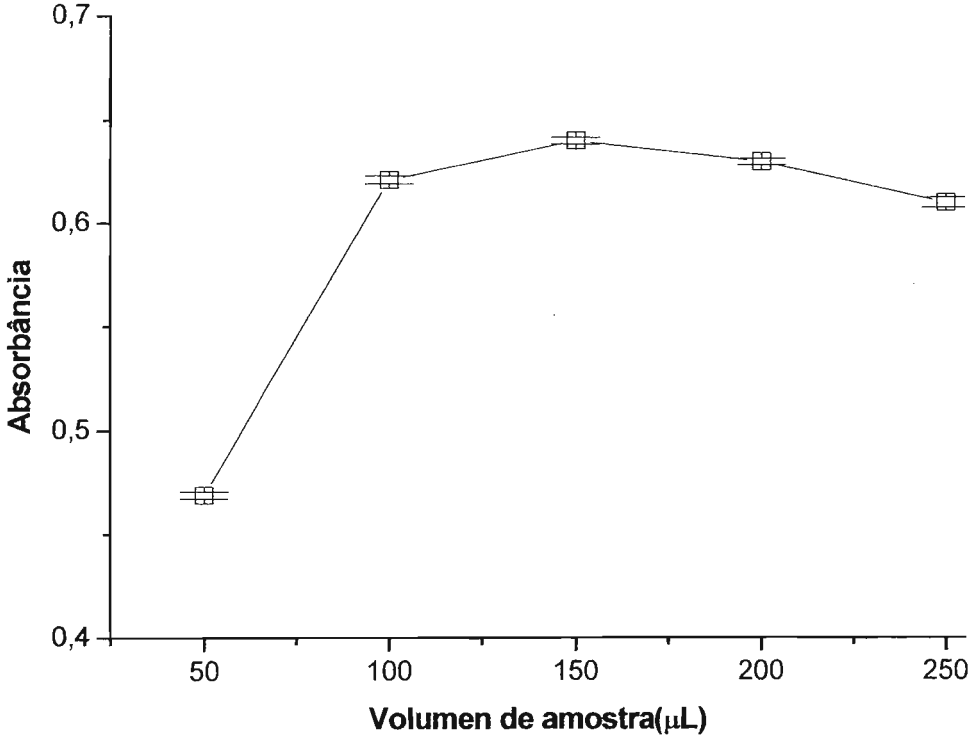

Figura 21.Estudo do volume injetado de amostra (50, 100, 150, 200 e 250 μL) Condições: solução de sacarose 90 g L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água;leitura a 510 nm e vazões em C1, C2, R2, R3, R4 , R5: 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente.

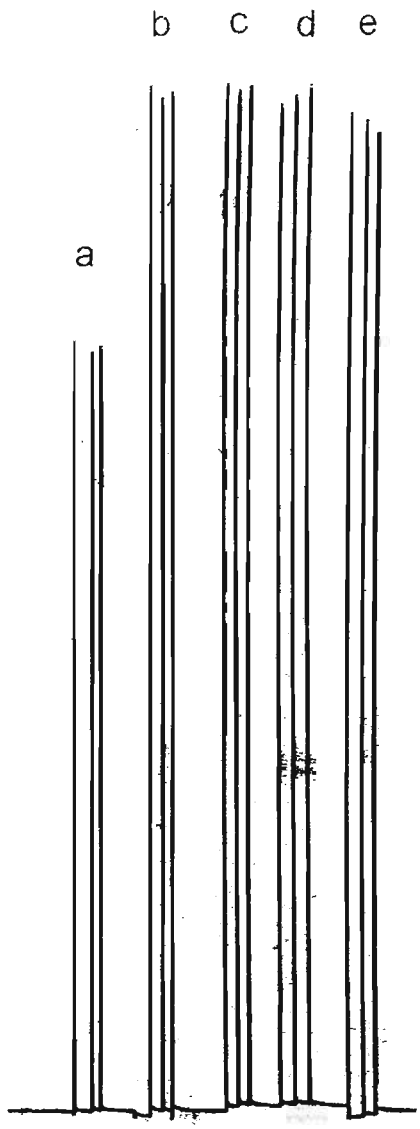

Figura 22. Sinais transientes para o estudo do volume injetado de amostra (50, 100, 150, 200 e 250 μL) Condições: solução de sacarose 90 g L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água; leitura a 510 nm e vazões em C1, C2, R2, R3, R4 , R5: 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente. Escala de 1 cm:0,063 de absorbância.

b) Estudo da repetitividade

Os resultados obtidos mostra uma boa repetitividade do método pois apresenta desvio padrão relativo menor que 1%.

