

Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação do teor de açúcar em bebidas não alcoólicas

Development and validation of methods for sugar determination in non-alcoholic beverages

RESUMO

Os açúcares são biomoléculas pertencentes a classe dos carboidratos que podem ser encontrados em grande parte dos alimentos que ingerimos diariamente. Estas biomoléculas desempenham importantes funções, como suprimento energético para os seres humanos. No entanto, o seu consumo exagerado pode causar danos à saúde. Desta forma, diversos métodos analíticos vêm sendo propostos com o objetivo de quantificar estas substâncias em amostras alimentícias. Em meio as técnicas analíticas bem estabelecidas, destaca-se o uso da espectrometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Logo, este trabalho teve como objetivo utilizar as metodologias de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fenol-sulfúrico na determinação da quantidade de açúcares redutores e totais em amostras de bebidas não alcoólicas. Foram analisadas seis amostras diferentes (água de coco, chá, sucos e refrigerantes) as quais foram adquiridas na cidade de Curitiba-PR. Ambos os métodos utilizados se mostraram adequados para a análise de açúcares em amostras alimentícias. A adaptação da metodologia de DNS para a quantificação de açúcares totais foi realizada com sucesso.

PALAVRAS-CHAVE: Açúcares. Método ácido 3,5-dinitrosalicílico. Método fenol-sulfúrico.

ABSTRACT

Sugars can be found in a wide range of foods. These biomolecules perform important functions, however the over-consumption may cause dangerous health effect, as diabetes and cardiovascular (heart) disease. In the last years, several analytical methods have been proposed in order to quantify these substances in food samples. Among to the well-established analytical techniques, ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) are one of the most used due to its simplicity and low cost. Thus, the objective of this study was applied the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and phenol sulfuric methods to quantify reducing and total sugars in non-alcoholic beverage. A total of six different samples were analyzed (coconut water, tea, juices and soft drinks) and both methods showed good results. In addition, the use of DNS method for total sugar quantification also showed good results when compared with phenol sulfuric method.

KEYWORDS: Sugar. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Phenol-sulfuric acid method.

Larissa Ribeiro Lopes
lopezlarissa@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Poliana Macedo dos Santos
polianasantos@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido:

Aprovado:

Direito autoral:



INTRODUÇÃO

Os açúcares são biomoléculas pertencentes a classe dos carboidratos que podem ser encontrados em grande parte dos alimentos que ingerimos. Estes compostos podem ser divididos em três principais classes: monossacarídeos (açúcar simples), oligossacarídeos (3 a 10 subunidades de açúcares interligados) e polissacarídeos (mais de 10 subunidades de açúcares interligados). Além desta classificação, os açúcares ainda podem ser classificados como redutores e não redutores. Por exemplo, a glicose e frutose (monossacarídeos) são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de oxidar na presença de agentes oxidantes, por exemplo íons férricos (Fe^{3+}) e cúprico (Cu^{2+}), e em soluções alcalinas. Já a sacarose (dissacarídeo) por não contar com esta característica é chamado de açúcar não redutor (BRUICE, 2006; SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2003).

Atualmente encontra-se uma tendência em utilizar métodos mais eficientes, rápidos e precisos para quantificação destas substâncias em diferentes matrizes. Dentre as técnicas bem estabelecidas para este fim, destaca-se a espectrometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) (SANTOS et al, 2017). Na literatura podem ser encontrados diferentes métodos colorimétricos para determinação de açúcar redutores e não redutores, como por exemplo: método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI et al., 1945), fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Estes métodos são amplamente utilizados em análises de rotina. Assim, este trabalho propõe a aplicação dos métodos de DNS e fenol-sulfúrico para a determinação de açúcares, de forma a ser possível determinar a quantidade (percentagem) total de açúcares redutores e totais em uma amostra de bebida não alcoólica.

