



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Comparação de Métodos para Determinação de Açúcares Redutores e Não-redutores

Autor: Guilherme Moraes Dornemann

Orientadora: Débora Jung Luvizetto Faccin

Porto Alegre, julho de 16

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Símbolos	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução	1
2 Conceitos Fundamentais	3
2.1 Açúcares redutores e açúcares não-redutores	3
2.2 Refratômetro	4
2.3 Espectrofotômetro	6
2.3.1 Espectrofotometria Somogyi-Nelson	7
2.3.2 Espectrofotometria de fenol-sulfúrico	8
2.3.3 Ácido 3,5-dinitrossalicílico	8
2.4 Titulometria de Lane-Eynon	9
2.5 Cromatógrafo	10
2.5.1 Detector do tipo índice de refração	11
2.5.2 Detector do tipo eletroquímico	11
2.6 Polarímetro	13
2.7 Biossensores	14
3 Revisão Bibliográfica	17
3.1 Refratometria	17
3.2 Espectrofotometria	18
3.2.1 Somogyi-Nelson	18
3.2.2 Fenol-sulfúrico	19
3.2.3 ADNS	20
3.3 Análise titulométrica	21
3.3.1 Lane-Eynon	22
3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência	22
3.4.1 CLAE por Índice de refração	23
3.4.2 Eletroquímico	26
3.5 Polarimetria	27
3.6 Biossensor eletroquímico	28
4 Comparação de métodos	29
4.1 Custo	29
4.2 Aplicabilidade	29
4.3 Limites de quantificação	30

4.4	Tempo de análise	31
4.5	Toxicidade	31
5	Conclusões	32
	Referências Bibliográficas	33

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional nas decisões que tomei em minha vida. Toda conquista é mérito deles.

Agradeço à minha orientadora Débora pelo apoio, dedicação e paciência para a realização deste trabalho.

Agradeço também a todos os professores da UFRGS que contribuíram com minha formação e aos amigos que fiz durante esses anos. Todos estes foram imprescindíveis ao incentivo do aprendizado.

Resumo

Os açúcares estão presentes em praticamente todos os alimentos, podendo ser encontrados na forma de monossacarídeos e polissacarídeos. Atualmente existe uma ampla lista de técnicas e métodos oficiais capazes de determinar a concentração de açúcares redutores, açúcares não redutores e açúcares totais em amostras. Estas técnicas baseiam-se nas diferentes propriedades físicas, químicas ou óticas de cada açúcar para fazer a análise quantitativa. O presente trabalho teve como objetivo descrever os métodos comumente utilizados em laboratórios e na indústria e compará-los perante custo, aplicabilidade dos métodos, limites de quantificação, tempo de análise e toxicidade. A necessidade de hidrólise acarreta longo tempo de análise experimental. A cromatografia de alta eficiência (CLAE) mostrou-se a técnica mais completa para o cumprimento do objetivo proposto, apesar do alto custo que está associado a cromatógrafos. O refratômetro manual apresentou-se como a opção mais barata dentre todas as técnicas analisadas, sendo amplamente aplicado a pequenas produções da vitivinicultura.

Palavras-chave: açúcar, açúcar redutor, refratometria, espectrofotometria, cromatografia, titulometria, polarimetria.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Reação de hidrólise da Sacarose (Adaptado de OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009).....	4
Figura 2.2: Representação do desvio da luz ao trocar entre meios (Adaptado de MSPC, s.d.).....	5
Figura 2.3: Refratômetro BRIX da marca Reed, modelo R9500, para faixa de 0 a 32°Bx (Adaptado de: Reed Instruments, s.d.).....	5
Figura 2.4: Exemplo de leitura da lente de um refratômetro simples, indicando uma solução com 23°Bx (Adaptado de: Grapestompers, s.d.).....	6
Figura 2.5: Componentes de um Espectrofotômetro (Adaptado de GE Healthcare Life Sciences, 2013).....	7
Figura 2.6: Reação de redução do ADNS ao seu análogo nitroamino (VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2013).....	9
Figura 2.7: Reação de redução do reagente de Fehling a óxido cuproso, com oxidação do monossacarídeo a um sal sódico (Adaptado de TAVARES <i>et al.</i> , 2010).....	10
Figura 2.8: Cromatógrafo modelo 850 Professional IC, marca Metrohm, utilizado por Pico <i>et al.</i> (2014) (Adaptado de University of Massachusetts Amherst, s.d.).....	12
Figura 2.9: Detector eletroquímico modelo 945 Professional da marca Metrohm, utilizado por PICO <i>et al.</i> (2014) (Adaptado de Metrohm, s.d.).....	13
Figura 2.10: Diagrama esquemático mostrando os principais componentes de um biossensor.....	15
Figura 2.11: Reação de oxidação da glicose catalisada pela enzima GOx.....	16
Figura 3.1: Soluções analisadas por MALDONADE <i>et al.</i> , 2013a (Adaptado de MALDONADE <i>et al.</i> , 2013a).....	19
Figura 3.2: Espectrofotômetro modelo UVmini-1240 – Shimadzu (Adaptado de Shimadzu, n.d.).....	20
Figura 3.3: Soluções analisadas por MALDONADE <i>et al.</i> , 2013b (Adaptado de MALDONADE <i>et al.</i> , 2013b).....	21
Figura 3.4: Cromatogramas de solução padrão de frutose, glicose e sacarose a 0,25g/L (a); néctar de uva (b) e suco concentrado de uva (c), por CLAE-IR. Picos: (1) Frutose; (2) Glicose e (3) Sacarose (Adaptado de CALDAS <i>et al.</i> , 2015).....	24
Figura 3.5: Cromatogramas da solução-padrão (a) e da amostra de vinho (b) explicitando sacarose (1), glicose (2) e frutose (3) (Adaptado de CORRÊA <i>et al.</i> , 2013).....	25
Figura 3.6: Cromatogramas da amostra de suco de uva (c) e da amostra de mosto (d), explicitando sacarose (1), glicose (2) e frutose (3) (Adaptado de CORRÊA <i>et al.</i> , 2013).....	26

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Valores de rotação específica de açúcares. 14

Lista de Símbolos

α	rotação específica
n_{21}	índice de refração do meio 2 em relação ao meio 1
θ_1	ângulo de incidência
θ_2	ângulo de refração

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANDS	ácido 3,5-dinitrossalicílico
ANR	açúcares não-redutores
AR	açúcares redutores
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
FS	fenol-sulfúrico
GOx	glicose-oxidase
IR	índice de refração
LE	Lane-Eynon
RMN	ressonância magnética nuclear
SN	Somogyi-Nelson
UV	ultravioleta

1 Introdução

A indústria alimentícia é um mercado competitivo no qual padrões de qualidade devem ser atingidos a fim de se obterem propriedades desejadas nos produtos e garantir satisfação aos consumidores. Em muitas situações, a determinação da concentração de açúcares é um indicador de características do produto final que será distribuído ao mercado. Em processos de fermentação, o acompanhamento de açúcares permite verificar as taxas de consumo pelos microrganismos e, assim, estudar a cinética do processo. Na área da saúde, existem disfunções do organismo humano que são influenciadas pela concentração de açúcares no sangue, como a diabetes. No ramo da engenharia de tecidos, onde ocorre a produção de fibras artificiais, a glicose é o principal metabólito envolvido no crescimento celular. As diversas necessidades de detecção de açúcares indicam a importância dos sensores em âmbitos dentro e fora de indústrias.

O fato de os açúcares possuírem diferentes poderes de dulçor influencia diretamente no sabor e no aroma dos produtos. O conhecimento da composição dos açúcares em uma solução (tipo e concentração) possibilita determinar o melhor momento para o uso de uvas na produção de sucos, néctares e vinhos, dentre outros produtos alimentícios, e auxilia no controle de qualidade que é imposto pela legislação, que muitas vezes limita concentrações de sacarose, e também desmascara qualquer produto adulterado, que deveria originalmente conter somente açúcares naturalmente presentes, mas que talvez possa ter sofrido adição de sacarose e posteriormente ter sido rotulado como livre de adição deste açúcar.

Os açúcares são edulcorantes, ou seja, aditivos alimentares, que geralmente são utilizados devido à sua propriedade organoléptica de doçura. Esta propriedade é subjetiva e intrínseca aos açúcares. A ingestão de açúcares sacia a fome e implica um consumo energético. O excesso no consumo destes causa, dentre diversos problemas, aceleração no metabolismo animal em relação à produção de insulina e aumento de massa corporal.

Segundo SILVA *et al.* (2003), os métodos mais comumente utilizados para medição de açúcares são a refratometria em escala Brix (método refratométrico), Somogyi-Nelson, fenol-sulfúrico (métodos espectrofotométricos) e Lane-Eynon

(método titulométrico também conhecido como reação de Fehling). Estes métodos são utilizados basicamente em indústrias alimentícias. Além disso, Steiner *et al.* (2011) destacam a utilização de métodos óticos e sensores eletroquímicos, focados no âmbito da saúde humana.

Este trabalho visa descrever as principais metodologias utilizadas na determinação de açúcares na indústria alimentícia e compará-los utilizando parâmetros como o custo envolvido, aplicabilidade dos métodos, limites de quantificação, tempo de análise e toxicidade humana envolvida, considerando trabalhos já realizados e métodos oficiais existentes, a fim de esclarecer as melhores técnicas para situações específicas.

2 Conceitos Fundamentais

Neste capítulo são apresentadas definições importantes para a compreensão dos métodos aplicados à medição de açúcares, desde a parte inicial do processo, envolvendo a amostra, até a recepção da informação e sua interpretação. Além disso, são definidos conceitos de química orgânica envolvidos nos processos.

