

Comunicado 85

Técnico

ISSN 1414.9850
Março, 2013

Foto: Iriani Rodrigues Maldonade



Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS

Iriani R. Maldonade¹
Patrícia G. B. Carvalho²
Nathalie A. Ferreira³

Os carboidratos, juntamente com as proteínas e lipídeos, são os constituintes principais dos organismos vivos e são classificados em mono, oligo e polissacarídeos além de serem fonte abundante de energia. Os monossacarídeos são compostos que não podem ser hidrolisados a compostos mais simples como, por exemplo, a glicose (aldose) e frutose (cetose). Os oligossacarídeos e os polissacarídeos são formados por moléculas de monossacarídeos unidas por ligações hemiacetálicas. Os testes de açúcares são baseados em reações de óxido-redução pelo grupo hidroxílico hemiacetálico do monossacarídeo, que pode reagir com íons e formar complexos coloridos (BOBBIO e BOBBIO, 2005) ou por reações coloridas provenientes da condensação de produtos de degradação dos açúcares em ácidos fortes com vários compostos orgânicos como fenol e antrona. Os monossacarídeos são açúcares redutores. O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (Figura 1).

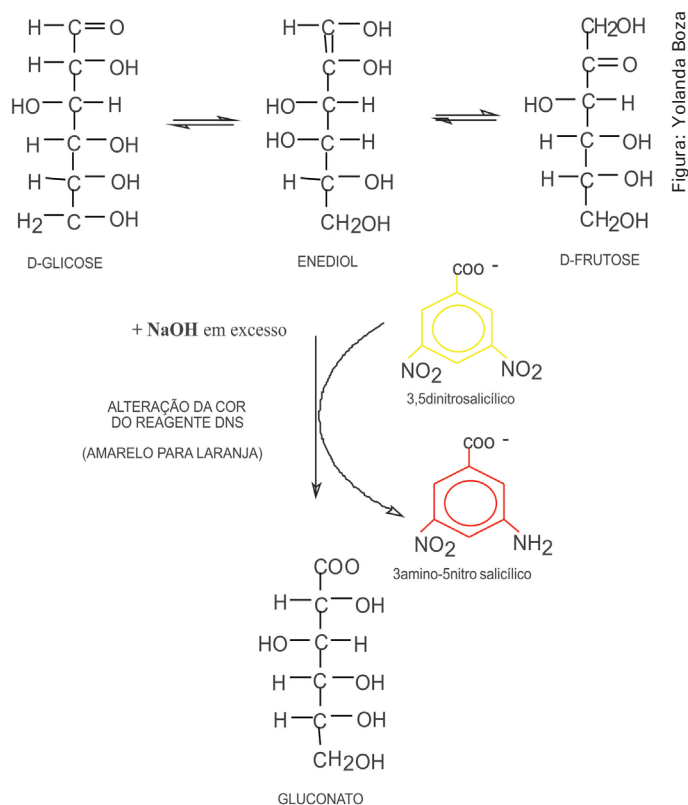


Figura: Yolanda Boza

Figura 1. Esquema das reações envolvidas no método DNS.

¹ Pesquisadora, Dra. Embrapa Hortaliças – iriani.maldonade@embrapa.br

² Pesquisadora, Dra. Embrapa Sede – DPD – patricia.carvalho@embrapa.br

³ Tecnóloga em Alimentos, MSc., Embrapa Hortaliças, Universidade de Brasília (UnB) – nathaliealfe@gmail.com

Neste trabalho, são relatadas as informações necessárias para a determinação de açúcares reductores totais em hortaliças pelo método de DNS com base em modificações e adaptações realizadas no laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Hortaliças.

Materiais Necessários

Reagentes

Glicose P.A.
 Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
 Metabissulfito de sódio
 Hidróxido de sódio (NaOH 2N)
 Fenol
 Ácido clorídrico (HCl 2N)
 Tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Equipamentos e Vidrarias

Balança analítica
 Banho termostático com circulação de água
 Agitador de tubos de ensaio
 Pipetas graduadas (1 mL, 10 mL e 20 mL)
 Tubos de ensaio de 16 mL
 Balão volumétrico de 100 mL
 Béqueres diversos
 Frascos âmbar
 Cronômetro digital
 Espectrofotômetro
 Cubetas de vidro

Preparo de Soluções

Solução padrão de glicose ou frutose a 1,0 g/L

Pesar em balança analítica 0,1000 g de glicose ou frutose, em seguida dissolver em aproximadamente 20 mL de água destilada sob agitação constante, transferir analiticamente para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar vigorosamente. Esta solução deve ser preparada e utilizada no dia da análise.

Reagente DNS

Para o preparo do reagente DNS, inicialmente pesar 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH e dissolver em 1416 mL de água destilada. Em seguida adicionar 7,6 mL de fenol (fundido à 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

Agitar e armazenar a solução em frasco âmbar em refrigerador, por no máximo 30 dias.

Solução de tartarato duplo de sódio e potássio

Pesar 15,1 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em um litro de água destilada. Armazenar a solução em frasco âmbar em temperatura ambiente até 30 dias.

Solução de NaOH 2N

Pesar 40 g de hidróxido de sódio anidro, diluir em água destilada e ajustar o volume para 500 mL, em balão volumétrico.

Solução de HCl 2N

Medir 85 mL de ácido clorídrico (HCl) em uma capela, diluir em água destilada e ajustar volume para 500 mL, em balão volumétrico.