MATERIAL E MÉTODOS

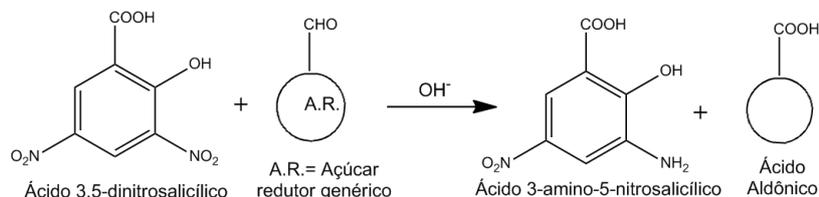
Equipamentos e softwares: As análises foram realizadas no espectrofotômetro UV-VIS marca Varian modelo Cary 50. Os cálculos das concentrações, em $\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ de glicose, foram obtidos com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração. Estas análises foram realizadas no software Microsoft® Excel.

Amostras e reagentes: Seis tipos diferentes de bebidas não alcoólicas foram analisadas neste trabalho. Estas amostras foram adquiridas em supermercados na cidade de Curitiba-PR, foram elas: água de coco, chá, sucos de limão e maracujá e refrigerantes (normal e zero açúcar). Na coleta, as mesmas encontravam-se em temperatura ambiente, com as embalagens seladas, e dentro de seus prazos de validade. Os seguintes reagentes foram utilizados durante as análises: glicose PA, ácido 3,5-dinitrosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$), hidróxido de sódio PA (NaOH), tartarato duplo de sódio e potássio PA ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), bissulfito de sódio PA (NaHSO_3), fenol PA ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), ácido sulfúrico PA (H_2SO_4) e ácido clorídrico PA (HCl).

Método DNS: O ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante presente no reativo DNS), é um composto amarelado, que sob condições alcalinas, reage com

o carbono carbonílico de açúcares redutores e se reduz a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, conforme apresentado na Figura 1. Este ácido apresenta uma coloração avermelhada cuja absorção máxima se dá em 540 nm (GONÇALVES et al., 2010).

Figura 1 – O ácido dinitrosalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino sob aquecimento. A.R.= Açúcar redutor genérico.



Fonte: Adaptado Silva et al., 2003.

A metodologia DNS utilizada será a proposta por Miller (1959). Foram adicionados 4 mL do reagente DNS e 1 mL da amostra. As amostras foram abertas somente na hora do preparo, no caso de refrigerante, a desgaseificação foi realizada em um banho ultrassônico. Depois de pipetados amostras e reativo, foram levadas para aquecimento em banho-maria por 15 minutos à temperatura de 100°C. Em seguida foram resfriadas à temperatura ambiente e os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria Uv-Vis, no comprimento de onda de 540 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e as amostras diluídas a fim de ajustar a concentração dentro da faixa linear do método.

Foi realizada uma adaptação no método para a determinação do teor de açúcares totais, em que, através da hidrólise ácida pode ser obtida a inversão da sacarose. A hidrólise foi realizada de com Zenebon et al. (2005). Após a hidrólise o procedimento para a quantificação dos açúcares totais foi o mesmo utilizado para os açúcares redutores.

Método fenol-sulfúrico: Este método baseia-se no fato de que o açúcar simples, polissacarídeos e seus derivados, incluindo metil-ésteres com grupos redutores livres, na presença de fenol e ácido sulfúrico, geram uma cor alaranjada que é medida na faixa visível e é proporcional à quantidade de açúcar presente na amostra. A reação é sensível e de cor estável (DUBOIS et al., 1956).

