

***Protocolos de análises para
polpa de açaí: um guia
prático de consulta***

***Tatiane Regina Albarici
Danieli Melo de Freitas
José Dalton Cruz Pessoa***



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Protocolos de análises para
polpa de açaí: um guia
prático de consulta**

Tatiane Regina Albarici
Danieli Melo de Freitas
José Dalton Cruz Pessoa

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Capa: Manoela Campos
Editoração eletrônica: Manoela Campos

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

A327p Albarici, Tatiane Regina
Protocolos de análise para polpa de açaí: um guia prático de consulta./
Tatiane Regina Albarici, Danieli Melo de Freitas, José Dalton Cruz
Pessoa. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.
48 p.

ISBN 978-85-86463-19-8.

1. Açaí. 2. Protocolos. I. Freitas, Danieli Melo de. II. Pessoa, José
Dalton Cruz. III. Título.

CDD 21 ED 634.6
004.62

Autores

Tatiane Regina Albarici

Doutora em Ciências-área Química Orgânica

Pós-doutoranda

Embrapa Instrumentação Agropecuária

São Carlos – SP

tatianealbarici@gmail.com

Danieli Melo de Freitas

Graduada em Química

Mestranda pelo PPG Biotecnologia/UFSCar

Embrapa Instrumentação Agropecuária

São Carlos – SP

danielifreitas@yahoo.com.br

José Dalton Cruz Pessoa

Doutor em Ciências

Pesquisador A

Embrapa Instrumentação Agropecuária

R. XV de Novembro 1452,

São Carlos – SP, CEP 13.560-970,

dalton@cnpdia.embrapa.br

Apresentação

O açaí se popularizou como um alimento energético e saudável cuja polpa de sabor exótico vem ganhando espaço no mercado internacional. A exportação da polpa congelada aumentou com o interesse no potencial uso do açaí como nutracêutico devido a sua atividade antioxidante, atribuída aos compostos fenólicos. Atualmente uma grande diversidade de mixers de açaí está disponível no mercado.

O Laboratório de Instrumentação em Pós-colheita (LIPCo) da Embrapa Instrumentação Agropecuária tem um programa de estudo da cadeia do açaí: projetos sobre a anatomia do frutos; seu tempo de vida útil; métodos de análise da bebida; técnicas de processamento e o aproveitamento do resíduo da agroindústria.

A aproximação do laboratório com indústrias processadoras de açaí do Nordeste Paraense, a maior região produtora, indicou a necessidade de padrões de qualidade e a busca por polpas com atividade antioxidante comprovada é uma necessidade cada vez mais frequente na agroindústria do açaí. A garantia da qualidade é um dos fatores que agrega valor ao produto.

A idéia deste guia prático nasceu da necessidade de um documento simples e didático contendo protocolos de análise da bebida de açaí que possam ser utilizados nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias, em laboratórios de pesquisa ou no desenvolvimento de novos produtos.

Dr. *Álvaro Macedo da Silva*
Chefe Geral Embrapa Instrumentação Agropecuária

Informações de segurança

Todos os protocolos descritos neste guia fazem uso de reagentes químicos com diferentes graus de periculosidade. Para a manipulação correta dos reagentes é de extrema importância a consulta dos rótulos e das fichas de segurança que acompanham os reagentes ou mesmo que podem ser acessadas através da internet nos sites das empresas que fornecem os mesmos.

O uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas e máscaras adequadas para cada reagente, óculos de segurança, sapatos apropriados e avental é de fundamental importância em qualquer laboratório químico. Os produtos ou reações que liberam vapores como devem ser manipulados em capelas.

Sumário

Introdução	13
Protocolo 1 - Teor de antocianinas totais	15
Protocolo 2 - Polifenóis totais	21
Protocolo 3 - Atividade enzimática	25
Protocolo 4 - Atividade antioxidante pelo método orac	33
Protocolo 5 - Análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	39
Protocolo 6 - Análise de açúcares	43

Lista de abreviaturas

MM = massa molecular

L = microlitros

FD = fator de diluição

v/v = relação volume do soluto por volume da solução

= comprimento de onda

$\lambda_{\text{vis-max}}$ = comprimento de onda máximo na região do visível

= absortividade molar

S_M = solução mãe

S = solução

U = unidade de atividade

AUC = área sobre a curva

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

nm = nanômetros

Introdução

O consumo do açaí começou a ser ampliado no final da década de 1990 com a industrialização e congelamento da polpa vendida aos mercados nacional (especialmente Rio de Janeiro, São Paulo) e internacional.

A procura crescente do açaí deve-se ao poder antioxidante dos compostos fenólicos, dentre eles as antocianinas, que também são responsáveis pela cor característica da polpa. O aumento da demanda também traz a necessidade de métodos de monitoramento da qualidade, tanto do produto a ser consumido in natura quanto do produto a ser reprocessado. Em 2000 foi publicada uma instrução normativa no Diário Oficial da União¹ com o intuito de estabelecer os padrões mínimos de identidade e qualidade para a polpa de açaí (produto sem adição de água) e para o açaí (fino, médio ou grosso) destinados ao consumo como bebida, onde foram estabelecidos valores máximos e mínimos para propriedades físico-químicas como sólidos totais, lipídeos totais, carboidratos totais e proteínas e açúcares totais.

Este guia descreve métodos de análises químicas adaptadas ao açaí e à polpa de açaí. Os autores têm a intenção de disponibilizar um de guia de análise com métodos que podem ser facilmente reproduzidos, tanto no meio acadêmico quanto nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias processadoras. Os protocolos foram desenvolvidos a partir de métodos amplamente difundidos na literatura e tem aplicação em diferentes fases da cadeia, como no processamento, transporte e armazenamento da polpa, e no desenvolvimento de novos produtos.