2.1 Açúcares redutores e açúcares não-redutores

Existem açúcares que possuem grupos carbonílico e cetônico livres, que são capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes, em soluções alcalinas. Estes são os açúcares redutores (AR), que são monossacarídeos, como a glicose e a frutose, e alguns dissacarídeos, como a maltose (formada por glicose) e a lactose (formada por galactose e glicose). As funções cetônicas e aldeídicas livres possibilitam a redução de íons catiônicos, como o Cobre e o Ferro (DEMIATE *et al.*, 2002).

Os açúcares não-redutores (ANR) precisam sofrer hidrólise da ligação glicosídica para oxidar. Um exemplo é a sacarose, que é formada pela ligação entre o grupo funcional aldeídico de uma molécula de glicose e o grupo funcional cetônico de uma molécula de frutose. A hidrólise de açúcares não-redutores é geralmente feita com ácido forte ou com o uso de enzimas (como a invertase, no caso da sacarose). A reação citada pode ser vista na Figura 2.1 (DEMIATE *et al.*, 2002).

Os açúcares não-redutores podem ser quantificados pelas mesmas metodologias que os açúcares redutores, desde que primeiramente seja feita hidrólise, que pode ser química ou enzimática, para tornar os ANR em AR. Existem técnicas que necessitam da hidrólise para quantificar os dois tipos de açúcares, enquanto a cromatográfica é capaz de quantificar todos os tipos de açúcares sem hidrólise prévia, conforme será descrito na Revisão Bibliográfica.

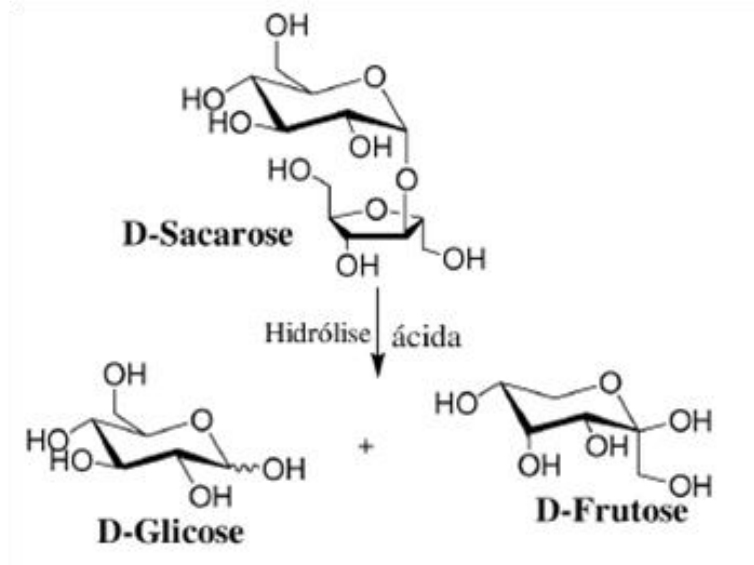


Figura 2.1: Reação de hidrólise da Sacarose (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2009).

2.2 Refratômetro

Refração é a mudança da direção de um feixe de luz ao trocar de meio. Nesse caso, a passagem do ambiente para a solução líquida. Essa mudança é medida em graus, para a determinação do ângulo de refração. Utiliza-se um aparelho denominado refratômetro para tal função. O refratômetro mede este desvio e retorna um valor de índice de refração, que é comparado com um padrão, previamente calibrado (CALDAS *et al.*, 2015). A Figura 2.2 ilustra como a luz desvia ao trocar de fase, resultando no princípio utilizado pela refratometria. O ângulo de incidência é representado por θ_1 e o ângulo de refração é θ_2 . O índice de refração do meio 2 em relação ao meio 1, n_{21} , é calculado pela Equação 2.1:

$$n_{21} = \frac{\text{sen } \theta_1}{\text{sen } \theta_2} \quad \text{Eq. (2.1)}$$

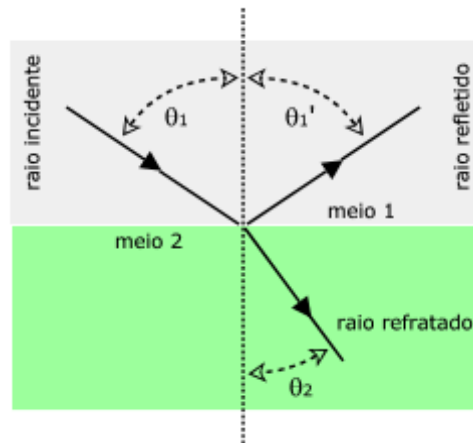


Figura 2.2: Representação do desvio da luz ao trocar entre meios (Adaptado de MSPC, s.d.).

A unidade utilizada é o grau Brix ($^{\circ}\text{Bx}$). A medida de 1°Bx representa 1g de compostos solúveis totais a cada 100g de solução. Assim sendo, uma solução de 100g de água e sacarose, contendo 20g de sacarose, é uma solução de 20°Bx . A medida do índice de refração de uma solução varia com a sua concentração.

A Figura 2.3 mostra a imagem de um refratômetro manual, da marca Reed, utilizado em indústrias de menor porte, como cervejarias artesanais e produções de mel, hidromel e sucos. Este equipamento pode ser facilmente encontrado à venda *online*, e no Brasil os preços variam entre R\$ 100,00 e R\$ 300,00, dependendo do produto e da faixa de concentração de açúcar de trabalho.



Figura 2.3: Refratômetro BRIX da marca Reed, modelo R9500, para faixa de 0 a 32°Bx (Adaptado de: Reed Instruments, s.d.).

O uso deste modelo envolve a inserção da amostra com uma pipeta e a observação da escala grau Brix pela peça ocular (lente). A resposta é dada

instantaneamente, e a Figura 2.4 mostra um exemplo de medição, com resposta de 23°Bx.



Figura 2.4: Exemplo de leitura da lente de um refratômetro simples, indicando uma solução com 23°Bx (Adaptado de: Grapestompers, s.d.).

2.3 Espectrofotômetro

O espectrofotômetro é um equipamento que permite comparar a intensidade da luz transmitida através de uma amostra com a intensidade da luz absorvida por esta amostra, que contém um soluto que se deseja quantificar. Todas as substâncias são capazes de absorver energia radiante (SKOOG, HOLLER E CROUCH, 2006).

O aparelho de espectrofotometria é composto por cinco partes essenciais:

- fonte de Radiação;
- monocromador;
- compartimento para Amostras;
- detector de Sinal;
- processador de Sinal.

A fonte de radiação é uma lâmpada que emite luz. O monocromador é um prisma que funciona como uma rede de difração, nos comprimentos de onda que compõem a luz emitida. É selecionado um comprimento de onda adequado aos componentes

estudados. A solução, que está presente em uma cubeta no compartimento para amostras, recebe o feixe de luz monocromática. Uma fração do feixe de luz é absorvida e outra fração é refletida. O detector de sinal é uma célula fotoelétrica que detecta a redução da intensidade luminosa consequente da diferença entre absorção e reflexão. Este detector identifica a intensidade da luz para gerar um sinal elétrico de saída. Este sinal elétrico é amplificado e processado por um computador, que retorna o valor referente de absorbância, sendo este proporcional à concentração dos componentes absorventes que estão presentes na solução na cubeta (SKOOG, HOLLER E CROUCH, 2006).

A Figura 2.5 apresenta a estrutura esquemática de um espectrofotômetro como descrito acima.

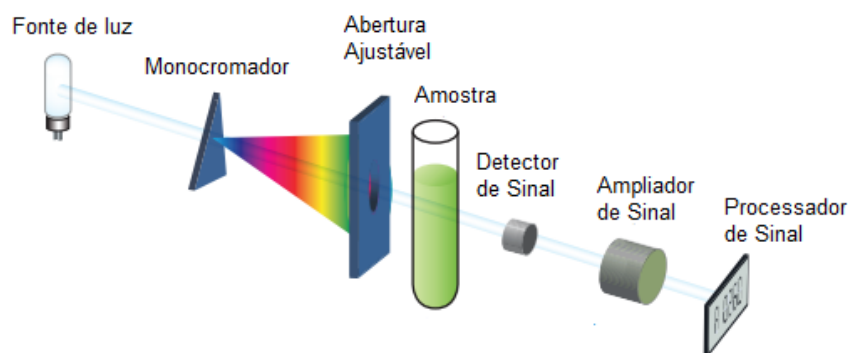


Figura 2.5: Componentes de um Espectrofotômetro (Adaptado de GE Healthcare Life Sciences, 2013).

Dentro do âmbito da análise de açúcares, as técnicas que fazem uso do espectrofotômetro variam basicamente no modo de obtenção da solução a ser analisada pelo equipamento, ou seja, no preparo da amostra que se deseja estudar a concentração de açúcares.

2.3.1 Espectrofotometria Somogyi-Nelson

A técnica Somogyi-Nelson (SN) é aplicada para preparar amostras e analisá-las em espectrofotômetros. A determinação é feita através da absorbância de um complexo colorido formado entre um açúcar, cobre oxidado e arsênio-molíbdoco, conforme WROLSTAD *et al.* (2005). Pelo Protocolo brasileiro vigente, de MALDONADE *et al.* (2013a), ao aquecer a solução com presença de íon cúprico

(Cu⁺⁺), em meio alcalino, os açúcares redutores transformam-se em enodiois e estes reduzem o íon cúprico a cuproso (Cu⁺) na forma de Cu₂O. Este último reduz o molibdato de arsênio presente na solução a óxido de molibdênio, que possui coloração azul característica e pode ser quantificado por espectrofotometria. WROLSTAD *et al.* (2005), SILVA *et al.* (2003) e MALDONADE *et al.* (2013a) indicam que, para cada um de seus experimentos, a leitura da absorbância deve ser feita a 500 nm, 510 nm e 540 nm, respectivamente, pois foram escolhidos como os melhores valores para a medição. A presença de outras substâncias redutoras ou oxidantes (como o oxigênio do ar) afetará a absorbância medida. Sulfato de sódio é adicionado durante o processo para controlar a ação oxidante do ar sobre o óxido cuproso.