Tabela 6. Estudo da repetitividade de 10 amostras de sacarose, usando as mesmas condições da figura 21, valores em absorbância.

Leituras		
0,877		
0,869		
0,870		
0,867		
0,856		
0,855		
0,860		
0,867	0,865	Média
0,868	0,007	Desvio padrão
0,860	0,802	Desvio padrão relativo

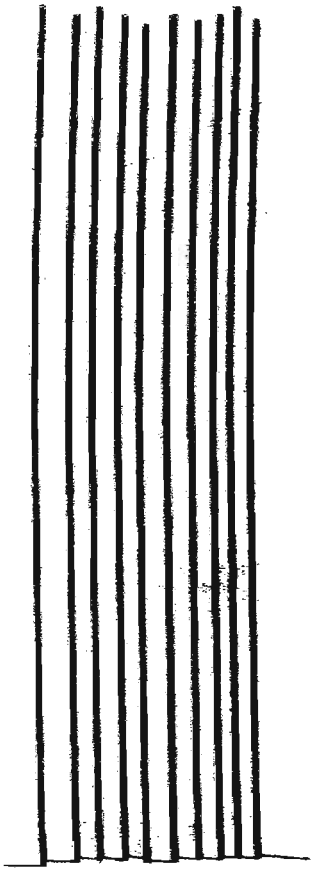

Figura 23.Registros de sinais transientes para a obtenção da repetitividade do método em estudo. Condições: solução de sacarose 90 g L^{-1}; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água; leitura a 510 nm e vazões em C1, C2, R2, R3, R4 , R5: 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente. Escala de 1cm:0,063nm.

c) Freqüência de amostragem

Devido a hidrólise da sacarose ter sido adicionada ao percurso do sistema FIA, a freqüência de amostragem apresentou um valor bem razoável (13 amostras por hora). Após aproximadamente 4 minutos de injetar a primeira amostra (To) outra amostra era injetada, conforme figura 23.

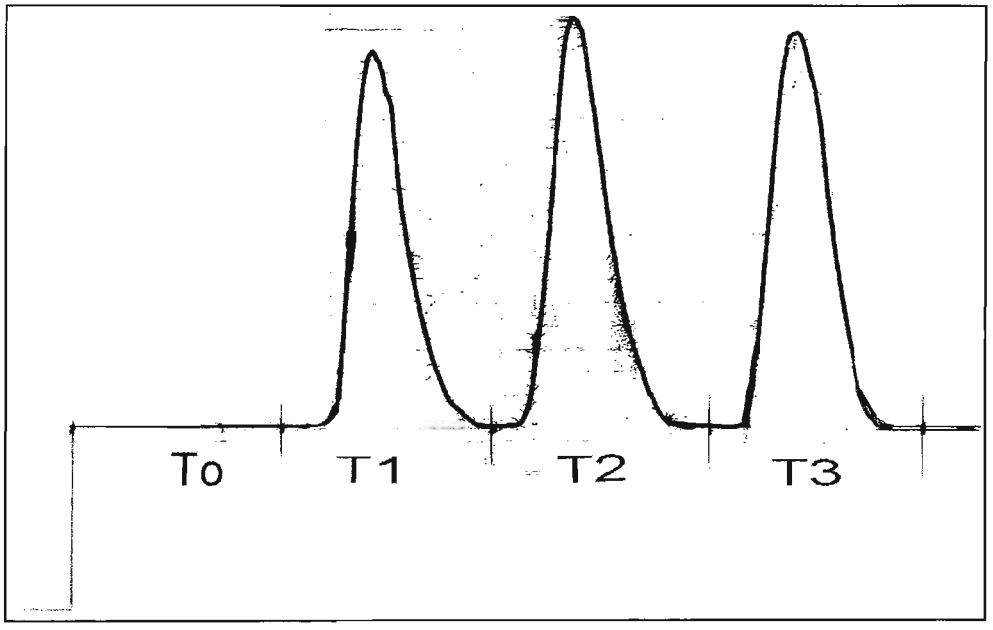

Figura 24. Sinal transiente mostrando a que momento é injetado uma amostra.Os valores de To, T1, T2 e T3 são respectivamente 4'00" ; 4'10" ; 4'10" e 4'12". As condições do ensaio são as mesmas da figura 22.