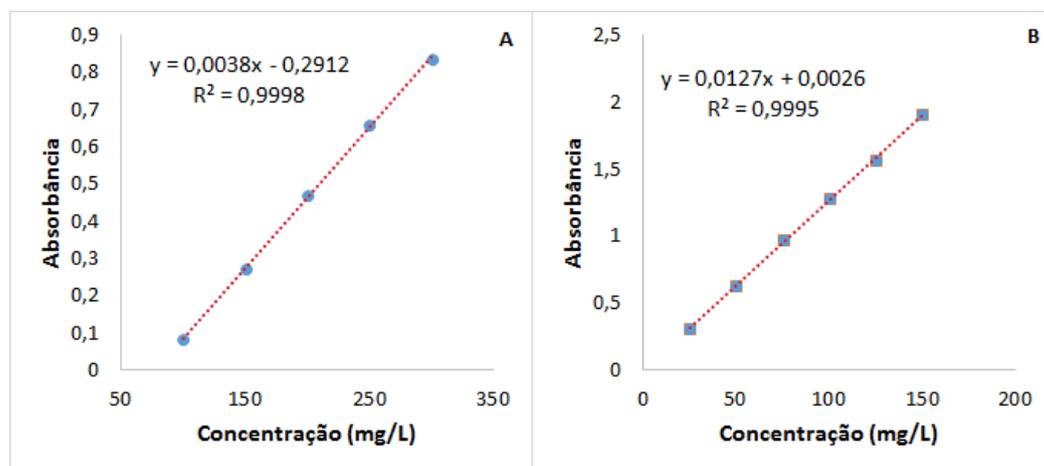
As análises foram realizadas de acordo com DUBOIS et al. (1956). A técnica empregada consiste na adição de 1 mL de fenol 5% a 1 mL de amostra, após adicionar 5 mL de ácido sulfúrico PA às amostras e proceder à leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Conforme a necessidade, as amostras foram diluídas de modo que sua leitura ficasse dentro da faixa linear do método e no caso de refrigerante, a desgaseificação foi realizada em um banho ultrassônico. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 2 apresenta as curvas de calibração, em função da concentração de glicose, para os métodos DNS (Figura 2a) e fenol-sulfúrico (Figura 2b). Ambas as

curvas apresentaram uma relação linear, com coeficiente de correlação superior a 0,99. Para o método DNS, a concentração de glicose variou de 100 a 300 mg·L⁻¹, enquanto que para o método fenol-sulfúrico a concentração de glicose variou de 25 a 150 mg·L⁻¹.

Figura 2 – Curva de calibração obtidas com o método (a) DNS e (b) fenol-sulfúrico.



Fonte: Autoria Própria (2019).

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos em percentagens de açúcares redutores e totais para as seis amostras analisadas neste trabalho.

Tabela 1 – Resultados obtidos na análise de açúcares nas amostras estudadas.

| Amostra | Método DNS | | Método fenol-sulfúrico |
|-------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| | Açúcares redutores (%) | Açúcares Totais (%) | Açúcares Totais (%) |
| Água de coco | 3,41 ± 0,07 | 4,26 ± 0,08 | 4,65 ± 0,33 |
| Chá | 2,53 ± 0,07 | 8,66 ± 0,11 | 8,65 ± 0,20 |
| Suco de Limão | 3,06 ± 0,12 | 9,32 ± 0,25 | 10,18 ± 0,50 |
| Suco de Maracujá | 7,90 ± 0,21 | 10,71 ± 0,13 | 11,37 ± 0,21 |
| Refrigerante | 2,66 ± 0,03 | 10,48 ± 0,28 | 10,27 ± 0,33 |
| Refrigerante Zero | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 |

Fonte: Autoria Própria (2019).

A partir dos resultados, verifica-se que as amostras analisadas apresentam valores de açúcares bem diferentes, que se dá devido à diferença na composição das mesmas. Além disso, observa-se que não é possível quantificar os açúcares presentes no refrigerante zero, visto que nas análises das amostras não ocorreu a mudança de coloração característica para cada metodologia.

É possível verificar ainda que a adaptação do método de DNS para a determinação de açúcares totais, após aplicação de uma hidrólise ácida, mostrou-se eficiente. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, é possível observar uma boa proximidade entre as concentrações obtidas pelo método DNS e fenol-sulfúrico.