Nos protocolos 1 e 5 estão detalhados procedimentos para a avaliação dos teores de antocianinas totais, compostos responsáveis pela cor característica do açaí que, juntamente com os demais polifenóis, são responsáveis pelo potencial antioxidante da polpa.

A análise dos polifenóis totais, descrita no protocolo 2, juntamente com os procedimentos descritos nos protocolos 1 e 5, monitoram a presença de compostos com comprovada atividade antioxidante. Esta

¹BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 01, de 7 de Janeiro de 2000. Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. Diário Oficial da União, 10 janeiro 2000. Seção 1, p. 54-58.

capacidade pode ser diretamente avaliada pelo método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) descrita no protocolo 3.

O protocolo 4 descreve a avaliação de atividade das enzimas peroxidase e polifenoxidase, responsáveis pela elevada perecibilidade do açaí pois atuam na oxidação dos compostos fenólicos. Sua atividade é um índice da velocidade de degradação dos mesmos e servem como parâmetro para avaliação da etapa de pasteurização da polpa. Além disso, a avaliação dos teores de açúcares descrita no protocolo 6 é útil para a averiguação do enquadramento da polpa nas normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Protocolo 1 - Teor de Antocianinas Totais

Reagentes

- Cloreto de potássio (KCl)

MM=74,551g/mol

Observações: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

- Acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)

MM=136,08 g/mol

Observações: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

- Metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$)

MM=222,32 g/mol

Observações: contato com ácidos libera gases tóxicos. Irritante para o sistema respiratório. Risco de danos sérios no contato com os olhos.

Se inalado levar a vítima para local arejado, chamar um médico. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo) e chamar um médico.

- Ácido clorídrico (HCl)

MM=36,4610g/mol

Observações: Causa queimaduras, manipular usando luvas.

Irritante ao sistema respiratório, manipular em capela ou utilizando máscara.

Se inalado levar a vítima para local arejado, chamar um médico. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância aplicar levemente polietileno glicol 400. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo), evitar vômito (risco de perfuração) e chamar um médico (não tentar neutralizar).

Materiais

- Espectrofotômetro UV-vis -Agitador magnético -Balança analítica
- Medidor de pH
- Pipetas de 100-1000 L e de 1000-5000 L

Preparo das Soluções

Tampão cloreto 0,025 mol/L pH=1

Pesar 1,86 g KCl e diluir em 980mL de água destilada em um copo de Becker. Medir o pH e ajustar para 1,0 com HCl. Transferir para um balão volumétrico de 1L e completar o volume com água destilada.

Observação: A solução é estável mesmo quando mantida a temperatura ambiente por alguns meses, porém o pH deve ser verificado antes do uso.

Tampão acetato 0,4 mol/L pH=4,5

Pesar 54,43 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e diluir em 960mL de água destilada em um copo de Becker. Medir o pH e ajustar para 4,5 com HCl. Transferir para um balão volumétrico de 1L e completar o volume com água destilada.

Observação: A solução é estável mesmo quando mantida a temperatura ambiente por alguns meses, porém o pH deve ser verificado antes de cada uso.

Solução de metabissulfito de potássio

Pesar 1 g de metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) transferir para um balão volumétrico de 5mL e completar com água destilada.

Observação: Este reagente deve ser preparado no mesmo dia das medidas. A mudança de coloração da solução (de incolor para amarelo) pode contribuir com a absorbância medida e interferir na quantificação.

Preparo da Amostra:

O preparo da amostra está diretamente ligado à determinação do fator de diluição (FD) apropriado para as análises. Este fator é determinado pela diluição de uma quantidade conhecida de amostra em tampão cloreto pH=1,0 deixando-se em equilíbrio a temperatura ambiente e protegida da luz por 30 minutos. Fazer a medida de absorbância. *Observação:* para não exceder a capacidade tamponante da solução tampão a amostra não deve exceder 20% do volume total. O fator de diluição ideal é obtido quando o valor de absorbância máxima na região do visível é menor do que 1,0. O fator de diluição é calculado dividindo-se o volume final da solução pelo volume de amostra diluído. Diluições em série devem ser consideradas no cálculo do fator de diluição, por exemplo: para a solução de açaí preparada com proporção de 1 parte de polpa para 2 partes de água (v/v) temos um fator de diluição de 3. Posteriormente se utilizarmos 0,5 mL desta solução de açaí e completarmos o volume para 10 mL de tampão pH= 1,0 teremos um segundo valor de fator de diluição de 20. Portanto para os cálculos finais o Fator de diluição será: $DF = (3 \times 20) = 60$.

Após a determinação do fator de diluição preparar a amostra de acordo com os valores obtidos.

Para polpa com 12% de matéria seca (açaí médio):

Medir 1 volume de polpa e adicionar 2 volumes de água destilada. Deixar em agitação por 40 minutos. Centrifugar a solução e separar o sobrenadante para análise.

1.1 - Antocianinas Monoméricas - Método do pH-Diferencial

Análises

- Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes de fazer as medidas;
- Utilizar água destilada como branco;
- Preparar as diluições da amostra: uma em tampão cloreto pH= 1,0 e outra em tampão acetato pH= 4,5 de acordo com o valor de fator de diluição previamente calculado;
 - Para polpa com 12% de matéria seca (açaí médio): adicionar 500 L da amostra a um balão volumétrico de 10 mL e completar com o tampão;
 - Deixar em equilíbrio a temperatura ambiente e na ausência de luz por 30 minutos;

Observação: o tempo de equilíbrio deve estar entre 15min e 1h após a adição do tampão, pois tempos maiores tendem a aumentar os valores observados.