Na figura 23 observa-se o sinal de três amostras T1=4'10" , T2=4'10" e T3=4'12" , assim a média é igual a 4'11" , ou seja, o tempo médio total de cada análise é de 251 s, o que implica em uma freqüência de amostragem de 14,3 amostras h^{-1}.

d) Curva analítica para sacarose

Aplicando o procedimento descrito no capitulo anterior construiu-se a curva analítica para sacarose na faixa de 30 a 180 g L^{-1}. O registro obtido é apresentado na figura 25.

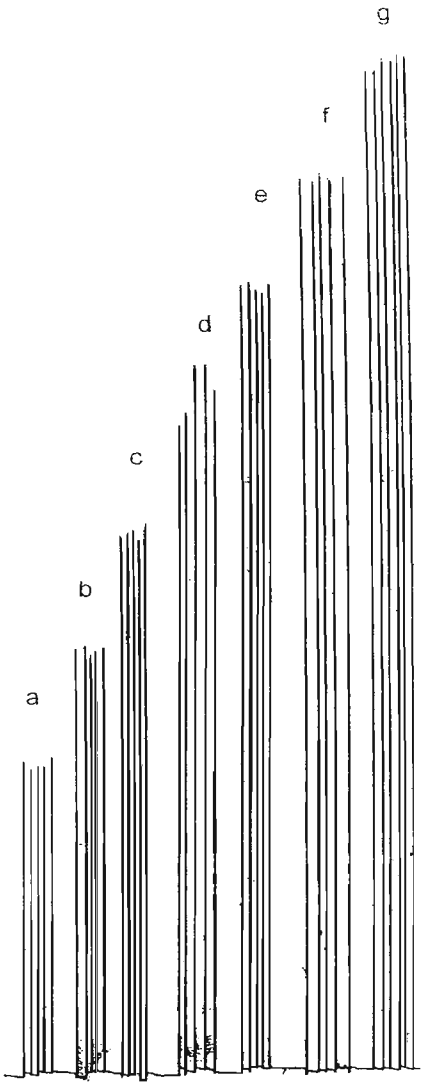

Figura 25.Registros de sinais transientes para obtenção da curva analítica para sacarose. Condições: (a) branco (b) solução 30, (c) 60, (d) 90, (e) 120, (f) 150 e (g) 180 g L^{-1} de sacarose; solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 20 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões em C1, C2, R2, R3, R4, R5: 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente. Escala de 1cm: Absorbância = 0,063

Com base no registro foram calculadas as absorbâncias médias para os máximos do pico. A curva analítica da media das absorbâncias em função da respectiva concentração é apresentada nas figuras 25 e 26. Calcula-se nesta etapa os respectivos coeficientes angulares e lineares, assim como o coeficiente de correlação.

