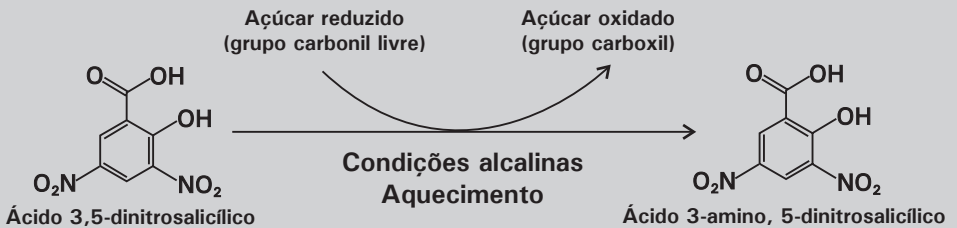


**Determinação de Açúcares Redutores
pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico:
Histórico do Desenvolvimento do Método
e Estabelecimento de um Protocolo para o
Laboratório de Bioprocessos**



ISSN 1679-6543

Dezembro, 2013

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88

Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos

*Natália Moura de Vasconcelos
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
Fernando Antônio de Souza Aragão*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2013

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

www.cnpat.embrapa.br

cnpat.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*

Secretário-Executivo: *Marcos Antônio Nakayama*

Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues*

Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa

Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*

Figura da capa: *Gustavo A. S. Pinto*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição (2013): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Vasconcelos, Natália Moura de.

Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos / Natália Moura de Vasconcelos, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, Fernando Antônio de Souza Aragão. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

29 p. : il. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543 ; 88).

1. Açúcares redutores. 2. Ácido 3,5- dinitrosalicílico. 3. Espectrofotometria. I. Pinto, Gustavo Adolfo Saavedra. II. Aragão, Fernando Antônio de Souza. III. Título. IV. Série.

CDD 547.23

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	15
Conclusão	22
Referências	23

Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos

Natália Moura de Vasconcelos¹

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto²

Fernando Antônio de Souza Aragão³

Resumo

A determinação de açúcares redutores é uma atividade de rotina em diferentes laboratórios de pesquisa. A análise espectrofotométrica, baseada no emprego do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), é simples e robusta, permitindo em um dia de trabalho a quantificação de um grande número de amostras. Apesar de os trabalhos de Bernfeld (1955) e Miller (1959) terem sistematizado duas variações dessa análise e serem amplamente citados, na maioria dos casos são desconhecidos de seus usuários, e seu conteúdo, pouco seguido. O desconhecimento origina modificações e pseudoverdades sobre o método, que aparecem de forma aleatória, mas possuem elevado poder de disseminação e “mutação”. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram realizar um levantamento histórico da evolução do método, avaliar alguns pontos críticos para sua execução, decorrentes da vivência diária, bem como propor uma redução no volume de reagentes utilizados e de resíduos gerados. Os resultados confirmam a robustez do método e sua

¹Engenheira de alimentos, técnica do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, natalia.vasconcelos@embrapa.br

²Químico, D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, gustavo.saavedra@embrapa.br

³Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, fernando.aragao@embrapa.br

capacidade de utilização para um grande número de amostras diárias, desde que seguidas algumas recomendações. Também é possível propor com segurança a utilização de menores volumes de reagentes, o que implica menor geração de resíduos se comparado ao descrito nos artigos de Bernfeld (1955) e Miller (1959).

Termos para indexação: açúcares redutores, ácido 3,5-dinitrosalicílico, espectrofotometria.

Determination of Reducing Sugars by 3,5-Dinitrosalicylic acid: Historical Development of the Method and Establishment of a Protocol to the Laboratory of Bioprocess

Abstract

Determination of reducing sugars is a routine activity for different research labs. Spectrophotometric analysis based on the use of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), is simple and robust, allowing for a working day quantification of a large number of samples. The works of Bernfeld (1955) and Miller (1959), which having two systematic variations of this analysis, are widely cited, however in most cases are not known to his users. Ignorance leads modifications and called truths about the method, which appear randomly, but have high power to spread and "self-mutation". The objectives of this study were to assess the historical evolution of the method, to evaluate some critical points for its execution resulting from daily experience, as well as to propose a reduction in the volume of reagents used, then the waste generated. The results confirm the robustness of the method and its usability for a large number of samples daily since followed some recommendations. It is also possible to safely propose the use of smaller volumes of reagents, which leads to a reduction in waste generation compared to that described in the articles by Bernfeld (1955) and Miller (1959).