- Acompanhar a absorbância no comprimento de onda do visível no qual a absorbância é máxima ($A_{vis-max}$) e a 700nm (para corrigir o espalhamento de luz produzido por uma possível turbidez da amostra);
- Fazer as medidas em triplicata.

Resultados e Expressão dos Resultados

A concentração das antocianinas totais será calculada através da seguinte fórmula:

$$C(mg/L) = \frac{[(A_{vis\ max}^{pH\ 1.0} - A_{700nm}^{pH\ 1.0}) - (A_{vis\ max}^{pH\ 4.5} - A_{700nm}^{pH\ 4.5})]}{MM \cdot DF \cdot 1000} \cdot 1$$

Onde a diferença dos valores de absorvidade em pH= 1,0 e pH= 4,5 é diretamente proporcional a concentração de antocianinas, com o cálculo baseado na cianidina-3-glicosídeo, com massa molecular (MM) de 449,2 g/mol e absorvidade molar () de 26.900.

1.2 - Índice de Degradação de Pigmento, Cor Polimérica e Browning

Análises

- Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes de fazer as medidas;
- Utilizar água destilada como branco;
- Preparar uma diluição da amostra com água de acordo com o valor do fator de diluição previamente calculado;
- Transferir 2,8 mL da amostra diluída para dois tubos de ensaio protegidos da luz;
- Ao primeiro adicionar 0,2mL de solução de metabissulfito de potássio e ao segundo 0,2mL de água. Deixar equilibrar por 30 minutos;
- Realizar as medidas de absorvância a 420, $A_{vis-max}$ e a 700nm.

Resultados e Expressão dos Resultados

O cálculo da densidade (DC) de cor é feito através da fórmula:

$$DC = \frac{A_{420nm} - A_{700nm}}{A_{vis-max} - A_{700nm}} \cdot DF$$

A cor polimérica (CP) das amostras descoradas com metabissulfito é calculada como a seguir:

$$CP = \frac{A_{420nm} - A_{700nm}}{A_{vis-max} - A_{700nm}} \cdot DF$$

A porcentagem da cor polimérica (%CP) é calculada da seguinte forma:

$$\%CP = CP / DC \cdot 100$$

Literatura consultada

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. **Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 2001. (Current Protocols in Food Analytical Chemistry).

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, Beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, p. 1269–1278, 2005.

Protocolo 2 - Polifenóis Totais

Reagentes

-Reagente de Folin-Ciocalteu

Mistura dos ácidos fosfotungstíco ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, se necessário consultar um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância chamar um médico.

-Carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3)

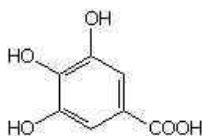
MM=105,99g/mol

Observação: Irritante aos olhos.

Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância.

-Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) ($C_6H_2(OH)_3COOH$)

MM=170,12 g/mol



Observação: Irritante para os olhos, nariz e garganta. Se inalado pode causar tosse ou dificuldade respiratória. Irritante para a pele.

Se inalado e a respiração for dificultada, aplicar oxigênio ou fazer respiração artificial. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, se necessário consultar um oftalmologista.

-Acetona ((CH₃)₂CO)
MM=58,08g/mol

Observação: Altamente inflamável. Irritante aos olhos. Exposição repetida pode causar ressecamento e rachaduras na pele. Inalação de vapores pode causar sonolência e vertigem. Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas e consultar um oftalmologista. Se ingerido, em caso de vômito risco de aspiração. Manter as vias aéreas livres. Chamar um médico imediatamente.

Lista de Materiais

- Espectrofotômetro UV-vis
- Agitador magnético -Balança analítica
- Pipetas de 20-200 L, de 100-1000 L e de 1000-5000 L

Preparo das Soluções

1- Solução de Folin 2/10

Em um balão volumétrico de 50mL transferir 10mL de reagente de Folin Ciocalteau e completar o volume com água destilada. Observação 1: A solução deve ser preparada no mesmo dia da análise transferida para um frasco âmbar e mantida sob refrigeração até o momento da análise.

Observação 2: 50mL de solução é suficiente para a análise de 20 amostras.

2- Solução carbonato de sódio 75g/L

Em um copo de Becker pesar 3,75g de carbonato de sódio adicionar água destilada e manter sob agitação até a dissolução de todo o sólido. Transferir a solução para um balão volumétrico de 50mL (lavando o copo de Becker pelo menos 3 vezes) completar o volume com água destilada.

Observação 1: A solução deve ser preparada transferida para um frasco âmbar e mantida sob refrigeração até o momento da análise. Esta solução se conserva por até 3 dias sob refrigeração.

Observação 2: 50mL de solução é suficiente para a análise de 25 amostras.

3- Solução de ácido gálico

Solução mãe (SM): pesar 0,5g de ácido gálico e diluir em 100mL de água.

Solução de trabalho: adicionar o volume indicado na Tabela 2.1 em balões volumétricos de 10mL.

Tabela 2.1. Diluições do padrão (ácido gálico) para a construção da curva de calibração.

Diluições	Conc. (mmol/L)	Vol. de sm (L)
1	25	50
2	20	40
3	15	30
4	10	20
5	5	10
6	branco	0

Preparo da Amostra

Fazer a extração com 7mL de acetona em 3g de polpa fresca livre de óleo ou 10 mL de solução acetona água 3:7 em 0,5g de polpa liofilizada livre de óleo. Deixar sob agitação durante 20 minutos e filtrar.