2.3.2 *Espectrofotometria de fenol-sulfúrico*

O método do Fenol-sulfúrico (FS) resume-se à desidratação dos açúcares em meio ácido concentrado e posterior formação de complexo dos mesmos com fenol. Segundo Dubois *et al.* (1956) e Demiate *et al.* (2002), açúcares simples ou complexos, e seus derivados, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, tornam a solução amarelo-alaranjada, mantendo esta coloração estável. A amostra colorida é colocada em espectrofotômetro e comparada com referencial, a fim de apresentar o valor de absorbância da solução, que é linearmente proporcional à concentração de açúcares totais.

2.3.3 *Ácido 3,5-dinitrossalicílico*

O ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) é um composto amarelado em solução que pode ser reduzido por açúcares redutores a um composto nitroamino análogo, ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, que possui coloração avermelhada, ao mesmo tempo em que os AR são oxidados. Este composto, assim como o ADNS, é aromático, mas absorve luz facilmente e, assim, é possível estabelecer uma relação direta entre a quantidade de açúcares redutores presente na solução com a medida colorimétrica realizada em espectrofotômetro (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

O método consiste em aquecer a mistura entre amostra e ADNS em um meio alcalino (hidróxido de sódio em excesso). A Figura 2.6 apresenta a reação de redução do composto amarelado ao composto avermelhado. Os reagentes

necessários são o Sal de Rochelle (solução de tartarato de sódio e potássio), que evita a oxidação do reagente por parte do oxigênio dissolvido; fenol, que aumenta a coloração da solução final; metabissulfito de sódio, que serve como estabilizante para a coloração; e hidróxido de sódio, que auxilia na redução do ANDS, causada pelo açúcar redutor (MALDONADE *et al.*, 2013b).

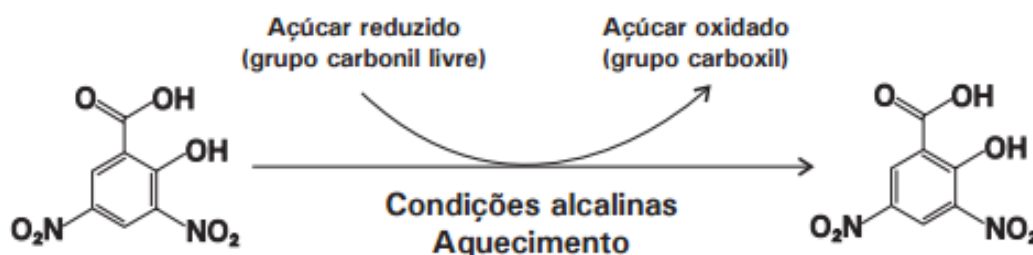


Figura 2.6: Reação de redução do ADNS ao seu análogo nitroamino (Vasconcelos *et al.*, 2013).

2.4 Titulometria de Lane-Eynon

A titulometria baseia-se na quantidade de um reagente de concentração conhecida que é consumido por um analito, levando em consideração a estequiometria de reação envolvida. O método de Lane-Eynon, também conhecido como Método de Fehling, consiste na redução completa dos íons cúpricos do reagente de Fehling (uma solução de ácido tartárico com cobre alcalino) a óxido cuproso, causada pelos açúcares redutores. Esta reação forma um precipitado vermelho de óxido cuproso. A solução inicial é azul, devido ao óxido cúprico, e a amostra é gotejada em titulação até que a solução adquira coloração vermelho-tijolo. A leitura do ponto final da titulação é relativamente grosseira e depende da sensibilidade e da prática do analista. A Figura 2.7 representa a reação de formação do óxido cuproso, de cor avermelhada, que precipita após sua geração. Nesta reação, o tartarato de sódio e potássio forma um sal com Cu^{2+} , de coloração azul anil, que sofre redução e resulta em óxido cuproso, de coloração avermelhada. O monossacarídeo é oxidado e isto resulta em um sal sódico (TAVARES *et al.*, 2010).

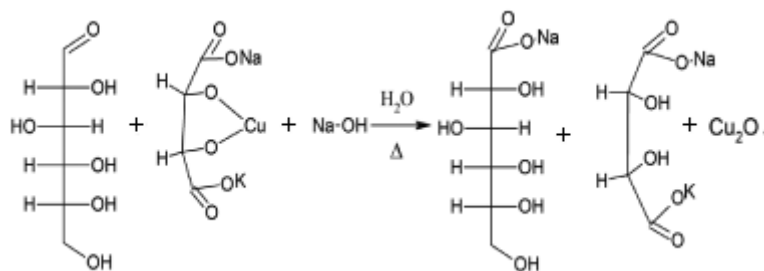


Figura 2.7: Reação de redução do reagente de Fehling a óxido cuproso, com oxidação do monossacarídeo a um sal sódico (Adaptado de Tavares *et al.*, 2010).

2.5 Cromatógrafo

Carboidratos são separados com base nas suas diferentes características de adsorção quando a solução a ser analisada passa por uma coluna. Dependendo do tipo da coluna que é utilizada, os açúcares podem ser separados baseados em propriedades como coeficiente de partição, polaridade, tamanho de molécula, entre outros. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é comumente utilizada em conjunção com Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou com espectrometria de massa para identificar as moléculas que ocasionam picos nos cromatogramas e espectros.

No instrumento cromatógrafo, a amostra flui por uma coluna através de uma fase estacionária, por intermédio de uma fase móvel. Os solutos possuem diferentes afinidades com a fase estacionária, e por isso eles se distribuem entre as duas fases. As substâncias com maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente na coluna, e as substâncias com menor afinidade movem-se com maior velocidade. Com o passar do tempo, ao sair da coluna, os açúcares passam por um detector, que emite um sinal, registrado em um cromatograma. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é o método cromatográfico geralmente utilizado na indústria alimentícia, pois ele é utilizado em análises de compostos não-voláteis, ou seja, quando a cromatografia gasosa não é aplicada (SKOOG, HOLLER E CROUCH, 2006).

O cromatógrafo a líquido é constituído basicamente de cinco componentes:

- reservatório e Sistema de Bombeamento da Fase Móvel;
- sistema de Introdução da Amostra;

- coluna Cromatográfica (Sistema analítico);
- detector de Sinal;
- processador de Sinal.

Conforme ARGENTON (2010), a fase móvel é bombeada em direção à coluna cromatográfica e à montante da entrada da coluna é feita a injeção de amostra no sistema. A mistura entre amostra e fase móvel passa pela coluna, que contém a fase estacionária, e na saída da coluna está conectado um detector. Existem diversos detectores de sinal e a escolha do detector mais adequado vai das características químicas e físicas dos componentes analisados. Os mais comuns na determinação de açúcares são baseados em índice de refração (CALDAS *et al.*, 2015), eletroquímica (OLIVEIRA *et al.*, 2010), ultravioleta (UV), UV-visível e ressonância magnética nuclear – RMN (QUEIROZ e HOSTETTMANN, 2006).

A quantificação é feita baseando-se nas curvas de calibração de soluções-padrão, construída a partir de picos cromatográficos. A área sob cada pico é proporcional à concentração do componente em questão. Para determinação de açúcares totais, é possível simplesmente considerar a soma das áreas individuais de cada pico da corrida cromatográfica.

2.5.1 *Detector do tipo índice de refração*

O detector mede o índice de refração (IR) da solução que passa por ele ao sair da coluna. A variação do índice de refração indica a passagem de analito pelo detector. Essa diferença em relação ao valor de índice de refração da fase móvel é detectada. Para isso, o IR do componente analisado deve ser diferente do IR da fase móvel. A temperatura precisa ser controlada, pois o IR varia com a variação da temperatura. (ARGENTON, 2010).

2.5.2 *Detector do tipo eletroquímico*

Também conhecido como detector amperímetro, este modelo de detector é baseado na oxidação e redução de alguns compostos quando submetidos a um potencial elétrico. Utiliza-se um par de eletrodos para aplicar a diferença de potencial elevado o suficiente para provocar uma reação de oxidação ou redução, que gera

uma corrente, e esta corrente é medida pelo detector eletroquímico. A corrente gerada é proporcional à concentração do componente. É um dos melhores detectores em termos de quantidade mínima detectada, podendo medir massas na faixa de fentograma (SKOOG, HOLLER E CROUCH, 2006).

PICO *et al.* (2014) quantificaram glicose, isomaltose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentose por CLAE com detector eletroquímico. O trabalho será discutido no subcapítulo 3.4.2. O equipamento de CLAE utilizado por e o detector eletroquímico que fica acoplado a ele encontram-se representados nas figuras Figura 2.8 e Figura 2.9, respectivamente.



Figura 2.8: Cromatógrafo modelo 850 Professional IC, marca Metrohm, utilizado por Pico *et al.* (2014) (Adaptado de University of Massachusetts Amherst, s.d.).



Figura 2.9: Detector eletroquímico modelo 945 Professional da marca Metrohm, utilizado por PICO et al. (2014) (Adaptado de Metrohm, s.d.).

2.6 Polarímetro

Os açúcares são moléculas quirais, ou seja, possuem um átomo de carbono assimétrico, ligado a quatro grupos diferentes. Quando um feixe de luz polarizada incide sobre uma substância quiral, o plano de polarização da luz é rotacionado. O grau de rotação molecular é uma propriedade físico-química de cada molécula, e é capaz de alterar propriedades organolépticas de uma solução. O polarímetro é um instrumento ótico capaz de medir o grau de rotação molecular.