Silva et al. (2003) compararam vários métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel observando que as metodologias baseadas no uso da espectrofotometria de UV-Vis apresentam melhores resultados quando comparadas com os métodos clássicos de análise, titulometria e gravimetria.

Outros trabalhos apresentam diferentes métodos de determinação de açúcares redutores e totais em sucos de frutas (LOSSO et al., 2008), batatas cruas (TOMA; LEUNG, 1987), utilizando o método fenol-sulfúrico e em geléias (GRANADA et al., 2005), refrigerantes (SANTOS et al., 2016) e alimentos infantis (HANAN et al., 2012), baseado no método Lane –Eynon.

Ao suco pode ser adicionado açúcar na quantidade máxima de 10% (g açúcar/100 g de suco) no qual deve ser indicado na embalagem que se trata de um suco adoçado. De uma forma aproximada, é possível observar que sucos de limão e maracujá apresentaram teor de açúcar acima ao exigido pela lei. Já em refrigerantes o açúcar adicionado é na proporção de 8% a 12% do produto final sendo que as amostras estudadas não ultrapassaram o limite tolerável (BRASIL, 1994).

Comparando a viabilidade das duas metodologias, apesar do método fenol-sulfúrico ser mais rápido e de simples execução, este apresenta como desvantagem a toxicidade e a quantidade de resíduos gerados. Já o método de DNS é uma ferramenta robusta e prática para a rotina laboratorial com grande volume de amostras a serem processadas, porém também apresenta como desvantagem o uso de altos volumes de amostra e reagente. (DUBOIS et al., 1956; GONÇALVES et al., 2010). Na literatura, podem ser encontrados alguns estudos envolvendo a adaptação destas metodologias, como a redução no tempo de análise e a diminuição do volume de reagente (MASUKO et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2017).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que as diferentes amostras estudadas possuem concentrações distintas de açúcares redutores e totais em suas composições. No refrigerante zero pode-se confirmar a ausência de açúcares redutores e não redutores. Além disso a adaptação do método de DNS, para a quantificação de açúcares totais através da hidrólise ácida, se mostrou eficiente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (LAMAQ-UTFPR).

REFERÊNCIAS

BRASIL. Presidência da república. Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Brasília, 1994.

BRUCE, P. Y. **Química orgânica**. 4. Ed. Volume 2. São Paulo : Pearson Prentice Hall, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p. 167, 1956.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 2046-2048, 2010.

GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B.; SILVA, E. Caracterização física, química, microbiológica e sensorial de geléias light de abacaxi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 629-635, 2005.

HANAN, S. A.; DA SILVA, A. A.; PACHECO, A. M.; SIMÕES, R. H.; ZACARIAS, R. P. Concentração de açúcares presentes em alimentos infantis industrializados consumidos por crianças de Manaus-AM. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 12, n. 3, 419-424, 2012

LOSSO, E. M.; DA SILVA, J. Y. B.; BRANCHER, J. A. Análise do pH, acidez e açúcares totais de sucos de frutas industrializados. **Arquivos em Odontologia**, v. 44, n. 3, 2008.

MASUKO, T., MINAMI, A., IWASAKI, N., MAJIMA, T., NISHIMURA, S. I., LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.

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

SANTOS, A. A. D.; DEOTI, J. R.; MULLER, G.; DÁRIO, M. G.; STAMBUK, B. U.; ALVES, J. S. L. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

SANTOS, G. L.; GEMMER, R. E.; OLIVEIRA, E. C. Análise de açúcares totais, redutores e não-redutores em refrigerantes pelo método titulométrico de Eynon-Lane. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 8, n. 4, 2016.

SILVA, R. D. N. U.; MONTEIRO, V. N. U.; ALCANFOR, J. D.; ASSIS, E. M. U.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

TOMA, R. B.; LEUNG, H. K. Determination of reducing sugars in French fried potatoes by 3, 5-dinitrosalicylic acid. **Food chemistry**, v. 23, n. 1, p. 29-33, 1987.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. In: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 2005.