Diluir 100 L do extrato em 9,9 mL de água.

Análises

- Adicionar a um tubo de ensaio 500uL de água (branco), ácido gálico (padrão) ou amostra diluída.;

- Adicionar 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, deixar em repouso durante 2 minutos a temperatura ambiente;

- Adicionar 2 mL de carbonato de sódio , agitar com vortex e deixar em repouso durante 15 minutos em um banho de água a 50°C;

- Esfriar rapidamente em um banho de gelo;
- Realizar as leituras da absorvância a 760nm. Neste método o reagente Folin-Ciocalteu que é mistura de ácidos fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos de tungstio (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}) de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 760nm; - Todas as análises realizadas em triplicata.

Resultados e Expressão dos Resultados

O valor de absorvância do branco é subtraído dos valores de absorvância obtidos para o padrão e para as amostras.

Construir o gráfico dos valores de absorvância por concentração de ácido gálico.

Interpolar os valores de absorvância obtidos para a amostra. Fazer as correções dos fatores de diluição.

Os valores de fenólicos totais são expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de sólidos totais).

Literatura consultada

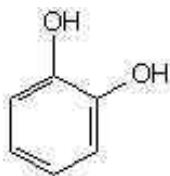
GEORGE, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J.; Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

Protocolo 3 - Atividade Enzimática

3.1-Polifenoloxidase

Reagentes

- Pirocatecol ($C_6H_6O_2$)
MM=110,11g/mol



Observação: Prejudicial à saúde quando em contato com a pele ou se ingerido. Irrita os olhos e a pele. Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância e chamar um médico. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, chamar um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância e chamar um médico.

- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
136,09g/mol

Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

- Fosfato potássio dibásico (K_2HPO_4)
174,18g/mol

Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, consultar um oftalmologista se necessário. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

Lista de Materiais

- Espectrofotômetro UV vis
- Agitador magnético -Balança analítica
- Pipetas de 100-1000 L e de 1000-5000 L
- Centrífuga
- Banho termostático

Preparo das soluções

1-Tampão fosfato de sódio 0,1M pH= 7,0

Solução A - 2,17725g de K_2HPO_4 em 250 mL de água.

Solução B - 13,609g de KH_2PO_4 em 1L de água.

Tampão fosfato – mistura-se as soluções para a obtenção do pH desejado (7,0)

2- Catecol 60 mmol/L

Pesar 0,330g de catecol e diluir em 50mL de tampão pH= 7,0 em um balão volumétrico. Proteger da luz e manter a solução em gelo até o momento das análises.

A solução deve ser preparada pouco antes de fazer as medidas, pois o substrato é instável.

Preparo da Amostra

Extrato bruto enzimático

Para a polpa

O extrato bruto é preparado sob agitação e em banho de gelo com adição de tampão fosfato pH= 7,0 a polpa de açaí durante 20 minutos. A solução é centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante é recolhido e diluído de forma que a absorbância não ultrapasse 1,000 para que a lei de Lambert-Beer seja respeitada.

Análises

- Adicionar a uma cubeta 2,8mL de solução de catecol (60mmol/L);
- Adicionar 200 mL de extrato enzimático;
- Acompanhar a reação representada na Figura 3.1 a $\lambda = 410\text{nm}$ (comprimento de onda de absorção da benzoquinona) a temperatura constante de 25°C durante 1 minuto.

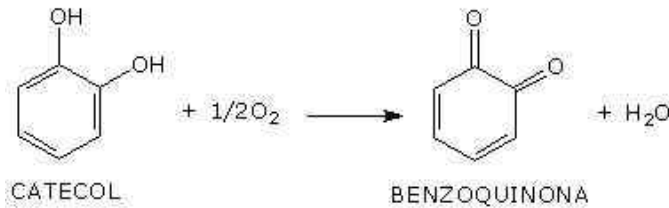


Fig. 3.1. Reação de oxidação do catecol a benzoquinona, catalisada pela enzima polifenoloxidase.

Resultados e Expressão dos Resultados

Fazer o gráfico de absorbância por tempo em segundos e obter o coeficiente angular da melhor reta (considerando só o período em que a atividade é linear).

A unidade de atividade por mL de polpa é calculada pela fórmula:

$$U / \text{mL} = (\text{abs} \cdot FD \cdot 1000) / (t \cdot V)$$

Onde:

FD é o fator de diluição utilizado

t é o tempo em minutos

é o coeficiente de extinção molar do produto da reação (o-benzoquinona)

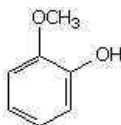
V é o volume do extrato bruto utilizado na preparação da amostra.

3.2 - Peroxidase

Reagentes

-Guaiacol ($C_7H_8O_2$)

MM=124,14 g/mol



Observação: Perigoso se ingerido. Irritante aos olhos e a pele.

Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas e chamar um oftalmologista. Se ingerido imediatamente fazer com que a vítima beba em abundância. Chamar um médico. Administrar carvão ativado em suspensão.

- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

MM=34,02 g/mol

Observação: Irritante ao sistema respiratório e pele. Risco de danos sérios aos olhos.

Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância, chamar um oftalmologista imediatamente. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância, chamar um médico.

- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)

MM=136,09g/mol

Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

- Fosfato potássio dibásico (K_2HPO_4)
MM=174,18g/mol

Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, consultar um oftalmologista se necessário. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

Lista de Materiais

- Espectrofotômetro UV-vis
- Agitador magnético -Balança analítica
- Pipetas de 100-1000 L e de 1000-5000 L
- Centrífuga
- Banho termostático

Preparo das Soluções

1-Tampão fosfato de sódio 0,1mol/L pH= 7,0

Solução A - 2,17725g de K_2HPO_4 em 250 mL de água.