Index terms: reducing sugars, 3,5-dinitrosalicylic acid, spectrophotometry.

Introdução

Sumner (1921) desenvolveu o método para determinação de açúcares redutores em urina de pacientes com e sem diabetes, baseado na capacidade de o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ser reduzido pela glicose a composto nitroamino análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), altamente colorido (Figura 1). Esse composto aromático absorve fortemente a luz, sendo possível, assim, estabelecer uma relação direta entre a medida colorimétrica e a quantidade de açúcares redutores presente (GONÇALVES, 2010). No método relatado por Sumner (1921), 1,0 mL de amostra era misturado com 1,0 mL de solução 2% de DNS e 2,0 mL de solução de NaOH 1,5%. A mistura homogeneizada deveria ser aquecida por 5 minutos a 100 °C, para em seguida ser resfriada, e diluída a 25 mL.

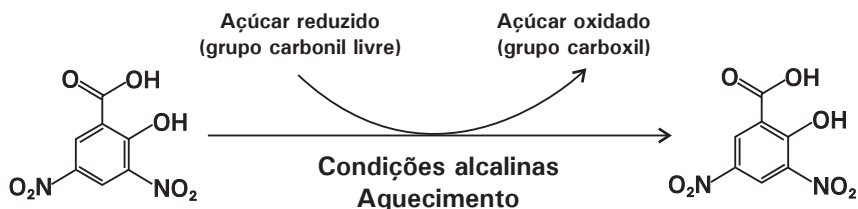


Figura 1. Reação utilizada para a determinação espectrofotométrica de açúcares redutores, baseada na conversão do ácido 3,5-dinitrosalicílico em seu análogo reduzido.

Sumner (1924) apresentou modificações ao método decorrentes de 3 anos de aperfeiçoamento, as quais consistiram de: introdução do tartarato duplo de sódio e potássio (ou sal de Rochelle), alteração das quantidades de reagentes utilizadas e sua unificação em uma única solução. Segundo o autor, as modificações possibilitaram: a prevenção da destruição de parte das moléculas de açúcar pelo oxigênio que é dissolvido durante o processo de aquecimento; o aumento da quantidade de cor gerada, propiciando melhor detecção de pequenas quantidades de glicose; e estoque do reagente por período indeterminado.

Dessa forma, Sumner (1924) indicou que o reagente deve ser preparado a partir de 300 mL de solução hidróxido de sódio 4,5%, livre de carbonato (o que se consegue com reagente novo, 800 mL de solução 1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 255 g de sal de Rochelle. Para a análise, 1,0 mL de amostra passaria a ser misturado a 3,0 mL do reagente. As condições de reação (tempo e temperatura) bem como a diluição para leitura não foram alteradas.

A adição de fenol foi proposta visando aumentar a quantidade de cor gerada. Apesar de não apresentar nenhuma atividade redutora sobre as moléculas de DNS, o fenol incrementa a quantidade de cor gerada pela glicose, podendo chegar a 300% (SUMNER, 1925). Contudo, a cor gerada na presença de fenol não apresenta estabilidade. Quando em repouso, a qualidade da cor pode mudar em contato com o ar. Para prevenir essa alteração indesejável, pequenas quantidades de bissulfito de sódio devem ser incorporadas ao sistema. Para esse novo reagente, 10 g de fenol cristalizado devem ser dissolvidos em 22 mL de solução 10% de hidróxido de sódio, para em seguida o volume ser completado a 100 mL. A cada 69 mL da solução alcalina de fenol, devem-se adicionar 6,9 g de bissulfito de sódio, para então ser adicionada a solução descrita em Sumner (1924).