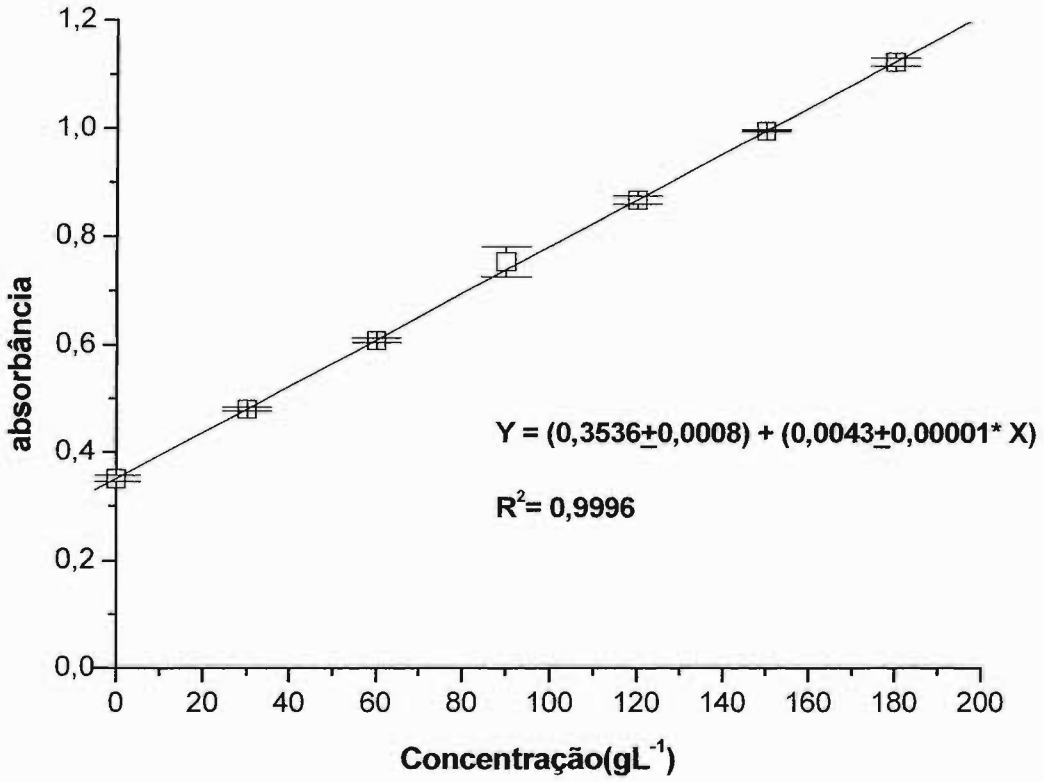

Figura 26. Curva analítica para sacarose construída segundo as condições citadas na figura 25.

Segundo pode-se observar no gráfico os dados apresentam uma boa correlação (R^2= 0,9996) com uma faixa linear de trabalho até 180 gL^{-1} . É importante levar em conta que a absorbância do branco é alta, dado que o DNS absorve no comprimento de onda analítico utilizado.

e) Limite de detecção e limite de qualificação

Para a avaliação do limite de detecção foram realizadas 10 injeções do branco. Conforme mostrado na figura 27, observam-se sinais com absorbância por volta de 0,350, causadas principalmente pelo DNS.

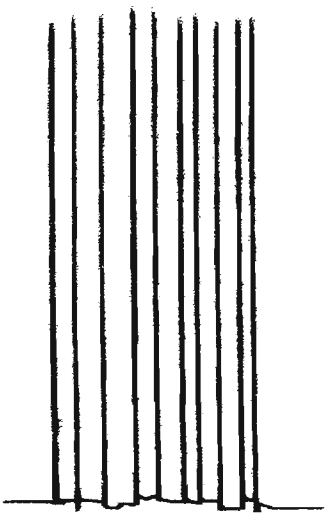

Figura 27. Registros de sinais transientes de 10 leituras para o branco. Condições: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões em C1, C2, R2, R3, R4, R5: 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente. Escala de 1cm:0,063 de absorbância.

Tabela 7. Estimativa do limite de detecção e limite de quantificação. Dez leituras para o branco foram realizadas nas mesmas condições da figura 26, valores em absorbância.

Leituras		
0,350		
0,352		
0,352		
0,354		
0,353		
0,350		
0,353		
0,348		
0,350	0,351	Média
0,351	0,002	Desvio padrão

O limite de detecção e o limite de quantificação são calculas usando os dados da tabela 10 e a equação de calibração da sacarose, figura 25.

- **Cálculo do limite de detecção**:

Equação da reta A = 0,0043 x + 0,3536

LD = [(valor médio da leitura do branco + 3 x desvio padrão do branco) – coeficiente linear] / coeficiente angular da reta

LD = [(0,3513 + 3x0,0018) – 0,3536] / 0,0043 → LD = 0,721 $g.L^{-1}$

- **Cálculo do limite de quantificação:**

LQ = [(valor média da leitura do branco + 10 x desvio

Padrão do branco) – coef. linear]/coeficiente angular

LQ = [(0,3516 + 10x0,0018) – 0,3536] /0,0043 = LQ = 3,721 $g.L^{-1}$

Como o propósito do trabalho é determinar açúcares redutores totais em caldo de cana-de-açúcar, o método é adequado, pois o limite de quantificação situou-se em 3,72 g L^{-1} e o caldo de cana apresenta usualmente concentração entre 130 a 180 g L^{-1}de açúcares redutores totais.

f) Estudo da exatidão do método para a sacarose hidrolisada.