Solução B - 13,609g de KH_2PO_4 em 1L de água.

Tampão fosfato – mistura-se as soluções para a obtenção do pH desejado (7,0).

2- Guaiacol 40mmol/L

Pesar 0,2484g de guaiacol e diluir em 50mL de tampão pH=7,0 em um balão volumétrico. Proteger da luz e manter a solução em gelo até o momento das análises.

A solução deve ser preparada pouco antes de fazer as medidas, e mantido em banho de gelo, pois o substrato é instável.

3-Peróxido de Hidrogênio 4mmol/L

Preparo da Amostra

Extrato bruto enzimático

O extrato bruto é preparado sob agitação e em banho de gelo com adição de tampão fosfato pH=7,0 a polpa de açaí durante 20 minutos. A solução é centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante é recolhido e diluído de forma que a absorvância não ultrapasse 1,000 para que a lei de Lambert-Beer seja respeitada.

Análises

- Adicionar a uma cubeta 2,5mL de solução de guaiacol (40mmol/L);
- 300 L de peróxido de hidrogênio (4mmol/L);
- 200 L de extrato enzimático;
- Acompanhar a reação representada na Figura 3.2 a $\lambda = 470\text{nm}$ (comprimento de onda de absorção do tetraguaiacol) a temperatura constante de 25°C durante 1 minuto.

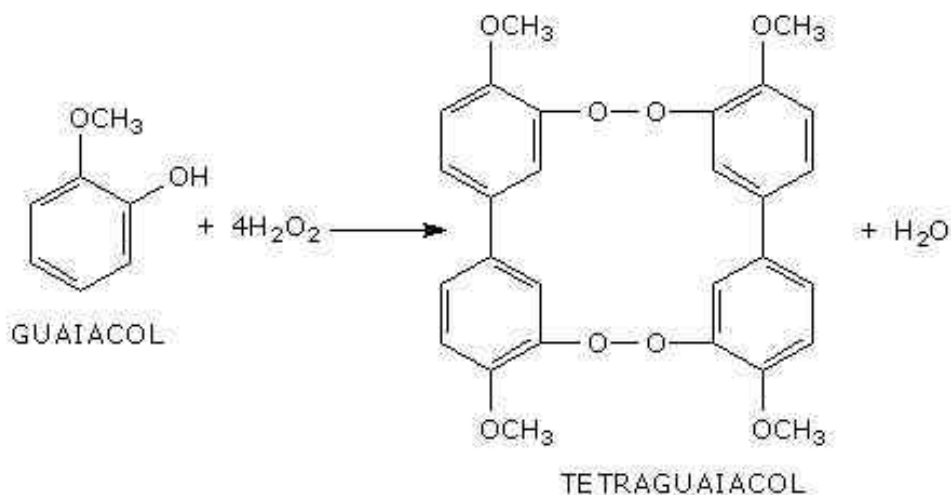


Fig. 3.2. Reação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio catalisada pela enzima peroxidase, formando tetraguaiacol.

Resultados e Expressão dos Resultados

Fazer o gráfico de absorvância por tempo e obter o coeficiente angular da melhor reta (considerando só o período em que a atividade é linear).

A unidade de atividade por mL de polpa é calculada pela fórmula:

$$U / mL = (abs \cdot FD \cdot 1000) / (t \cdot V)$$

FD é o fator de diluição utilizado.

t é o tempo em minutos.

E é o coeficiente de extinção molar do produto da reação (tetraguaiacol).

V é o volume do extrato bruto utilizado na preparação da amostra.

Literatura consultada

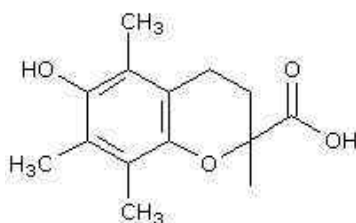
ROGEZ, H. **Açaí**: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Belém, PA: EDUFPA, 2000. 313 p.

FATIBELO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso Analítico de Tecidos e de Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

Protocolo 4 - Atividade Antioxidante pelo Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

Reagentes

- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid)
($C_{14}H_{18}O_4$)
MM=250,29g/mol

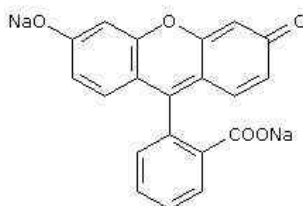


Solubilidade: Etanol (160 mg/mL), metanol, ou H₂O (0.5 mg/mL)

Observação: Irritante ao sistema respiratório, olhos e a pele.
Perigoso se ingerido.

Se inalado levar a vítima para local arejado, em caso de parada respiratória aplicar imediatamente ventilação mecânica, chamar um médico imediatamente. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância, cobrir a área afetada com um emoliente e consultar um médico. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante pelo menos 15 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido não causar vômito e chamar um médico imediatamente.

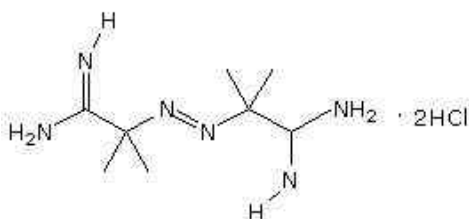
- Fluoresceína sódica ($C_{20}H_{12}O_5$)
MM= 376,28g/mol



Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas, consultar um oftalmologista se necessário. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância.