Sumner (1934) utiliza o método de DNS para determinação de atividade de invertase, em substituição a medidas polarimétricas; porém, não introduz novas modificações. Contudo, Bernfeld (1955), ao transpor o método para determinação da atividade de α e β -amilases, retornou ao descrito por Sumner (1924), retirando o fenol e o bissulfito de sódio, mas passou a utilizar a proporção de 1:1 entre amostra (2,0 mL) e solução reacional (2,0 mL).

Miller (1959) traz um extenso estudo sobre o uso do DNS na determinação de açúcares redutores, focando na perda de parte dos açúcares redutores durante o teste, fato observado tanto por seu grupo quanto por outros, mas nunca até então investigado. Seu trabalho teve como ponto de partida o de Sumner (1925) e, ao final, propôs um método otimizado, segundo o qual o reagente modificado deve conter 1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 0,2% de fenol, 0,05%

de bissulfito de sódio e 1% de hidróxido de sódio. Ao contrário de todos os demais procedimentos, Miller (1959) indica que todos os reagentes sólidos devem ser adicionados e dissolvidos sob agitação simultaneamente no volume equivalente de solução de hidróxido de sódio. A marcha analítica também foi alterada. Nela, 3 mL de amostra são homogeneizados com 3 mL do reagente modificado e aquecidos em banho de água fervente por 15 minutos. O aumento do tempo foi recomendado, pois, com 5 minutos, o desenvolvimento da cor não seria completo. Logo após o aquecimento, mas antes do resfriamento dos tubos à temperatura ambiente, 1 mL de solução 40% de sal de Rochelle deve ser acrescentado e homogeneizado. A presença do sal de Rochelle na composição do reagente foi apontada como a explicação da perda parcial de moléculas de glicose.

Desde então, os trabalhos de Bernfeld (1955) e Miller (1959) sobre o uso do DNS para a determinação de açúcares redutores tornaram-se clássicos na literatura científica, tendo sido citados, até final de junho de 2012, respectivamente por 3.332 e 8.174 artigos listados na base *Web of Science*. No meio acadêmico brasileiro, o artigo de Miller (1959) é comumente citado em artigos, dissertações e teses.

No entanto, apesar de essas duas referências serem citadas nas metodologias analíticas, em muitos casos elas nem sempre são literalmente seguidas. Já presenciamos laboratórios utilizarem variantes de Miller (1959) distintas do trabalho original em preparo do reagente, tempo de reação e volume de ajuste para leitura. Diversas variações, muitas delas oriundas de adaptações práticas laboratoriais, surgiram ao longo do tempo. Elas não representam metodologias referenciáveis, uma vez que, em sua maioria, não existem relatos experimentais publicados, ou sequer escritos, das modificações realizadas.

Concomitantemente às modificações não relatadas, também surgem lendas laboratoriais, capazes de se perpetuarem com a transmissão do conhecimento intralaboratorial de um usuário mais antigo para um mais novo. Essas lendas podem, ainda, ultrapassar as paredes de determinado laboratório, indo para outro, ou outros. Algumas dessas lendas também se referem à estabilidade da mistura reacional antes e

depois da reação de formação de cor. Diversas vezes, a incerteza dos analistas quanto a essa questão já foi presenciada por nós. Alguns afirmam que a amostra pode permanecer em contato com o reagente antes da reação de formação de cor por período indeterminado, já outros sugerem que isso só pode ocorrer após a reação. Ghose (1987) afirma que as misturas submetidas à fervura podem ser deixadas em repouso por uma quantidade razoável de tempo antes da leitura, e que amostras não submetidas a esse processo se deterioram gradualmente. Contudo, o autor não estima a quantidade de tempo em que as amostras permanecem ou não estáveis.