Neste caso, o método usando o reagente DNS em FIA para determinar açúcares redutores totais, soluções com concentrações conhecidas de sacarose foram preparadas a partir da solução estoque e analisadas. As concentrações de sacarose foram 20, 100 e 180 g L^{-1}. Os registros dos sinais transientes são mostrados na figura 28, enquanto os resultados deste estudo encontram-se nas tabelas 8 e 9.

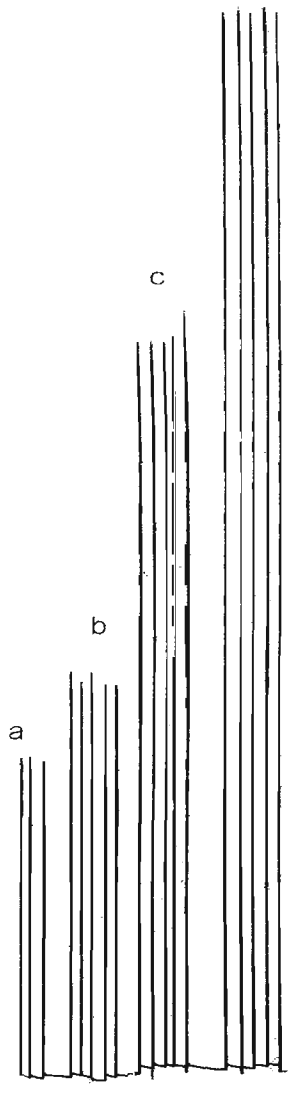

Figura 28 Registros de sinais transientes de três amostras de solução de sacarose previamente hidrolisada (a) branco, (b) 20; (c) 100 e (d) 180 $g.L^{-1}$. Condições: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm; espectrofotômetro em 510 nm e vazões: C1, C2, R2, R3, R4 , R5 respectivamente 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL/min. Escala 1cm:A=0,063

Tabela 8. Determinação da concentração de sacarose, previamente hidrolisada, em 3 amostras de concentração conhecida: 20, 100 e 180 g L^{-1}, com 5 repetições, usando o sistema FIA da Figura 10.

sacarose	Absorbância		
g/L	branco	Média	
20	0,352	0,438	±0,007
100	0,354	0,791	±0,004
180	0,353	1,144	±0,002

Tabela 9. Determinação da concentração de sacarose em 3 amostras de concentração conhecida: 20, 100 e 180 g L^{-1} com 5 repetições, usando o sistema FIA da Figura 10.

sacarose		
g/L	média	
20	20,1	±1,7
100	102,2	±1,0
180	184,3	±0,5

Tabela 10. Comparação de métodos para 3 amostras de concentração conhecida: 20, 100 e 180 g/L com 5 repetições.

sacarose					
g L^{-1}	média	desvio Padrão	Açucares Redutores Totais ($g L^{-1}$)	Sacarose	% Relativa
20	20,09	±1,56	20,09	19,16	95.8
100	102,19	±1,26	102,19	97,08	97.08
180	184,28	±1,80	184,28	175,07	97.26

Segundo se pode observar nos dados apresentados na Tabela 10, obtiveram-se valores bem próximos, por exemplo 19,2; 97,1 e 175,0 g L^{-1} com desvios relativos de 4,4, 2,9 e 2,8%, respectivamente, em relação ao valor esperado. Isso demonstra que o método simples, rápido e de baixo custo pode ser usado com segurança.

IV.2.3. Caldo de cana-de-açúcar

Nesta etapa foram analisadas três amostras de caldo de cana-de-açúcar previamente clarificadas[9], realizando-se 5 repetições com o método FIA usando DNS no sistema esquematizado na figura 10.

Essas mesmas amostras foram analisadas usando o método de Lane-Eynon recomendado pelo MAPA[6]. A figura 29 mostra os sinais transientes obtidos.