-AAPH - 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (C₈H₁₈N₆.2HCl)

MM= 71,20g/mol



Observação: Pode ser nocivo se ingerido. Pode causar reação alérgica em contato com a pele. Pode causar danos aos seguintes órgãos: pulmões, sistema digestivo trato gastrointestinal, pele, cabeça e estômago.

Se inalado levar a vítima para local arejado, em caso de parada respiratória aplicar imediatamente ventilação mecânica, chamar um médico imediatamente. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância durante 15 minutos, chamar um médico imediatamente. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante pelo menos 15 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido não causar vômito e chamar um médico imediatamente.

- Fosfato de sódio monobásico NaH₂PO₄
119,01g/mol

Observações: Se inalado levar a vítima para local arejado, em caso de parada respiratória aplicar imediatamente ventilação mecânica, chamar um médico imediatamente. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância e chamar um médico imediatamente. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante pelo menos 15 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido não causar vômito e chamar um médico imediatamente.

- Fosfato de sódio de sódio dibásico



268,07g/mol

Observações: Se inalado levar a vítima para local arejado, em caso de parada respiratória aplicar imediatamente ventilação mecânica, chamar um médico imediatamente. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância e chamar um médico imediatamente. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante pelo menos 15 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido não causar vômito e chamar um médico imediatamente.

Lista de Materiais

-Fluorímetro

-Cubetas medidas de fluorescência

-Agitador magnéticos

-Balança analítica

-Pipetas de 20-200 L e de 100-1000 L

-medidor de pH

-banho termostático

Preparo das Soluções

1- Tampão fosfato pH= 7,4

Solução A- 2,40 g de NaH_2PO_4 em 100 mL de água destilada em balão volumétrico.

Solução B- 26,81g de $\text{Na}_2\text{HPO}_{4,7}\text{H}_2\text{O}$ em 500 mL de H_2O em balão volumétrico.

Misturar 71mL da solução A e 304mL da solução B em balão volumétrico de 1L, completar o volume com água. Se necessário ajustar o pH para 7,4.

2- Fluoresceína $16,371 \cdot 10^{-8}$ mol/L em tampão fosfato

Solução Mãe (SM): 10,00mg de fluoresceína em 50mL de tampão fosfato (53,15mmol/L). Solução de trabalho: 15,4 L de SM em 50 mL de tampão fosfato.

Observações: a solução mãe pode ser preparada e mantida sob refrigeração por aproximadamente 1 mês em frasco âmbar, já a solução de trabalho deve ser preparada no mesmo dia da análise.

3- Solução de AAPH 178 mmol/L em tampão fosfato

Solução de trabalho: 241,3 mg em 5 mL de tampão Observação: A solução de AAPH deve ser preparada no mesmo dia da análise mantida sob refrigeração até o momento da análise e protegida da luz (envolver o balão volumétrico com papel alumínio).

4- Solução de trolox Solução Mãe (S_M): 20,51mg em 10mL de tampão fosfato.

O trolox deve ser pesado em balança analítica precisa. Devido a sua baixa solubilidade em água deve ser adicionado etanol (aprox. 1mL) até a dissolução total do sólido e só então o tampão fosfato é adicionado.

Solução 1: Diluir uma alíquota de 500 L da S_M em 50 mL de tampão fosfato.

Soluções de trabalho: são preparadas 6 soluções em balões volumétricos de 10mL segundo a Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Diluições do padrão (Trolox) para a construção da curva de calibração.

Diluições	Conc. (mol/L)	Vol. de s ₁ (mL)
1	40	5,00
2	30	3,75
3	20	2,50
4	10	1,25
6	branco	0

Preparo da Amostra

As diluições da amostra são feitas de maneira que a intensidade de fluorescência na mesma decaia num intervalo de tempo menor que o padrão de trolox a 40 mol/L e maior que o trolox a 5 mol/L.

Análises

Adicionar:

- 1,50 mL de solução de trabalho de fluoresceína (Conc. final 63mmol/L);
- 0,75 mL de tampão (branco), trolox (padrão) ou amostra;
- Deixar a 37°C durante 5 minutos;
- Adicionar 0,75mL de solução de trabalho de AAPH;
- Seguir a fluorescência ($\lambda_{ex}=485\text{nm}$ e $\lambda_{em}=520\text{nm}$) a cada minuto. O pico de absorção da fluoresceína está entre 450 e 500 nm e o de emissão entre 510 e 550 nm.

Resultados e Expressão dos Resultados

Determinar a Área sob a curva (AUC_{bruta}) de cada padrão e subtrair a área sob a curva do branco encontrando a área líquida ($AUC_{líquida}=AUC_{bruta}-AUC_{branco}$) como demonstrado na Figura 4.1.

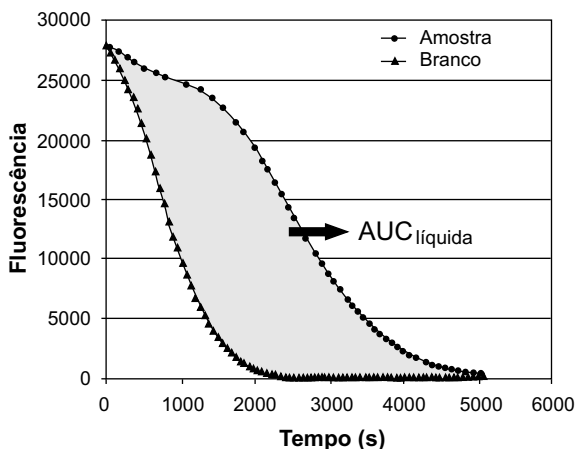


Fig. 4.1. Curva do decaimento da fluorescência em função do tempo para uma amostra antioxidante (azul) e para o Branco (em vermelho), a área cinza corresponde a área líquida ($AUC_{líquida}=AUC_{bruta}-AUC_{branco}$).