A rotação específica é denominada de α . A mistura entre sacarose, glicose e frutose é conhecida como açúcar invertido e é originada da hidrólise da sacarose, também chamada de inversão. O açúcar invertido é muito mais doce do que a sacarose em si. Os valores de α para cada um destes açúcares são mostrados na Tabela 2.1 **Error! Reference source not found.** Percebe-se que a sacarose e a glicose são dextrógiras, desviando o feixe de luz para a direita, enquanto a frutose é levógira, desviando o feixe de luz para a esquerda. Observa-se também que a frutose é muito mais levógira dos que os outros dois açúcares são dextrógiros e é por isso que as propriedades organolépticas (principalmente a doçura) da mistura de açúcar invertido variam de acordo com a concentração dos açúcares.

Açúcar	Rotação Específica (α)
Sacarose	+66,5°
Glicose	+52,5°
Frutose	-92,5°

Tabela 2.1: Valores de rotação específica de açúcares.

2.7 Biossensores

De acordo com WANG (2005), biossensores são dispositivos analíticos que possuem uma biocamada, um transdutor elétrico, elementos para acondicionamento e um processador de sinal elétrico. Estes dispositivos possuem na biocamada uma substância, como uma enzima ou anticorpo, que possibilita a medição seletiva de outra substância. Assim sendo, o biossensor não monitora exatamente a substância química a ser medida, ele monitora o efeito produzido pela interação entre substância a ser medida e a biocamada. O biossensor produz um sinal elétrico, que é proporcional à concentração do componente que está sendo analisado. Estes dispositivos podem atuar tanto na indústria de alimentos, focando na garantia da segurança alimentar e análise de contaminantes, quanto no setor da saúde, principalmente na medida de glicose no sangue humano, e no controle do meio ambiente, como na quantificação de toxinas em água e pesticidas agrícolas. Na indústria alimentícia eles também são utilizados para acompanhar fermentações, como foi feito por DAUDT e SIMON (2001) na vitivinicultura para medir concentrações de açúcares redutores durante a maturação de uvas tintas de modo rápido e prático.

Conforme FURTADO *et al.* (2008), a natureza do biossensor depende do material biológico que é imobilizado na superfície do sensor e das propriedades da amostra analisada. Existem sensores eletroquímicos (que funcionam por movimento de íons, ou por difusão de espécies eletroativas), óticos (mudança de temperatura), piezoelétricos (variação de massa) e termométricos (emissão ou absorção de energia eletromagnética). Os mais populares são os eletroquímicos, que são os modelos aplicados no monitoramento da glicose sanguínea.

O biossensor possui quatro componentes básicos:

- amostra;
- biorreceptor;
- transdutor;
- processador de dados.

A amostra contendo a substância a ser quantificada, ao entrar em contato com o biorreceptor, sofre uma alteração físico-química dependente da interação seletiva entre o composto e a biocamada. Esta variação é identificada pelo transdutor elétrico. Este sinal é adquirido e então processado. A principal aplicação de biossensor no âmbito dos açúcares é na determinação de glicose. Para isso, o biossensor é do tipo amperométrico e o biorreceptor é a enzima glicose-oxidase (GOx), que catalisa a quebra da glicose, causando a oxidação da mesma. A Figura 2.10 resume um biossensor e suas principais partes.

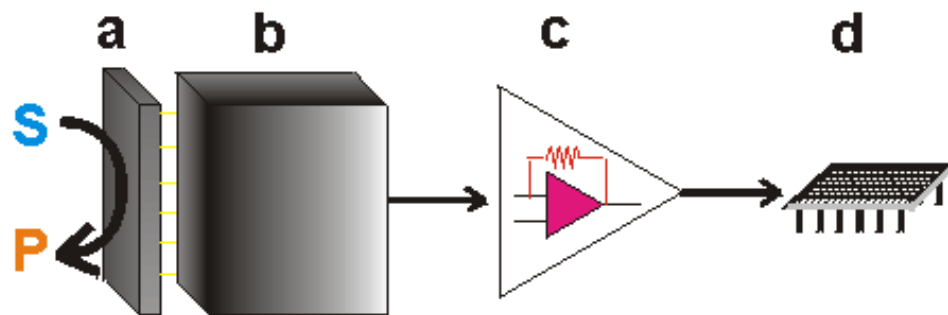


Figura 2.10: Diagrama esquemático mostrando os principais componentes de um biossensor. Sendo: Substrato (S); Produto (P); Elemento biológico (a); Transdutor (b); Amplificador de sinal (c); e processador de sinal (d).

Considerando o funcionamento de um biossensor eletroquímico aplicado à determinação da concentração de glicose em uma amostra de sangue, a glicose da amostra reage com a enzima GOx, formando ácido glucônico, que logo reage com a camada de ferricianeto de potássio presente no sensor. Esta reação produz ferrocianeto de potássio. Este sal reage com os metais dos eletrodos do biossensor, provocando uma corrente elétrica, que flui através dos eletrodos. Esta corrente é medida e convertida em valores de concentração de glicose. Quanto maior a

corrente, maior será a concentração de glicose na amostra de sangue. O tempo de análise pelos medidores de glicose comerciais leva menos de trinta segundos. A Figura 2.11 apresenta a reação de oxidação da glicose, que dá origem ao ácido glucônico do sistema.

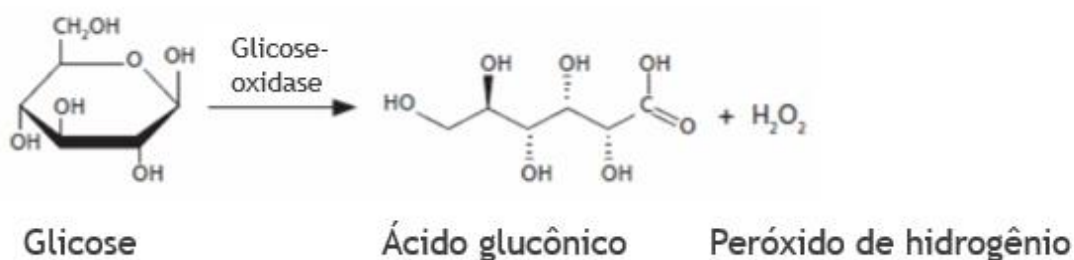


Figura 2.11: Reação de oxidação da glicose catalisada pela enzima GOx.

O sensor amperométrico é um tipo de biossensor eletroquímico baseado na medida de corrente elétrica que é resultante de reação redox (oxidação ou redução) de componentes eletroativos. O potencial elétrico é mantido constante durante a análise e as possíveis alterações na corrente são oriundas das espécies eletroativas presentes na biocamada que contém o elemento biológico. (FURTADO et al., 2008)

No âmbito clínico, o mais comum são aparelhos que medem a corrente gerada pela reação do ácido glucônico (proveniente da oxidação da glicose) com uma camada de ferricianeto de potássio, resultando em ferrocianeto de potássio. Este sal, entre dois eletrodos, provoca corrente elétrica, que é medida. Quanto maior a concentração de glicose na amostra, mais ácido glucônico é produzido, mais ferrocianeto de potássio é formado, aumentando a corrente elétrica. Este método é o mais empregado em medidores de glicose sanguínea, utilizados diariamente para monitorar a glicemia em pacientes diabéticos e auxiliar no controle desta doença.

3 Revisão Bibliográfica

As técnicas destacadas no presente trabalho baseiam-se em diferentes princípios químicos e físicos. A revisão bibliográfica classifica artigos e trabalhos já realizados pelos diferentes fundamentos envolvidos, como o índice de refração molecular e a banda de absorção no espectro ultravioleta (UV). O início do estudo da determinação de açúcares, ainda que qualitativamente, é datado em artigos da primeira metade do século XX, e há técnicas que praticamente não foram modificadas desde seus registros.

3.1 Refratometria

Esta é a técnica mais difundida e aplicada no controle industrial na determinação quantitativa e qualitativa de açúcares, segundo CALDAS *et al.* (2015). É um método indireto, físico, não seletivo que determina a concentração de sólidos solúveis totais e por isso não faz nenhuma distinção entre os tipos de açúcares presentes e suas concentrações.

CALDAS *et al.* (2015) realizaram experimentos comparativos entre refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida aplicadas à determinação de açúcares em néctar e em suco concentrado de uva. Foi utilizado um refratômetro digital da marca ATAGO, com calibração em água. Os resultados obtidos para o néctar de uva corresponderam aos já encontrados na literatura, conforme SANTANA *et al.* (2011), RIZZON e MIELE (2012) e TOALDO *et al.* (2015). Ainda de acordo com o trabalho de CALDAS *et al.* (2015), a única diferença encontrada, para a refratometria, foi entre o valor total de sólidos solúveis medido ($60,08^{\circ}\text{Bx}$) e o valor mencionado no rótulo do suco concentrado (65°Bx), que, de acordo com SANTANA *et al.* (2009), é o valor mínimo perante a legislação brasileira. A menor variação dos teores foi observada pela refratometria, seguida da cromatografia líquida e da espectroscopia, que apresentou maior dispersão. Assim sendo, a refratometria se mostrou apropriada para medidas rotineiras, principalmente em escalas não industriais, considerando sua precisão, facilidade e simplicidade de uso.

Conforme RAMASAMI *et al.* (2004), o refratômetro de Abbe (típico refratômetro de bancada) pode ser utilizado em sucos de frutas e bebidas carbonatadas (com prévia desgaseificação) antes de outros métodos, como a espectroscopia, por

originar resultados rápidos de maneira simples, apesar da refratometria medir açúcares totais.

3.2 Espectrofotometria

Ao contrário da refratometria, métodos espectrofotométricos permitem a determinação não somente de açúcares totais, mas é possível distinguir AR de ANR. As técnicas de espectrofotometria também são denominadas de técnicas colorimétricas. A diferença entre elas está baseada nos reagentes utilizados, já que todas podem ser feitas pelo mesmo espectrofotômetro. Esta subseção descreve trabalhos que utilizaram técnicas colorimétricas na determinação de açúcares.

3.2.1 Somogyi-Nelson

O método de Somogyi-Nelson baseia-se na propriedade redutora dos açúcares redutores, pela reação do grupo cetônico ou aldeídico, mas não consegue determinar a concentração específica de cada um dos AR presentes na solução analisada.