Curva padrão de açúcar redutor

Fazer diluições da solução padrão de 1,0 g/L de glicose ou frutose com água destilada em tubos de ensaio, conforme demonstrado na Tabela 1. Agitar os tubos para homogeneização, retirar uma alíquota de 1,0 mL e fazer o teste de DNS.

Tabela 1. Preparação das diluições da solução padrão de glicose ou frutose a 1,0 g/L.

Concentração de glicose ou frutose (g/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
0,10	1,0	9,0
0,20	2,0	8,0
0,30	3,0	7,0
0,40	4,0	6,0
0,50	5,0	5,0
0,60	6,0	4,0
0,70	7,0	3,0
0,80	8,0	2,0
0,90	9,0	1,0
1,00	10,0	0,0

Fonte: Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Hortaliças

Determinação da curva-padrão

Plotar, em planilha ou calculadora científica, a concentração de glicose (g/L) no eixo Y e a absorbância (ABS) obtida com o teste de DNS no eixo X, conforme exemplo mostrado na Figura 2, e calcular a equação da reta.

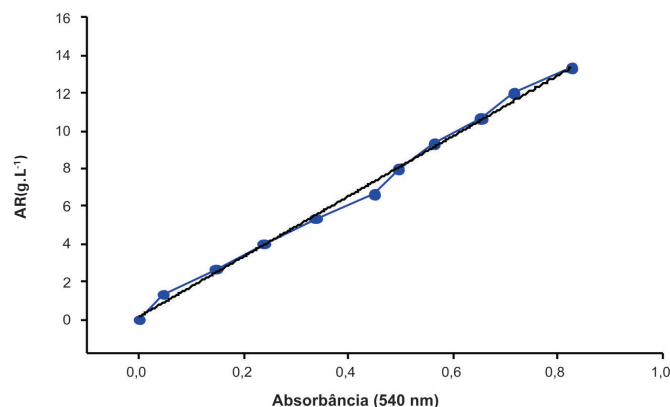


Figura 2. Exemplo de curva padrão de açúcar redutor (AR) em g/L. Equação da reta: Concentração AR(g/L) = 1,3894 * ABS + 0,0762 (R² = 0,9965).

Preparo da amostra

Pesar 100 g da hortaliça e homogeneizar em *mixer* ou liquidificador por 3 minutos. Retirar uma alíquota de 10 g e adicionar água destilada até completar 50 ou 100 mL, em balão volumétrico. O volume final dependerá da concentração de açúcares presente na amostra, portanto o volume final poderá variar de acordo com o tipo da hortaliça. A concentração final de açúcares redutores da amostra deve ficar entre 0,1 e 1,0 g/L, conforme a curva de calibração. A amostra diluída deverá ser centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de DNS.

Caso a amostra contenha açúcares não-redutores como a sacarose, é necessário fazer hidrólise da amostra. Neste caso, retirar 2,0 mL do sobrenadante e adicionar 2,0 mL de HCl 2N e aquecer em banho maria em ebulição por 10 minutos. Resfriar a amostra em banho de gelo e acrescentar 2,0 mL de NaOH 2N e agitar. Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de DNS.

Teste de DNS: procedimento de determinação de açúcares redutores

Pipetar 1,0 mL da amostra em um tubo de ensaio e adicionar 1,0 mL do reagente DNS. Agitar e

aquecer em banho maria a 100°C (em ebulição) por 5 minutos. Resfriar o tubo em banho de gelo por 5 minutos. Adicionar 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste em substituir o volume de amostra ou solução de glicose por água destilada (1,0 mL) e realizar o teste de DNS.

OBS. A amostra deve ser diluída convenientemente de maneira que a sua concentração seja, no máximo, 1,0 g/L.

Cálculo

A partir da equação da reta, calcular a concentração de açúcar redutor na amostra. Deve-se considerar nos cálculos as diluições efetuadas na amostra, multiplicando o resultado por esse fator.

Exemplo:

Em 10 g de batata-doce homogeneizada e diluída para 50 mL com água destilada, temos:

ABS (absorbância) = 0,780

Concentração final da solução = 1,3894 * 0,78 + 0,0762 = 1,16 g/L

Concentração final em Base Úmida = (1,16 g * 50 mL)/1000 mL = 0,0058 g AR/g batata ou 0,58% (p/p).

Referências

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2.ed. Campinas: Unicamp, 2003. p. 73.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 145-150, Mar. 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

Comunicado Técnico, 85

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na Embrapa Hortaliças
Rodovia BR-060, trecho Brasília-Anápolis, km 9
C. Postal 218, CEP 70.351.970 – Brasília-DF
Fone: (61) 3385.9000
Fax: (61) 3556.5744
E-mail: cnph.sac@embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): 1.000 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Warley Marcos Nascimento

Editor Técnico: Fábio Akiyoshi Suinaga

Supervisor Editorial: George James

Secretária: Gislaine Costa Neves

Membros: Mariane Carvalho Vidal, Jadir Borges Pinheiro, Ricardo Borges Pereira, Ítalo Moraes Rocha Guedes, Carlos Eduardo Pacheco Lima, Marcelo Mikio Hanashiro, Caroline Pinheiro Reyes, Daniel Basílio Zandonadi

Expediente

Normalização bibliográfica: Antonia Veras

Editoração eletrônica: André L. Garcia