



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica



Componente Prática



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica

Quantificação de Açúcares

Palavras-chave (Caderno Laboratório): métodos de quantificação; importância

INTRODUÇÃO

Os monossacarídeos (ou Oses) são compostos simples de C, H, O como, por exemplo, a glicose (aldose) e frutose (cetose) contendo 3 a 7 C. Os oligossacarídeos e os polissacarídeos são formados por moléculas de monossacarídeos unidas por ligações hemiacetálicas. 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-amino5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor.

O método consiste na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) em ácido 3-amino-5-nitro salicílico por açúcares redutores, resultando na formação de complexos coloridos. A molécula de glicose quando se encontra na forma de anel cíclico não possui carbonilo livre para ser oxidada. No entanto, a forma linear dos açúcares redutores mantém-se em equilíbrio com a forma cíclica em solução aquosa, permitindo que o carbonilo seja oxidado pelo reagente de Ácido Dinitrosalicílico (DNS), formando um composto colorido (ácido 3-amino-5-dinitro salicílico) cuja coloração varia em tons de amarelo e vermelho. Quanto mais intensa é a coloração, maior a quantidade dessa substância presente no meio.

OBJECTIVO DO TRABALHO

Quantificar os açúcares numa amostra

Realizar a hidrólise química

REAGENTES

- ✚ **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):** 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 metabisulfito de sódio. Agitar e armazenar a solução em frasco âmbar em refrigerador, por no máximo 30 dias.
- ✚ **Hidróxido de sódio (NaOH 2N):** Pesar 40 g de hidróxido de sódio anidro, diluir em água destilada e ajustar o volume para 500 mL, em balão volumétrico.
- ✚ **Ácido clorídrico (HCl 2N):** Medir 85 mL de ácido clorídrico (HCl), diluir em água destilada e ajustar volume para 500 mL, em balão volumétrico
- ✚ **Tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆.4H₂O):** Pesar 15,1 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado e dissolver num litro de água destilada. Armazenar a solução em frasco âmbar em temperatura ambiente até 30 dias.
- ✚ **Metabisulfito de sódio e fenol**

MATERIAL e EQUIPAMENTO

Pipetas de 1mL e 5 mL
Tubos de ensaio
Erlenmeyer
Proveta
Espectrofotômetro

PROCEDIMENTO

1.1 Preparação da amostra:

Depuração: Transferir 1 mL ou 1 g de amostra macerada para balão volumétrico de 100 mL, depurando a amostra com 5 mL de Carrez I e 5 mL de Carrez II. Completar o volume com água destilada, agitar e assim que formar precipitado branco

filtrar. O filtrado deve ser guardado no frio, por 3 dias. Caso se aumente o tamanho da amostra, respeitar proporção amostra: reagentes.

- **Diluição da amostra:** Diluir convenientemente a amostra, de maneira a ficar dentro da gama de trabalho (pe. 10x)

Tempo de conservação do extrato: Guardar o extrato por 3 dias no congelador, verificar o pH do extrato para ver condições ao desenvolvimento de microrganismos.

1.1.1 Reta padrão de glicose

Fazer diluições de 0 a 1 g/L a partir da solução padrão de 1,0 g/L de glicose ou frutose com água destilada em tubos de ensaio. Agitar os tubos para homogeneização, retirar uma alíquota de 0,5 ou 1,0 mL e fazer o teste de DNS.

1.1.2 Hidrólise da amostra

- Caso a amostra contenha açúcares não-redutores como a sacarose, é necessário fazer hidrólise da amostra.
- Neste caso, retirar 2,0 mL da amostra, adicionar 2,0 mL de HCl 2N, tapar erlenmeyer e aquecer em banho-maria em ebulição por 10 minutos.
- Arrefecer a amostra em banho de gelo e acrescentar 2,0 mL de NaOH 2N e agitar. Na hidrólise o pH deve estar acima de 4.
- Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de DNS.

1.1.3 Ensaio DNS

- Pipetar 1,0 ou 0,5 mL da amostra em um tubo de ensaio e adicionar 1,0 mL ou 0,5 mL do reagente DNS. Adicionar o reagente DNS apenas quando a água estiver em ebulição. Tapar os tubos, agitar e aquecer em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Resfriar o tubo em banho de gelo por 5 minutos. Completar para volume de 5 mL.
- O branco consiste em substituir o volume de amostra ou solução de glicose por água destilada (1,0 ou 0,5 mL) e realizar o teste de DNS.
- Ler a absorvância a 540 nm, após calibração do espectrofotómetro com o branco.

1.1.4 Cálculo da concentração – usar a recta de calibração