A Figura 3.1 apresenta a coloração de dez diluições da amostra analisadas por MALDONADE *et al.* (2013a) e da amostra em si. O açúcar presente nas soluções era glicose, e as concentrações variaram entre 50 mg/L de 500 mg/L de glicose. Para fins ilustrativos, o tubo de ensaio mostrado na Figura 3.1 com o número 5 possui concentração de 250 mg/L e resultou em um valor de absorbância de 0,418 com leitura a 540 nm.

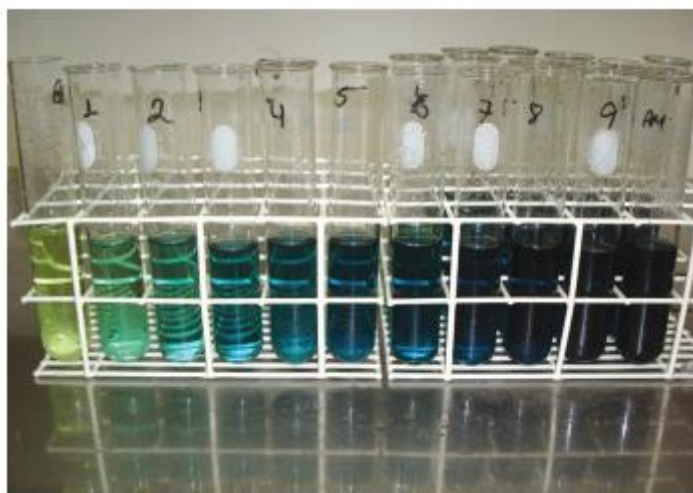


Figura 3.1: Soluções analisadas por MALDONADE *et al.*, 2013a (Adaptado de MALDONADE *et al.*, 2013a).

É necessário destacar que, de acordo com WROLSTAD *et al.* (2005), cubetas de plástico são mais convenientes a serem utilizadas neste método, mas o material plástico reage com ácidos fortes após longa exposição. Além disso, a solução não pode estar concentrada demais a ponto de prejudicar a linearidade da curva de absorvância. Indica-se que a concentração de açúcares seja de, no máximo, 0,50g/L. O tempo necessário entre o começo dos experimentos (iniciando com o preparo dos reagentes) até a obtenção de resultados é de aproximadamente vinte e seis horas.

DEMIATE *et al.* (2002) compararam o método Somogyi-Nelson (SN) com outros dois métodos, Lane-Enyon e fenol-sulfúrico (sendo este tomado como o referencial), na determinação de açúcares de sucos de maçã processados em nível de laboratório e de refrigerantes comerciais. A técnica analítica de Somogyi-Nelson se mostrou adequada para o objetivo, sem apresentar diferença significativa do referencial fenol-sulfúrico ao nível de 1 % de significância, tendo o menor coeficiente de variação, ou seja, menor variabilidade. Este método gera resíduos em menor quantidade e toxicidade, além de ter custo mais baixo de reagentes.

3.2.2 Fenol-sulfúrico

CALDAS *et al.* (2015) analisaram néctar de uva e suco de uva concentrado comparando três técnicas: FS, refratometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise estatística indicou que os resultados do método do fenol-sulfúrico

foram os que sofreram maiores variações para o néctar de uva. Para o suco de uva concentrado, o fenol-sulfúrico apresentou resultado diferente em relação à refratometria e à CLAE com significância de 5 %, o que indica que a técnica do fenol-sulfúrico não é indicada para a determinação de açúcares totais para amostras de suco de uva concentrado como o utilizado no estudo. CALDAS *et al.* (2015) concluíram que a qualidade dos resultados obtidos está relacionada à homogeneização das soluções antes da leitura, com o auxílio de um vórtex. Segundo SILVA *et al.* (2003), uma desvantagem importante do método fenol-sulfúrico é o uso em escala industrial de ácido sulfúrico. Apesar disso, este é um método simples, com resultados sensíveis e reproduzíveis.

A Figura 3.2 apresenta o espectrofotômetro UVmini-1240 – Shimadzu, que foi utilizado por CALDAS *et al.* (2015) no experimento de espectrofotometria.



Figura 3.2: Espectrofotômetro modelo UVmini-1240 – Shimadzu (Adaptado de Shimadzu, n.d.).

3.2.3 ADNS

Quanto mais avermelhada é a solução resultante, maior é a concentração de AR na amostra inicial. A Figura 3.3 mostra soluções do Protocolo nacional vigente, de MALDONADE *et al.* (2013b), analisadas por espectrofotometria. Esta é uma análise robusta e simples, que permite a quantificação diária de um grande número de amostras quando comparada a outras técnicas (VASCONCELOS, 2013).



Figura 3.3: Soluções analisadas por MALDONADE *et al.*, 2013b (Adaptado de MALDONADE *et al.*, 2013b)

Os resultados obtidos por Vasconcelos *et al.* (2013) indicam que é possível determinar açúcares redutores por ADNS sem o uso de fenol e bissulfito de sódio, que representam riscos à saúde humana, mas a utilização destes reagentes ainda é comum.

SILVA *et al.* (2003) compararam métodos espectrofotométricos, titulométricos e gravimétricos para determinação de açúcares redutores e totais em amostras de mel. Na análise estatística realizada, os métodos espectrofotométricos (ADNS, fenol-sulfúrico, Somogyi-Nelson, entre outros) não apresentaram diferença significativa entre si ao nível de 5 %. Um dos objetivos deste estudo era adaptar o método do ADNS para a determinação não somente de açúcares redutores, mas também de açúcares totais, fazendo uso de hidrólise ácida. Os resultados obtidos não diferiram significativamente dos demais. É necessário neutralizar a amostra após a hidrólise ácida, pois o meio ácido auxilia a formação de hidroximetilfurfural, que é um composto que será quantificado nas análises.

3.3 Análise titulométrica

Na aplicação da titulometria à determinação de açúcares, a amostra contendo açúcares redutores é o agente titulante. Os métodos titulométricos são mais grosseiros do que os demais utilizados para determinação de AR e por isso são mais inexatos. Este trabalho destaca a metodologia Lane-Eynon (LE), que é o método titulométrico oficial de determinação de açúcares.

3.3.1 Lane-Eynon

TAVARES *et al.* (2010) relatam que para atingir resultados exatos com a utilização dessa metodologia é necessário manter a ebulição constante durante a titulação, para evitar que o óxido cuproso (de coloração avermelhada) seja oxidado pelo oxigênio presente no ar e volte à condição de óxido cúprico (de coloração azul). Além disso, devido à necessidade de aquecimento, a titulação deve durar no máximo três minutos, de modo a evitar a decomposição dos açúcares, proveniente do aquecimento prolongado.

Esta é uma técnica muito utilizada, mas conforme RANKINE (1989) pode apresentar erros devido a fatores como a preparação antecipada do reagente de Fehling, tempo de ebulição incorreto e erro no momento da adição dos reagentes. Além disso, a preparação da solução de Fehling é complexa e o tempo total de análise é longo.

DEMIATE *et al.* (2002) consideraram o método de LE como adequado para a análise de sucos de maçã e refrigerantes comerciais. Esta técnica teve maior coeficiente de variação em relação a Somogyi-Nelson e fenol-sulfúrico, tanto para o suco quanto para o refrigerante. A análise de variância indicou que não há diferença significativa entre as metodologias estudadas, ao nível de 1 % de significância. Os pesquisadores ressaltam a importância de condições rigorosas na hidrólise precedente à titulometria. Assim como em outros métodos, para analisar também açúcares não-redutores, é necessário realizar hidrólise prévia em meio ácido.

A titulação volumétrica de Lane-Eynon é o método oficial para determinação de açúcares na uva, suco de uva, mosto e vinho (CORRÊA *et al.*, 2013).

3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um processo mais complexo e preciso do que as metodologias que envolvem refratometria, espectrofotometria e titulometria. Seu diferencial é a seletividade em relação aos diferentes monossacarídeos e dissacarídeos que são quantificados simultaneamente em uma única análise. A CLAE é uma técnica popularmente empregada na análise simultânea de diferentes açúcares, como a glicose, a frutose e a sacarose.

3.4.1 CLAE por Índice de refração

A técnica cromatográfica permite quantificar diferentes açúcares de uma mesma amostra ao mesmo tempo, como feito por CALDAS *et al.* (2015). A Figura 3.4 mostra os resultados obtidos ao realizar CLAE com detector de IR em solução-padrão, néctar de uva e suco concentrado de uva, conforme experimentos. É possível observar a ausência de sacarose no suco de uva concentrado, ou seja, somente há os açúcares naturais (glicose e frutose) e não houve adição de sacarose, o que está de acordo com a legislação brasileira. Foi utilizado um aparelho HPLC Série 10, Shimadzu, bomba LC-10 AT VP, gerenciador de solventes quaternário (FCV-10AL VP) comandado pela interface (SCL-10A VP), e módulo de gaseificação DGU-14A. A fase móvel usada foi uma mistura de acetonitrila: água 75:25 (v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹ com coluna Shim-pack CLC-NH₂ (M) (4,6 x 250 mm, 0,05 mm, Shimadzu), mantida a 30 °C (CTO-10AS VP). Injetor manual Rheodyne 7125 com alça de amostragem de 0,2 mL. Detecção realizada por IR (RID-10A, Shimadzu) e aquisição e integração dos picos utilizou o programa computacional Class-VP.