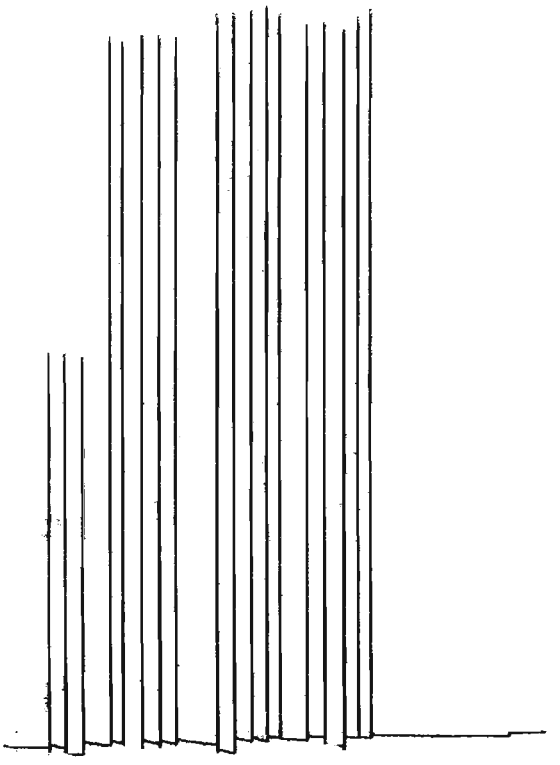

Figura 29. Registros de sinais transientes de três amostras de caldo de cana-de-açúcar previamente clarificado usando figura 10. Condições: solução de DNS 0,75% (m/v); líquido transportador: água destilada; alça de 30 cm; comprimento de onda 510 nm e vazões em C1, C2, R2, R3, R4, R5: 0,40; 0,40; 0,35; 0,35; 0,50 e 0,80 mL min^{-1}, respectivamente. Escala de 1cm: A=0,063.

Tabela 11 Valores em absorbância na determinação de açúcares redutores totais em caldo-de-cana, previamente clarificado, usando sistema FIA da Figura 10, com 5 repetições.

Amostra	Branco	Média	Desvio Padrão
A	0,351	0,634	±0,002
B	0,352	0,658	±0,002
C	0,353	0,647	±0,003

Tabela 12. Cálculo dos valores de açúcares redutores totais, em g L^{-1}, em caldo de cana previamente clarificado, usando sistema FIA da Figura 10, e a equação de regressão da sacarose e fator de diluíção igual 2, com 5 repetições.

Amostra	Média	Desvio Padrão	CV(%)
A	131,34	±0,87	0,75
B	142,51	±0,73	0,54
C	137,39	±1,35	1,83

Como se pode observar, com o método proposto obtiveram-se concentrações de 131,50; 142,50 e 137,42 g L^{-1}, os quais são muito concordantes com os resultados obtidos pelo método de Lane-Eynon, recomendado pelo MAPA[6], cujos valores foram 127,43; 139,22 e 132,92 g L^{-1}, com desvios relativos da ordem de 3,10; 2,30 e 3,27%, respectivamente.

IV.3. Comparação entre Método de Lane-Eynon e Método DNS associado à FIA

A metodologia proposta pelo MAPA para determinação de açúcares redutores totais foi desenvolvida por Lane-Eynon e modificada posteriormente. Essa metodologia baseia-se na reação em batelada com íons cúpricos em temperatura de ebulição. Nesta condições o íon cúprico é reduzido a óxido cuproso e os açúcares redutores totais são oxidados.

Na tabela 15 encontram-se os resultados da análise feita em caldo de cana-de-açúcar pela metodologia proposta pelo MAPA[9].

Tabela 13 Cálculo das concentrações de açúcares redutores totais, em g L^{-1}, em três amostras de caldo-de-cana usando metodologia proposta pelo MAPA.

Amostra	Média	Desvio Padrão	CV
A	127,4	±0,9	0,7
B	139,2	±2,1	1,4
C	132,9	±1,6	1,2

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a viabilidade do sistema FIA para determinações de açúcares redutores totais, assim como facilidade de operação e estabilidade, já que o método proposto após algumas horas de trabalho não demonstrou variação da linha de base. O uso de cela de acrílico revestida com lamínula e uso de bomba de aquário no lugar de bombas peristálticas tornaram o método muito mais atrativo, dado o baixo custo destes componentes, pois o sistema FIA é muito vantajoso por usar pouca quantidade de reagente, contribuindo assim para diminuição da poluição ambiental,

Com relação à precisão do método, testes realizados mostraram desvio-padrão relativos menores que 2%. A exatidão para determinações de açúcares redutores totais foi comprovada após comparação com a metodologia sugerida pelo MAPA, método de Lane-Eynon.