Construir um gráfico de $AUC_{líquida}$ por concentração de trolox (M).

Calcular a Área líquida ($AUC_{líquida} = AUC_{amostra} - AUC_{branco}$) para cada concentração da amostra.

Interpolarm o resultado ao gráfico do padrão (trolox).

Fazer as correções dos fatores de diluição a fim de encontrar um resultado expresso em mol/L Trolox equivalente por grama matéria seca ou por ml de solução.

Controle de Réplicas

As análises devem ser feitas em triplicata.

O coeficiente de variação ((desvio padrão/média)x100) não deve ultrapassar 5%.

Literatura consultada

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxigen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 304-309, 1997.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. Supplements, Easton, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

Protocolo 5 - Análise de Antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Reagentes

- Água Milli Q H_2O
MM= 18,00g/mol

- Acetonitrila Grau HPLC (CH_3CN)
MM= 41,05 g/mol

Observações: Líquido inflamável. Pode causar danos sérios nos olhos.

Se inalado levar a vítima para local arejado, em caso de parada respiratória aplicar ventilação mecânica ou máscara de oxigênio se necessário. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância e chamar um médico. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas e consultar um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo).

- Ácido fórmico (CH_3COOH)
MM= 46,30 g/mol

Observação: Causa queimaduras graves.

Se inalado levar a vítima para local arejado, chamar um médico. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância aplicar levemente polietileno glicol 400. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas por pelo menos 10 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância (se necessário, vários litros), evitar vômito (risco de perfuração) e chamar um médico (não tentar neutralizar).

Lista de Materiais

- Cromatógrafo Líquido
- Detector de ultravioleta

- Agitador magnético
- Balança analítica
- Pipetas de 20-200 L e de 100-1000 L
- Seringa de 50 L
- Medidor de pH
- Coluna Phenomenex®-geminiC₁₈ (150x4,6 mm, 5 mm)
- filtro de Nylon 0,45 L, 25mm

Preparo dos Reagentes

1-Fase móvel A: água acidificada pH= 2,0

Acidificar a água mili Q com ácido fórmico até atingir o pH= 2,0. Degaseificar a fase móvel em equipamento de ultrassom durante 30 minutos antes de utilizá-lo.

1-Fase móvel B: acetonitrila

Degaseificar a acetonitrila durante 30 minutos em equipamento de ultrassom antes de utilizar.

Preparo da Amostra

A extração de antocianinas é feita através da adição de metanol acidificado na polpa. Centrifugar a amostra. Filtrar em membrana de nylon com poro de 0,45 m.

Análises

-Inicialmente fazer a purga do equipamento com os solventes A e B; - iniciar a eluição utilizando uma proporção de 11% do solvente B num fluxo de 1 mL por minuto, durante 30 minutos aproximadamente (o tempo deve ser necessário para que a linha de base e a pressão na coluna estejam constantes);

-Injetar 20ul da amostra previamente preparada, o comprimento de onda de detecção deve ser 520nm (comprimento de onda de absorção das antocianinas);

O método de separação é isocrático, porém, para limpeza da coluna e preparação para uma nova injeção é necessário que seja feita a limpeza da coluna no modo gradiente. O método de análise está descrito na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Método para a análise de antocianinas em CLAE.

Tempo (min)	% B
0-15	11
15-22	11-100
22-28	100
28-35	100-11

Literatura consultada

GALLORI, S.; BILIA, A.; BERGONZI, M.; BARBOSA, W.; VINCIERI, F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea*, Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, New York, v. 59, n. 11/12, p. 739-743, 2004.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton**, v. 54, p. 8598-8603, 2006.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. D. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, SP: EdUFSCar, 2001. 77 p. (Série Apontamentos).

Protocolo 6 - Análise de Açúcares

6.1- Determinação de Açúcares Redutores

Reagentes

-Ácido dinitrosalicílico (DNS) ($C_7H_4N_2O_7$)

MM= 228,12 g/mol

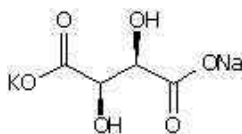


Observação: Perigoso se ingerido.

Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância e chamar um médico.

-Tartarato duplo de potássio (sal de Rochelle) ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$)

MM= 282.1 g/mol



Observação: Se inalado levar a vítima para local arejado. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas. Se ingerido fazer com que a vítima beba água em abundância.

-Hidróxido de sódio (NaOH)

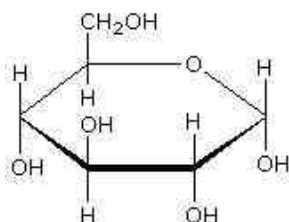
MM= 40 g/mol

Observação: Perigoso. Causa queimaduras no trato respiratório, olhos e na pele. Pode causar danos aos seguintes órgãos: pulmões, trato gastrointestinal, trato respiratório, cabeça, língua e traquéia.

Se inalado levar a vítima para local arejado, em caso de parada respiratória aplicar imediatamente ventilação mecânica, chamar um médico imediatamente. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância durante 15 minutos chamar um médico imediatamente. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante pelo menos 15 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido não causar vômito e chamar um médico imediatamente.