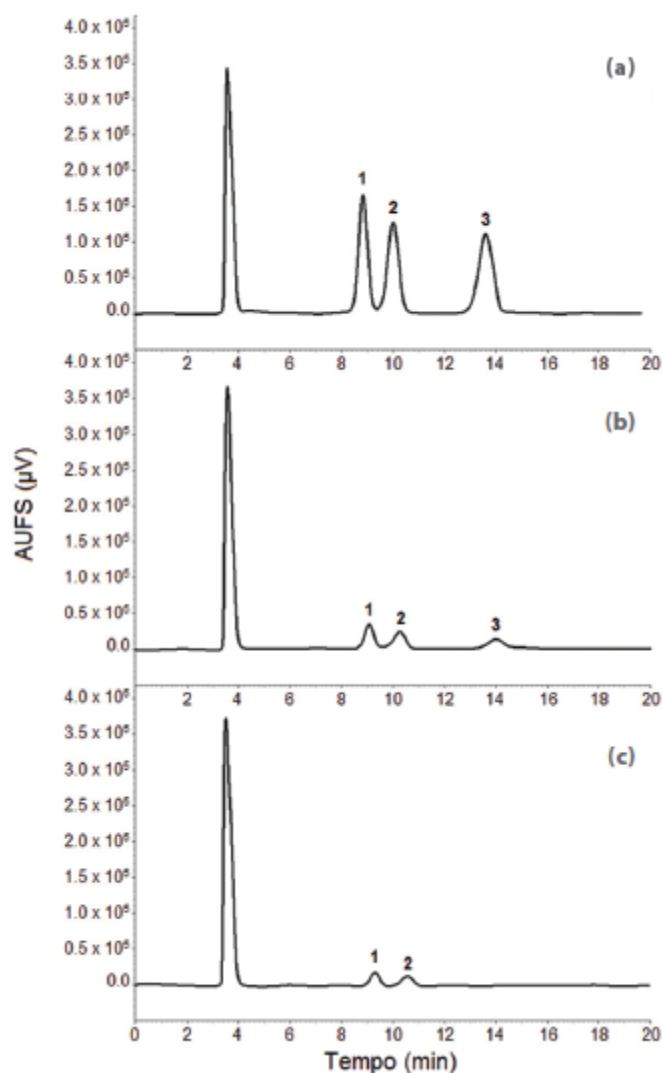


Figura 3.4: Cromatogramas de solução padrão de frutose, glicose e sacarose a 0,25g/L (a); néctar de uva (b) e suco concentrado de uva (c), por CLAE-IR. Picos: (1) Frutose; (2) Glicose e (3) Sacarose (Adaptado de CALDAS *et al.*, 2015).

CORRÊA *et al.* (2013) consideraram o método capaz de separar e quantificar as amostras de vinho, suco de uva e mosto, com alta resolução. Além disso, foi feita análise de variância e foram calculados os parâmetros de recuperação e coeficiente de variação, que indicaram que o método é preciso e exato, e os limites de detecção e quantificação foram suficientemente baixos. Com isso, o método é eficaz para avaliar concordância com a legislação de sucos e vinhos, detectar adulterações, prever grau alcoólico do vinho – que é influenciado pelo grau de maturação na fermentação, e acompanhar eficiência da fermentação alcoólica.

Os cromatogramas obtidos por CORRÊA *et al.* (2013) se encontram na Figura 3.5 e na Figura 3.6. A primeira figura apresenta os cromatogramas da solução-

padrão de glicose, sacarose e frutose, e o cromatograma da amostra de vinho. A segunda figura apresenta os cromatogramas gerados pelas amostras de suco de uva e mosto. Foi empregada uma coluna Rezex RHM-monosaccharide H⁺ 300 x 7,8 mm e uma pré-coluna Carbo H, 4,0 x 3,0 mm. A fase móvel foi água ultrapura, com fluxo isocrático de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de forno de 40 °C. Foi injetado 0,1 mL de solução dos padrões e amostras.

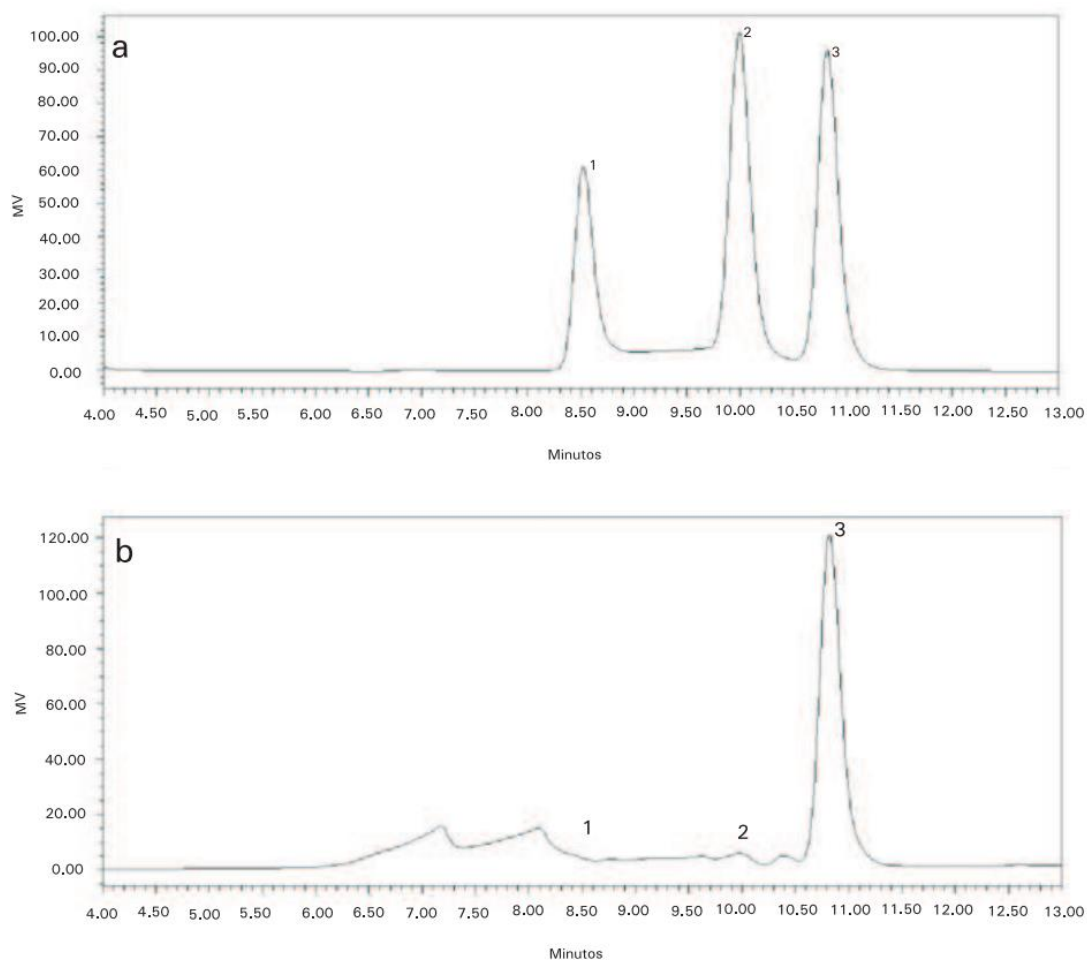


Figura 3.5: Cromatogramas da solução-padrão (a) e da amostra de vinho (b) explicitando sacarose (1), glicose (2) e frutose (3) (Adaptado de CORRÊA *et al.*, 2013).

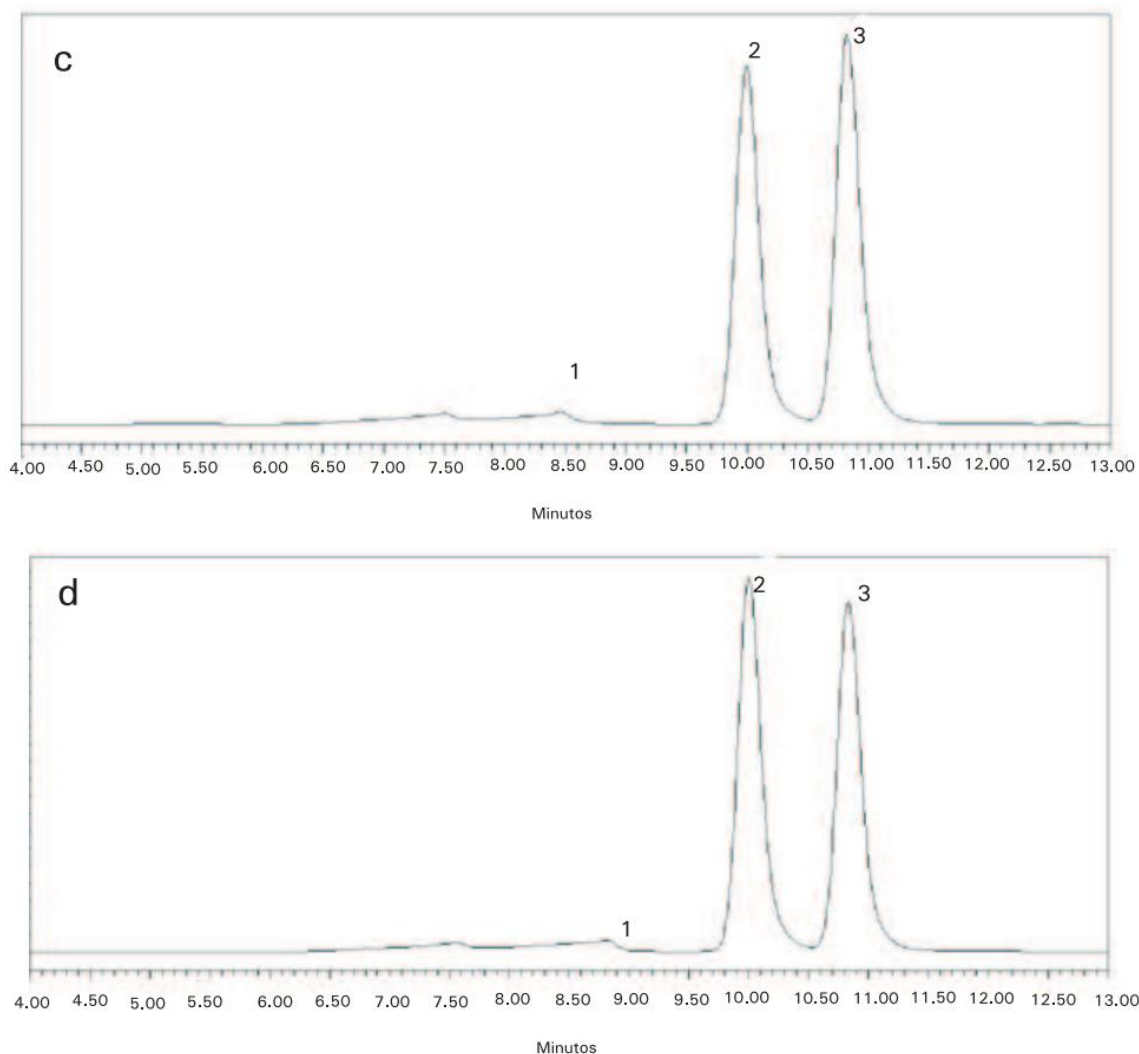


Figura 3.6: Cromatogramas da amostra de suco de uva (c) e da amostra de mosto (d), explicitando sacarose (1), glicose (2) e frutose (3) (Adaptado de CORRÊA *et al.*, 2013).