Quanto à freqüência analítica, o método proposto permite análise de 14 amostras por hora, o que é bem superior ao método sugerido pelo MAPA, por volta de 6 amostras por hora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennet, T. P. & Frieden, E. Modern topics in biochemistry structure and function of biological molecules. New York, Macmillan, 1966, 175 p.
2. White, A., Handler, P., Smith, E. L. Principles of biochemistry. New York, McGraw-Hill, 1954. 1070 p.
3. Meade, G. P., Chen, J. C. P. Cane sugar handbook: a manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 10 ed, New York, John Wiley, 1977. 947 p.
4. Hangos-Mahr, M., Pungor, E. Hungrian Academic Science 21 (1982) 307.
5. Hart, F. L., Fisher, H. J. Modern food analysis. New York, Springer-Verlag, 1971, 519 p.
6. Ferreira, C. P. Bioquímica básica. Piracicaba, Editora Unimep,1998. 70 p.
7. Rodella, A. A. Determinação de açucares por entalpimetria de injeção direta. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química/UNICAMP, 1979. 102 p.
8. Stanek, J., Cerny, M., Kocourek, J., Pacak, J. The monosacharides. New York, Academic Press, 1963. 1006 p.
9. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Portaria nº 76, Seção 1 de 26 de Novembro de 1986.
10. Davidson, E. A., Carbohydrate chemistry. Holt, Rinehart , Winston, 1967. 441 p.
11. Dunsmore, A., Mellet, P. Wolff, M. Proceedings of the South African Sugar Technologists Association (1980) 72.
12. Honig, P., Princípios de Tecnologia Azucarera. México, Continental, 1969.
13. Lane, J. H. Journal of the Society of Chemistry Industry 42 (1923) 321-71.
14. Barham, D., Trinder, P. Analyst 97 (1972)142.
15. Jackson, R. F., Mc Donald, E. J. Journal of the Association Official Analytical Chemistry (1942) 988.
16. Somogyi, M. Journal Biological Chemistry 160 (1945) 61.
17. Winton, A. L., Winton, K. B., The analysis of foods. New York-USA, John Wiley, 1945. 999 p.
18. Folin, O. Journal Biological 77 (1928) 421.

19. Porro, M., Viti, S., Antoni, G., Neri, P. Analytical Biochemistry 118 (1981) 301.
20. Mattos, I. L., Zagatto, E. A. G., Jacintho, A. O. Analytica Chimica Acta 214 (1988) 247.
21. Forist, A. A., Speck Jr., J. C. Analytical Chemistry 27 (1955) 1166.
22. Sharma, N. N. Anal. Chim. Acta 14 (1956) 423.
23. Jackson, E. L. Periodic acid oxidation. In: Adams, R., Bachmann, W. E., Fieser, L. F., Johnson, J. R., Snyder, H. R. eds. Organic reactions. 4 ed., New York, John Wiley, 1947. 214 p.
24. Nisli, G., Townshend, A. Talanta 15 (1968) 1377.
25. Honda, S., Sudo, K. , Kakehi, K., Takiura, K. Analytica Chimica Acta 77 (1975) 274.
26. Efstathiou, C. E., Hadjiioannou, T. P. Analytica Chimica Acta 89 (1977) 55
27. Bath, I. H. Analyst 83 (1958) 451.
28. Klein, B., Weissman, M. Analytical Chemistry 25 (5) (1953) 771.
29. Santoro, M. I. R. M., Magalhaes, J. F., Hackmann, E. R. M., Martins, J. L. S. Anais Farmácia e Química 25 (1985) 7.
30. Dreywood, R., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18 (1946) 499.
31. Morris, D. L. Science 107 (1948) 254.
32. Sattler, L., Zerban, F. W. Science 108 (1948) 207.
33. Witthauer, J. Zhurnal Analytical Chemistry 299 (1979) 264.
34. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith. Analytical Chemistry 28 (3) (1956) 350.
35. Frapton, V. L., Foley, L. P., Smith, L. L., Malone, J. G. Analytical Chemistry 23 (9) (1951) 1244.
36. Skell, P. S., Crist, J. G. Nature 173 (1954) 401.
37. Honda, S., Nishimura, Y., Takahashi, M., Chiba, H., Kakehi, K. Analytical Biochemistry 119 (1982) 194.
38. Melo, R. C. Brasil Açucareiro 99 (3) (1982) 164.
39. Koziol, M. J. Analytica Chimica Acta 128 (1981) 195.
40. Summer J. B. Journal of Biological Chemistry 47 (1921) 5
41. Miller, G. L. Analytical Chemistry 31 (3) (1959) 426.
42. Nascimento do Silva R. Monteiro V., Alcanfor J. D'Arc; Assis E.; Asquieri E. Ciência e Tecnologia de Alimentos 23 (2003) 337-341.