Juntamente com as questões técnicas referentes ao método propriamente dito, têm surgido preocupações com o passivo ambiental de cada análise, que pode ser bastante significativo, dependendo da demanda do laboratório. O descarte desses compostos em águas residuais deve ser desencorajado, uma vez que, numa escala de 0 a 4 do Diagrama de Hommel, o ácido 3,5-dinitrosalicílico apresenta nível 3 de riscos à saúde, enquanto o fenol representa nível 4 (NATIONAL..., 2007).

Dessa forma, este trabalho avaliou a variante metodológica de Bernfeld (1955) em uso nos laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical, a fim de melhorar a qualidade dos resultados obtidos, averiguar a possibilidade de reduzir o volume de reagentes utilizados (e, conseqüentemente, o passivo gerado) e descrever detalhadamente a metodologia a ser empregada.

Material e Métodos

Procedimentos gerais

Os procedimentos descritos neste item não sofreram variações em sua execução durante a condução deste trabalho.

Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para um volume final de 1.000 mL, 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico devem ser adicionados a 200 mL de uma solução 2 M de hidróxido de

sódio recém-preparada (solução A). Em paralelo, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio devem ser dissolvidos em 500 mL de água destilada (solução B), sob aquecimento e agitação constantes. Ainda nessas condições, deve-se adicionar a solução A sobre a solução B até a completa dissolução do DNS. Após resfriamento, transferir a mistura para balão volumétrico de 1.000 mL e aferir o volume com água destilada. O reagente deve ser armazenado em frasco de polipropileno etiquetado, datado, ao abrigo da luz.

Obs. 1: É normal que o DNS não dissolva na solução alcalina e forme pelotas que se depositam no fundo do recipiente.

Marcha analítica

Transferir alíquota de volume conveniente de cada amostra para tubos de ensaio. Adicionar volume igual do reagente DNS a cada tubo. A mistura deve ser agitada vigorosamente. Os tubos devem ser levados para banho-maria com água em ebulição (100 °C) pelo tempo determinado para o experimento. A reação é interrompida imergindo os tubos em banho de água fria. A mistura será diluída com água destilada. Após homogeneização, realizar a leitura da intensidade da cor em espectrofotômetro a 540 nm, contra uma amostra de calibração, usualmente chamada de “branco”.

Obs. 2: A agitação para homogeneização das duas soluções (amostra e DNS) é muito importante. Não fazê-la ou fazê-la de forma suave pode acarretar na ocorrência de duas fases. A reação de formação de cor somente irá ocorrer na interface e, com isso, mascarar totalmente o resultado.

Obs. 3: A amostra de calibração (branco) é utilizada para zerar a absorbância no equipamento. Para prepará-la, substituir a amostra por água destilada e seguir o procedimento descrito na marcha analítica. O branco deve sempre receber o mesmo processamento das demais amostras durante as análises.

Obs. 4: Na marcha analítica, tempo de reação e diluição final do sistema não foram detalhados, uma vez que são alguns dos parâmetros alvos do presente estudo, sendo definidos no item Resultados e Discussão.

O cálculo da concentração de grupos redutores totais (GRT), em g L^{-1} deve ser realizado de acordo com a Equação 1:

$$GRT = abs \times f \times d \quad (\text{Eq. 1})$$

em que:

abs é média das absorbâncias lidas.

f é fator de concentração.

d é inverso da diluição da amostra.

Solução-mãe e curva-padrão de glicose

Para o preparo da solução-mãe de glicose, pesar 1,0 g de glicose anidra e transferir analiticamente para balão volumétrico de 1,0 L. Após dissolução, aferir o volume com água destilada.