-Glicose ($C_6H_{12}O_6$)

MM= 180,16 g/mol



Lista de Materiais

- Balança analítica
- Cubetas
- Tubos de ensaio
- Balões volumétricos de 25mL e 1000mL
- Pipeta automática de 100-1000 μ L
- Espectrofotômetro visível

Preparo das Soluções

1- Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Dissolver 16g de NaOH em 200mL de água destilada e adicionar 10g de DNS. Após a dissolução total, adicionar 300g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), dissolvidos em 500mL de água destilada, aquecer em torno de 40OC para a completa dissolução. Transferir para um balão volumétrico de 1L e completar com água destilada.

Observação: A solução deve ser mantida em geladeira e em frasco protegido da luz.

2-Solução padrão de glicose

Solução mãe: preparar uma solução de glicose 0,18g em 100mL.

Solução de trabalho: preparar as diluições em balões volumétricos de 10mL como indicado na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Diluições do padrão (Glicose) para a construção da curva de calibração.

Diluições	Conc. (g/L)	Vol. De S ₁ (mL)
1	1,8	10
2	1,44	8
3	0,72	4
4	0,36	2
5	0,18	1
6	branco	0

Análises

- Adicionar 1,0mL da amostra e 1mL de reagente DNS;
- Aquecer a 100°C/ 15 minutos, resfriar em banho de gelo;
- Completar com 13mL de água destilada agitando até homogeneizar a solução;
- Acompanhar a reação representada na Figura 6.1 a $\lambda=540\text{nm}$ (comprimento de onda de absorção do ácido 3-amino-5-nitrossalicílico).

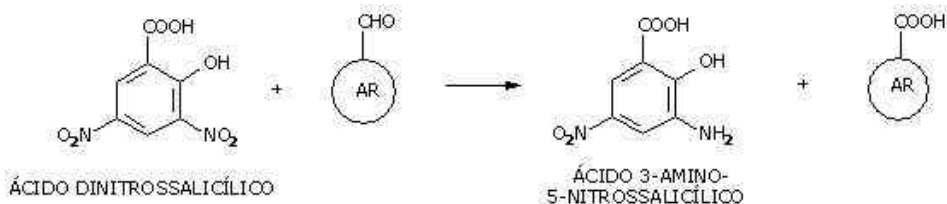


Fig. 6.1. O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico.

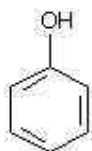
Observação: Devido a amostra de açaí apresentar absorvência no comprimento de onda do ensaio o branco correspondente a amostra é preparado substituindo o DNS por água.

6.2- DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS

Reagentes

-Fenol 5% (C₆H₅OH)

MM= 94.11 g/mol



Observação: Tóxico se inalado, em contato com a pele e se ingerido. Causa queimaduras. Perigo de danos sérios a saúde por exposição prolongada através de inalação, contato com os olhos e ingestão. Possível risco de efeitos irreversíveis.

Se inalado levar a vítima para local arejado. Em caso de parada respiratória aplicar imediatamente ventilação mecânica, e se necessário máscara de oxigênio. No caso de contato com a pele lavar polietileno glicol/etanol 2:1 e lavar com água em abundância. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante 10 minutos e imediatamente chamar um oftalmologista. Se ingerido imediatamente fazer com que a vítima beba água em abundância, induzir vômito. Chamar um médico imediatamente. Administrar carvão ativado em suspensão.

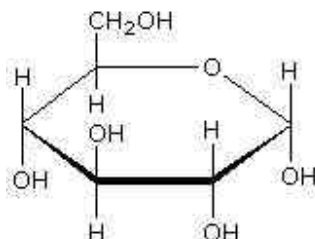
-Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)

MM= 98,08 g/mol

Observação: Causa queimaduras severas.

Se inalado levar a vítima para local arejado, chamar um médico. No caso de contato com a pele lavar com água em abundância aplicar levemente polietileno glicol 400. Após contato com os olhos lavar com água mantendo as pálpebras abertas durante pelo menos 10 minutos, chamar imediatamente um oftalmologista. Se ingerido fazer com que a vítima beba água (2 copos no máximo), evitar vômito (risco de perfuração) e chamar um médico (não tentar neutralizar).

-Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
MM= 180,16 g/mol



Lista de Materiais

- Balança analítica
- Cubetas -Tubos de ensaio
- Balões volumétricos de 25mL e 1000mL
- Pipeta automática de 100-1000 μ L
- Espectrofotômetro visível

Preparo das Soluções

1. Solução de fenol 5%

5g de fenol em 100ml de água.

2- Solução padrão de glicose

Solução mãe: solução de glicose 1%.

Solução de trabalho: adicionar a quantidade da solução mãe determinada na tabela em balões volumétricos de 10mL de acordo com a Tabela 6.2.

Tabela 6.2. Diluições do padrão (Glicose) para a construção da curva de calibração.

Diluições	Conc. (g/mL)	Vol. De S_1 (L)
1	90	90
2	80	80
3	60	60
4	40	40
5	20	20
6	branco	0

Análises

- Em um tubo de ensaio adicionar 500µL de amostra, 500µL de fenol 5% e - 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado;
- Deixar reagir à temperatura ambiente por 10 minutos;
- Agitar com auxílio de um vortex e deixar em banho de água a temperatura ambiente por 10 minutos;
- A leitura é realizada com um espectrofotômetro na região do visível em 490nm.

Neste método ocorre à desidratação do açúcar pelo ácido sulfúrico seguida da complexação com o fenol, o produto formado da absorve em 490nm.

Observação: Devido à amostra de açaí apresentar absorbância no comprimento de onda do ensaio o branco correspondente a amostra é preparado substituindo o fenol por água.

Literatura consultada

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for Determination of sugars and related substances. **Nature**, London, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

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



Instrumentação Agropecuária

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



ISBN