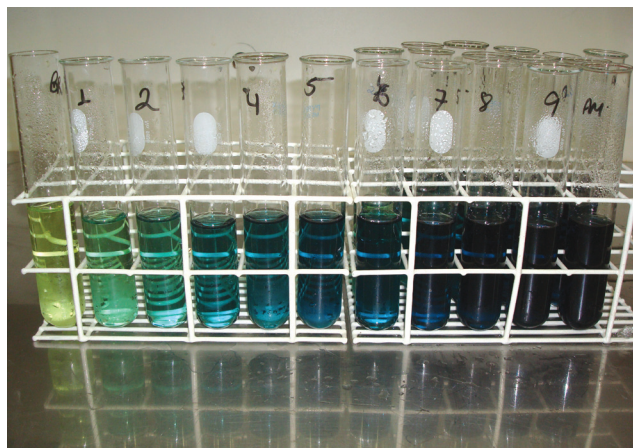


Comunicado 86

Técnico

ISSN 1414.9850
Março, 2013

Foto: Iriani Rodrigues Maldonade



Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson

Iriani R. Maldonade¹
Patrícia G. B. Carvalho²
Nathalie A. Ferreira³
Bianca S. F. Moulin⁴

Os carboidratos são os macronutrientes mais abundantes em frutas e hortaliças. Eles são classificados em mono, oligo e polissacarídeos. Os monossacarídeos são açúcares simples não hidrolisáveis, enquanto os oligossacarídeos e polissacarídeos são formados por moléculas de monossacarídeos unidas por ligações hemiacetálicas. Os monossacarídeos são açúcares redutores por apresentarem grupo carbonílico ou cetônico livre, capaz de ser oxidado na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Os oligo e polissacarídeos, que não possuem essa característica sem sofrerem hidrólise da ligação glicosídica, são denominados de açúcares não redutores (SILVA et al., 2003). A concentração de açúcares redutores totais influencia as características físicas, químicas e organolépticas das hortaliças, como sabor, aroma e textura, devido ao seu sabor doce. O teor médio dos açúcares simples em hortaliças é baixo com variação entre 2% e 5% (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A determinação de açúcares pelo método de Somogyi-Nelson é baseada nas propriedades redutoras dos açúcares, pela reação da hidroxila hemiacetálica dos monossacarídeos. A diferença dessa metodologia em relação a outros métodos de determinação de açúcares redutores é a sensibilidade do método, cuja faixa de determinação situa-se entre 25 e 500 mg/L. Esta reação não é específica, podendo sofrer interferência de outros componentes redutores. Açúcares redutores contêm um grupo aldeído ou cetônico que, em soluções alcalinas, reduzem íons de cobre, prata, bismuto e mercúrio a compostos de valência menor. O princípio do método de Somogyi-Nelson baseia-se na redução de Cu^{++} a Cu^+ pelo açúcar redutor com formação Cu_2O , que reduz o arsenomolibdato e produz um composto de coloração azul (Nelson, 1960). O método original foi modificado a partir de alterações de vários métodos, inclusive o colorimétrico, em que o cobre é reduzido formando compostos coloridos que podem ser quantificados por espectrofotometria.

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

⁴ Assistente, Embrapa Hortaliças – bianca.leite@embrapa.br

Materiais

Reagentes

Glicose P.A.
 Sulfato de cobre anidro (CuSO_4) ou sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
 Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4)
 Carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3);
 Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)
 Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
 Molibdato de amônio
 Arseniato dibásico de sódio (Na_2HAsO_4)
 Tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

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 500 mg/L

Pesar em balança analítica 0,050 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 e homogeneizar vigorosamente. Esta solução deve ser preparada e utilizada no dia da análise.

Reagente de Somogyi-Nelson I (SN-I)

Pesar:
 4 g de sulfato de cobre anidro (CuSO_4) ou 6,25 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
 24 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3);
 16 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3)
 12 g de tartarato duplo de potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
 18 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4)

Dissolver, na ordem descrita, em 600 mL de água destilada e completar o volume para 1 litro em balão volumétrico. Deixar em repouso por um dia, em ambiente escuro. Filtrar a solução com papel de filtro e colocar em frasco escuro, identificado.