É possível perceber que não houve adição de sacarose por parte do fabricante do suco de uva analisado, pois não foram detectadas quantidades de sacarose fora do esperado, o que indica a adequação à legislação. Caso houvesse adição de sacarose, o produto seria denominado néctar de uva.

3.4.2 Eletroquímico

OLIVEIRA *et al.* (2010) quantificaram os teores de açúcares em cultivares de soja utilizando CLAE com detector eletroquímico com eletrodos de ouro. A identificação e a quantificação dos picos dos diferentes açúcares foram feitas a partir de soluções-padrão de glicose, frutose e sacarose. A técnica utilizada foi eficaz para a comparação dos diversos cultivares de soja que foram analisados e todas as

amostras apresentaram valores sem diferença significativa de frutose, a nível de 1 % de significância, e as concentrações de sacarose variam de acordo com cada cultivar, como era o esperado.

PICO *et al.* (2014) desenvolveram e validaram um método para determinação e quantificação de seis açúcares (glicose, isomaltose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentose) em farinha de trigo. A análise deste produto é importante devido a obtenção do melhor instante de fermentação, controle da reação de Maillard e de caramelização durante cozimento e na produção de açúcares e de xaropes de glicose, provenientes do amido da farinha. Este trabalho citou utilizou eletrodos de ouro para o processo e eletrodo de paládio como referência. A seletividade foi facilmente comprovada com a adição somente dos açúcares a serem diferenciados e nova análise, indicando picos ainda maiores para os componentes adicionados. Foram encontradas a melhor fase móvel para se utilizar e a melhor diferença de potencial. O tempo de análise foi de 38 min, que é um valor um pouco maior do que o usual sem a otimização proposta pelo experimento, mas os valores encontrados foram mais exatos, de acordo com a análise de variância.

3.5 Polarimetria

Na indústria de alimentos, é possível quantificar sacarose, glicose e frutose em soluções pela polarimetria, que é utilizada no controle de qualidade de produtos. De acordo com RODRIGUES *et al.* (2000), a técnica de polarimetria e a refratometria são comumente usadas no setor de produção de cana-de-açúcar, que tem grande extensão no Brasil. Na indústria canavieira, deseja-se sempre o mais elevado teor de sacarose na cana-de-açúcar, pois isto determina a pureza da cana para posterior processamento, e o mesmo é válido para a produção de beterraba.

MACHADO, CAMPOS e SOUZA (2009) compararam os métodos de Lane-Eynon e polarimetria para determinação de amido em farinha de mandioca. Segundo análise de variância, não houve diferença significativa entre as técnicas, em um nível de 5 % de significância. Os dois métodos mostraram-se precisos e exatos.

Este método é o mais adequado para determinação de amido, e é o método recomendado pelo Ministério da Agricultura do Brasil, por ser o indicado pela Comunidade Econômica Europeia (EEC) (MACHADO, CAMPOS e SOUZA, 2009).

3.6 Biossensor eletroquímico

A procura por respostas rápidas e de altas sensibilidade, seletividade e estabilidade fizeram com que o interesse por sensores eletroquímicos crescesse nas últimas décadas. A grande vantagem deste biossensor consiste nestas características, aliadas a testes rápidos e de baixo custo, além da inexigibilidade de pré-tratamento da amostra. Os biossensores eletroquímicos mostram-se como boas opções para o monitoramento frequente da glicose sanguínea.

VIEIRA (2006) mostrou que é possível produzir em laboratório um biossensor eletroquímico amperométrico aplicado à determinação de glicose sanguínea com uma biocamada e transdutor envolvendo GOx, poliamidoamina e óxido de índio dopado com estanho, com qualidades sensoras convenientemente adequadas em termos de sensibilidade e tempo de resposta no monitoramento de glicose. Seguindo o mesmo caminho, ÁVILA (2014) desenvolveu um biossensor estável e reproduzível com metodologia simples para detecção de glicose.

Embora esta tecnologia auxilie na qualidade de vida de pessoas diabéticas, a perspectiva de evolução do método é a utilização de tecnologias não-invasivas, ou seja, que não necessitem da obtenção de uma amostra de sangue. Neste sentido, WANG (2008) esclarece que a tendência é a utilização de adesivos ou relógios que se baseiam no princípio da iontoforese reversa para quantificar glicose sanguínea sem perfurar a pele. SIEG, GUY e DELGADO-CHARRO (2004) provaram que a popularização do adesivo é possível e que ainda existem pequenas alterações que podem ser feitas para refinar a determinação da glicose sanguínea.

Na aplicação de biossensores eletroquímicos na indústria, para a determinação da concentração de glicose em uma amostra geralmente mede-se a corrente gerada por reação redox da água oxigenada que é gerada na oxidação da glicose. A biocamada também é composta por GOx, assim como na aplicação do biossensor de glicose no sangue. (MOREIRA *et al.*, s.d.)

4 Comparação de métodos

Os métodos analisados baseiam-se em princípios muito diferentes entre si. A escolha de um método para cada situação deve levar em conta a amostra a ser analisada, a viabilidade técnica, o tempo de resposta, o custo empregado e a confiabilidade necessária. Neste capítulo as técnicas descritas anteriormente serão comparadas e classificadas convenientemente de acordo com critérios estabelecidos.

4.1 Custo

Tratando-se do valor gasto para obter o resultado desejado, é notável que a refratometria é a melhor técnica neste quesito. Instrumentos refratômetros ditos portáteis e analógicos custam menos de R\$ 500,00, enquanto aparelhos digitais, pouco passam de R\$ 1.000,00. Estes preços são irrisórios comparados a espectrofotômetros de bancada, que custam mais do que dez vezes este valor. Polarímetros podem variar o preço entre R\$ 3.000,00 e R\$ 50.000,00, dependendo da qualidade e atributos do equipamento. Os aparelhos de HPLC podem passar dos R\$ 100.000,00. A técnica de titulometria, por não possuir um instrumento específico, depende da disponibilidade de um laboratório que possua os materiais e reagentes necessários para sua análise.

4.2 Aplicabilidade

Existem métodos oficiais para a determinação de açúcares em certas condições, como o caso de uvas, sucos de uva, mosto e vinho, cuja técnica oficial é o método Lane-Eynon. O uso da técnica vem da necessidade de saber o ponto de maturação das uvas. Porém em muitas situações esta técnica não se faz aplicável, como em casos de pequenas produções de vitivinicultura, onde não é viável dispor de um laboratório para a análise. Nesses casos é possível fazer uso dos refratômetros manuais. Além disso, a refratometria é muito útil para controle de qualidade de xaropes e geleias.

O refratômetro digital é amplamente utilizado nas indústrias de refrigerantes, servindo como indicador no padrão de qualidade. As empresas deste ramo buscam o melhor custo-benefício para obtenção do teor de açúcares totais e neste caso a refratometria produz um resultado confiável.

Quando o produto a ser analisado é originalmente um sólido, como cereais e tubérculos, a metodologia oficial é a polarimetria. Contudo não são todos os laboratórios que dispõem de um polarímetro e esta limitação pode ser facilmente superada com a aplicação de LE, sem prejuízo de precisão e exatidão de resultados, somente em tempo de análise e custo de reagentes, conforme MACHADO, CAMPOS e SOUZA (2009). Porém caso seja necessário determinar açúcares separadamente, a CLAE se faz necessária.

Laboratórios que fazem análise de fiscalização e adulterações de produtos precisam utilizar cromatógrafos de alta eficiência, pois é necessário comparar, para a mesma amostra, os teores de diversos açúcares ao mesmo tempo. A espectroscopia também pode ser aplicada a esses casos, mas é necessário realizar a medida antes e depois da hidrólise dos açúcares, que é a parte que necessita de maior controle das condições e, conseqüentemente, acarreta mais erros.

As técnicas para medida de açúcares em cana-de-açúcar comumente utilizadas são a refratometria e a polarimetria. Pela indústria canavieira, quanto maior o teor de sacarose presente na cana, maior é a qualidade da planta para posterior processamento. A porcentagem de sacarose presente no caldo extraído da moagem da cana-de-açúcar indica a pureza desta e ambas as técnicas são precisas o suficiente para a indústria canavieira.

4.3 Limites de quantificação

Nos casos da indústria alimentícia, o maior problema envolvendo o limite de quantificação de uma amostra está relacionado ao limite superior de detecção. As técnicas que utilizam calibração por meio de um padrão, como as espectrofotometrias de SN e ADNS, são limitadas pela concentração máxima da curva de calibração utilizada, sendo desaconselhada a extrapolação de resultados, e pelo limite de absorvância obtida pela curva de calibração, pois não é aconselhado trabalhar próximo ao valor de absorvância 1,0. Os protocolos vigentes no Brasil dos métodos de SN e ADNS indicam diluições convenientes da amostra de modo que a concentração de açúcares seja, respectivamente, 0,50 g/L e 1,0 g/L, no máximo.