43. Nilsson G. S., Andersson M., Ruzgas T., Gorton L. Analytical Biochemistry 265 (1998) 151–156
44. Rodríguez, M. C., Rivas G. A., Analytical Letters, 34 (2001) 1829–1840.
45. Thavarungkul P., Suppapitnarm P., Kanatharana P., Mattiasson B, Biosensors & Bioelectronics 14 (1999) 19–25.
46. Courtin, C.M., Van den Broeck, H., Delcour, J.A., Journal of Chromatography A, 866 (2000) 97–104
47. Si Shi-Hui, Huang Ke-Long, Lu Chang-Yin, Yao Shou-Zhuo, Microchemical Journal, 62(1999) 328–335
48. Ruzicka, J., Hansen, E. H. Flow injection analysis. 2 ed. New York, Interscience, 1988. 498 p.
49. Cienfuegos, F. & Vaitsman, D. Análise instrumental. Rio de Janeiro, Interciência, 2000. 606 p.
50. Ruzicka J., Hansen E. H., Flow Injection Analysis, 2a edição, Wiley, New York, 1988.
51. Karlberg B., Pacey G. E., Flow Injection Analysis - A Practical Guide, Elsevier Science Publishers, New York, 1989
52. Betteridge, D., Ruzicka, J. Talanta 23 (1976) 409-10.
53. Betteridge, D., Courtney, N. G., Sly, T. J., Porter, D. G. Analyst 109 (1984) 91-3.
54. Maquieira, A., Luque de Castro, M. D. Analyst 112 (1987) 1569-72.
55. Zagatto, E. A. G., Mattos, I. L., Jacintho, A. O. Analytica Chimica Acta 204 (1988) 259-70.
56. Ruzicka, J., Hansen, E. H. Analytica Chimica Acta 78 (1978) 145.
57. Hansen, E. H., Ruzicka, J. Rietz, B. Analytica Chimica Acta 89 (1977) 241-54.
58. Yao, T. Analytica Chimica Acta 153 (1983) 175-80.
59. Wieck, H. J., Heider Jr., G. H., Yacynych, A. M. Analytica Chimica Acta 158 (1984) 137-141.
60. Yao, T., Sato, M., Kobayashi, Y., Wasa, T. Analytica Chimica Acta 165 (1984) 291-296.
61. Masoom, M., Townshend, A. Analytica Chimica Acta 171 (1985) 185-94.
62. Moody, G. J., Sanghera, G. S., Thomas, J. D. R. Analyst 111 (1986) 605-9.

63. Kiba, N., Mizuno, T., Furusawa, M. Journal of Chromatography 329 (1986)147-152.
64. Koerner, C. A., Nieman, T. A. Analytical Chemistry 58 (1986) 116-19.
65. Masoon, M., Worsfold, P. J., Analytica Chimica Acta 188 (1986) 281-3.
66. Oliveira A. F., Fatibello-Filho O, Nóbrega J. A. Talanta 55 (2001) 677–684
67. Lopes T.I.M.S., Rangel A.O.S.S., Lima J.L.F.C., Montenegro C.B.S.M., Analytica Chimica Acta 308 (1995) 122-128
68. Mattos, R.C., Sistemas amperométricos empregando matrizes de microeletrodos e análises simultâneas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química/USP, 2001. 140 p.
69. Miller J. C., Miller J. N., Estadística para Química Analítica, 2da Editión, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A: Wilmington, E.U.A.