Reagente de Somogyi-Nelson II (SN-II)

Solução A:

Pesar 50 g de molibdato de amônio anidro ou 53,09 g de molibdato de amônio tetra hidratado em 900 mL de água destilada. Adicionar 42 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente.

Solução B:

Pesar 6 g de arseniato dibásico de sódio anidro e dissolver em 50 mL de água destilada.

Misturar as soluções A e B e deixar em repouso por 24 horas a 37 °C, em estufa. Armazenar esta solução em frasco âmbar por até 30 dias a 20-25°C.

Curva padrão de açúcar redutor

Fazer diluições da solução padrão de glicose ou frutose (500 mg/L) com água destilada em tubos de ensaio (Tabela 01). Em seguida, agitar os tubos para homogeneização e retirar uma alíquota de 1,0 mL para o teste de SN.

Tabela 1. Preparação das diluições da solução padrão de glicose ou frutose a 500 mg/L.

Concentração de glicose (mg/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
50,0	1,0	9,0
100,0	2,0	8,0
150,0	3,0	7,0
200,0	4,0	6,0
250,0	5,0	5,0
300,0	6,0	4,0
350,0	7,0	3,0
400,0	8,0	2,0
450,0	9,0	1,0
500,00	10,0	0,0

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

Construção da curva-padrão

Plotar, em planilha ou calculadora científica, a concentração de glicose (mg/L) no eixo Y e a absorbância no eixo X (Figura 1). A partir da equação da reta, calcular a concentração de açúcares redutores (Eq. 1). Deve-se considerar nos cálculos as diluições efetuadas na amostra, multiplicando esse fator.

$$\text{Eq. 1: } y(\text{mg/L}) = 0,5776x + 0,0085$$

$$R^2 = 0,9945$$

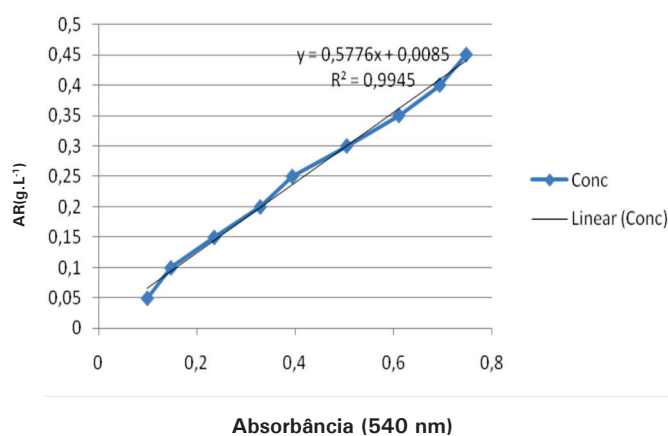


Figura 1. Curva padrão de açúcar redutor (glicose) em mg/L.

Preparo da amostra

Pesar 100 g da hortaliça e homogeneizar em *mixer* ou liquidificador por 3 minutos. Em seguida, retirar uma amostra de 10 g e adicionar água destilada até completar 50 ou 100 mL, em balão volumétrico. A concentração final de açúcares redutores da amostra deve ficar entre 50 e 500 mg/L, conforme a curva de calibração, portanto, cada tipo de hortaliça terá uma massa diferente a ser pesada. A amostra diluída deverá ser centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de SN.

OBS: Em caso da amostra conter 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 SN.

Teste de SN: procedimento de determinação de açúcares redutores

Pipetar 1,0 mL da amostra em um tubo de ensaio e adicionar 2,0 mL do reagente SN-I. Agitar e aquecer em banho maria (em ebulição) por 6 minutos. Resfriar o tubo em banho de gelo por 5 minutos. Adicionar 2,0 mL de SN-II, agitar e deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionar 25 mL de água destilada e fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste em substituir 1,0 mL da amostra ou padrão por água destilada e realizar o teste de SN.

OBS. A amostra deve ser diluída convenientemente de maneira que a concentração de açúcares seja, no máximo, 0,50 g/L ou seja 500 mg/L.

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.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biologic Chemistry**, Bethesda, Md, v. 153, n. 2, p. 375-380, Feb. 1960.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. A. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. 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, Sept./Dec. 2003.

Comunicado Técnico, 86

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