4.4 Tempo de análise

É possível perceber pelos trabalhos já realizados que a etapa dos experimentos em que se dedica mais tempo é no preparo das amostras e dos reagentes a serem utilizados. Nos casos em que se faz necessária a hidrólise, seja enzimática ou química, o tempo experimental aumenta ainda mais. A exemplo da técnica de SN, a determinação de açúcares redutores, sem a hidrólise da sacarose, leva menos de uma hora. Para ser feita a determinação de açúcares redutores totais, a hidrólise enzimática possui etapas como extração e diálise, que levam seis e oito horas, respectivamente. A medida no aparelho de espectrofotômetro é a parte mais rápida do processo, levando poucos minutos para ser realizada.

A demora no preparo de reagentes também vale para a titulometria, mesmo que esta deva ser realizada em no máximo três minutos, para evitar degradação dos açúcares, já que ela é feita com aquecimento.

Os aparelhos manuais de refratometria retornam respostas instantaneamente, na lente com a escala em °Bx, enquanto os instrumentos digitais e os polarímetros levam poucos minutos para a análise. Todos estes têm a vantagem de não utilizarem reagentes de longo tempo de preparo.

4.5 Toxicidade

Somente as técnicas de FS e ADNS possuem potencial toxicológico relevante. Estes dois métodos fazem uso de reagentes como ácido sulfúrico concentrado, fenol, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio e por isso não podem ser aplicados a grandes escalas. É conveniente não ultrapassar a escala de bancada para uso destas metodologias. Embora estas técnicas espectrofotométricas sejam amplamente utilizadas, existem adaptações que possuem menor toxicidade, como a adaptação do método de ADNS, sem o uso de fenol e bissulfito de sódio, que foi consolidada por VASCONCELOS *et al.* (2013).

5 Conclusões

As técnicas mais comuns empregadas na determinação de açúcares na indústria alimentícia foram comparadas e tiveram suas viabilidades verificadas, em casos distintos. Foi possível concluir que o refratômetro manual é a melhor opção para pequenos empreendedores do setor de vitivinicultura. O uso de refratômetro e de polarímetro são a melhor alternativa para o setor canavieiro, visto que as técnicas são baratas, rápidas e são popularmente utilizadas no setor.

O refratômetro digital aparece como boa escolha para empresas de maior porte, como grandes fabricantes de refrigerantes, pois a análise da qualidade dos produtos deve ser frequente, simples e com resultados confiáveis o suficiente, como os da refratometria, sem a necessidade de aprofundamento nos diversos açúcares presentes na amostra.

Foi possível comparar métodos que fazem uso da hidrólise com aqueles que não fazem. O uso de técnicas que necessitam de hidrólise torna a análise demorada, não sendo adequadas para determinações que necessitam de frequência, mas surgem como alternativa em casos de falta de equipamentos ou recursos laboratoriais.

A titulometria mostrou-se uma boa e rápida técnica para análise qualitativa e para análise quantitativa grosseira, caso a hidrólise seja dispensável. A prática e a experiência do operador influenciam no ponto final da análise.

A cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se como a técnica mais completa para a determinação da concentração de açúcares, tanto AR quanto ANR. A única desvantagem considerável desta técnica está relacionada ao custo e à operação do cromatógrafo.

Referências Bibliográficas

ARGENTON, A. Conceitos Fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC). **Conselho Regional de Química – IV Região (SP)**. São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: < http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf >.

ÁVILA, V. C. Desenvolvimento de um Biossensor para Detecção de Glicose. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2014. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/103799> >.

CALDAS, B. S. et al. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 53-63, 2015. Disponível em: < <http://www.scientiachromatographica.com/doi/10.4322/sc.2015.016> >.

CORRÊA et al. Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae). **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Petrolina, 2013. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98598/1/BPD112.pdf> >.

DAUDT, C. E.; SIMON, J. A. Um Método Rápido para Análise de Glicose em Mostos e Sua Quantificação em Algumas Cultivares do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 697-701, 2001. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000400023&lng=en&nrm=iso >.

DEMIATE et al. Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação entre Método Colorimétrico e Titulométrico. **Publicatio UEPG – Exact and Soil Sciences, Agrarian Sciences and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002. Disponível em: < <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/view/772/677> >.

DUBOIS et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FURTADO, R. F. et al. Aplicações de Biossensores na Análise de Qualidade de Alimentos. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Fortaleza, 2008. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33970/1/Dc-117.pdf> >.

GRAPESTOMPERS. **How to Use a Refractometer in Winemaking**. Disponível em: < http://www.grapestompers.com/refractometer_use.aspx >. Acesso em: 31/05/2016.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, **Spectrophotometry Handbook**, 2013, Disponível em: < http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Spectrophotometry.pdf >.

MACHADO, F. L. C.; CAMPOS, G.; SOUZA, M. T. G. Comparação entre os Métodos de Lane-Eynon e polarimétrico para Determinação de Amido em Farinha de Mandioca. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 155-159, 2009. Disponível em: < http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552009000100022&lng=pt&nrm=iso >.

MALDONADE et al. Protocolo para Determinação de Açúcares Redutores pelo Método de Somogyi-Nelson. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Brasília, 2013a. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81814/1/cot-86.pdf> >.

MALDONADE et al. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Brasília, 2013b. Disponível em: < http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_85.pdf >.

METROHM. Manual for IC Amperometric Detector, **IC Amperometric Detector**, Herisau, Switzerland, 2016. Disponível em: < <http://www.metrohm.com/pt-br/produtos-geral/cromatografia-de-ions/ic-detectores/%7BD7B9C05F-47B0-4A9C-B57D-C1DD0795A25B%7D#> >. Acesso em: 07/06/2016.

MOREIRA et al. Biossensores: Tecnologia e Aplicações. **Biologia – Secretaria da Educação do Paraná**, Paraná, s.d. Disponível em: <

<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biosensores.pdf> >.

Acesso em: 07/06/2016.

MSPC, **Luz – Reflexão e refração.** Disponível em: <

<http://www.mspc.eng.br/elemag/opt0210.shtml> >. Acesso em: 31/05/2016.

OLIVEIRA, P. S. M. et al. Utilização do d-manitol em síntese orgânica. **Química**

Nova, v. 32, n. 2, p. 441-452, 2009. Disponível em: <

http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No2_441_30-RV08222.pdf >.

OLIVEIRA, M. A. et al. Quantificação dos Teores de Açúcares, Oligossacarídeos e Amido em Genótipos/Cultivares de Soja (*Glycine Max* (L) Merrill) Especiais Utilizados para Alimentação Humana. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 23-29, jan./mar. 2010. Disponível em: <

<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v13n1401a.pdf> >.

PICO, J. et al. Quantification of Sugars in Wheat Flours with an HPAEC-PAD Method. **Food Chemistry**, v. 173, p. 674-681, 2014. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614016665> >.

QUEIROZ, E. F. e HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, 2006. Disponível em: <

<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/58/57> >.

RAMASAMI, P. et al. Quantification of Sugars in Soft Drinks and Fruit Juices by Density, Refractometry, Infrared Spectroscopy and Statistical Methods. **The South African Journal of Chemistry**, v. 57, p. 24-27, 2004. Disponível em: <

<http://www.ajol.info/index.php/sajc/article/viewFile/21572/111962> >.

RANKINE, B. **Manual Practico de Enologia.** Zaragoza: Editorial Acribia, 1989.

REED INSTRUMENTS. **Products.** Disponível em: <

<http://www.reed-instruments.com/product/reed-instruments-R9500-brix-refractometer>

>. Acesso em: 30/05/2016.

RODRIGUES, M. V. N. et al. Produção de Xarope de Açúcar Invertido Obtido por Hidrólise Heterogênea, Através de Planejamento Experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 103-109, 2000. Disponível em:

< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000100020&lng=en&nrm=iso >.

SANTANA, I. et al. Composição Química e Centesimal de Suco de Uva Concentrado por Osmose Inversa: Influência da Temperatura do Processo. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/57104/1/2011-145.pdf> >.

SHIMADZU. **Produtos**. Disponível em: < <http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/spectro/uv/uvmini-1240.shtml> >.

Acesso em: 31/05/2016.

SIEG, A.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Noninvasive Glucose Monitoring by Reverse Iontophoresis in Vivo: Application of the Internal Standard Concept. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 1383-1390, 2004. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/content/50/8/1383.full.pdf+html> >.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**, 6ed, USA: Cengage Learning, 2006.

SILVA, R. N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, dezembro de 2003. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000300007&lng=en&nrm=iso >.

TAVARES, J. T. de Q. et al. Interferência do Ácido Ascórbico na Determinação de Açúcares Redutores pelo Método de Lane e Eynon. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 805-809, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000400008&lng=en&nrm=iso >.

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS AMHERST, 850 Professional IC, **EWRE Equipment and Instrumentation**, Amherst, USA, s.d. Disponível em: < <http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/MetrohmIC/Metrohm%20850%20IC%20Manual.pdf> >. Acesso em: 07/06/2016.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. de. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Fortaleza, 2013. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103342/1/BPD13017.pdf> >.

VIEIRA, N. C. S. Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes Finos de In₂O₃:Sn. **Universidade Federal de**

Itajubá, Itajubá, 2006. Disponível em: < <http://saturno.unifei.edu.br/bim/0032854.pdf> >.

WANG, J. Electrochemical Glucose Biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2008. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr068123a> >.

WROLSTAD et al. Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates. **Handbook of Analytical Chemistry**, USA: Wiley, v. 1, p. 655-659, 2005.