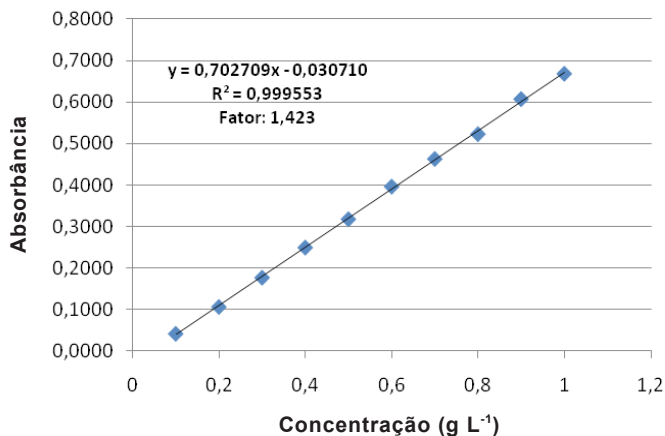
A partir da solução-mãe de glicose $1,0 \text{ g L}^{-1}$, preparar soluções com concentrações variando de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ a $0,9 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, conforme Tabela 1.

Transferir alíquotas de volume conveniente de cada solução preparada, incluindo a solução-mãe, para tubos de ensaio. Seguir o procedimento indicado na marcha analítica e realizar a leitura da intensidade da cor em espectrofotômetro a 540 nm, lembrando-se de fazer a amostra de calibração (branco).

Tabela 1. Exemplo de preparo das soluções diluídas de glicose, usadas na elaboração da curva-padrão, a partir da solução-mãe de glicose $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

Solução de glicose (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (g L^{-1})
10	90	0,1
20	80	0,2
30	70	0,3
40	60	0,4
50	50	0,5
60	40	0,6
70	30	0,7
80	20	0,8
90	10	0,9

Inserir em planilha a absorbância no eixo Y contra a concentração de glicose (g L^{-1}) no eixo X (Figura 2). A partir da equação da reta, calcular o fator de concentração (Equação 2). Os valores da equação somente se aplicam ao intervalo testado.



$$Fator = \frac{1}{coef. angular} \quad (Eq. 2)$$

Itens da metodologia submetidos à avaliação

Os pontos a seguir referem-se a alguns dos questionamentos surgidos no laboratório ao longo da utilização do método de determinação de GRT por DNS.

Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

Estabilidade da mistura reacional antes da reação de formação de cor

Uma solução de glicose $1,0 \text{ g L}^{-1}$ foi utilizada como amostra. Para análise, $1,0 \text{ mL}$ da amostra foi adicionada a $1,0 \text{ mL}$ do reagente em 6 conjuntos de tubos de ensaio. Após homogeneização, os tubos foram deixados em repouso por 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

A reação de formação de cor foi realizada após cada período de tempo determinado, segundo a marcha analítica em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. O volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. Após homogeneização, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Varian Cary 50, a 540 nm, com auxílio do software Cary WinUV no módulo Simple Reads. Para cada conjunto de tubos, preparou-se uma amostra de calibração.

Estabilidade da intensidade de cor na mistura após a reação

Utilizou-se solução de glicose 1,0 g L⁻¹ como amostra. Para análise, 1,0 mL da amostra foi adicionada a 1,0 mL do reagente em tubo de ensaio. A reação de formação de cor ocorreu de acordo com a marcha analítica em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. O volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. Após homogeneização, a intensidade da cor foi avaliada em espectrofotômetro Varian Cary 50, a 540 nm, com auxílio do software Cary WinUV no módulo Scanning Kinetics, com o qual se mediu a absorbância a cada 15 segundos durante um período de 240 minutos à temperatura ambiente. Antes da leitura da amostra, o equipamento foi calibrado com amostra “branco”.

Tempo de reação para formação da cor

Nesta etapa, utilizaram-se amostras com concentrações de grupos redutores variadas, oriundas de diferentes experimentos realizados no laboratório. A reação de formação de cor foi feita em banho-maria a 100 °C por 5 e 15 minutos. Para cada tempo de reação, preparou-se uma amostra de calibração. O volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. Após homogeneização, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, a 540 nm, com auxílio do software Cary WinUV no módulo Simple Reads.

O cálculo da concentração de grupos redutores totais foi realizado a partir de curvas-padrão elaboradas para os tempos de reação avaliados (5 e 15 minutos), conforme descrito anteriormente.

Redução de volume da mistura reacional

Foi avaliado se a alteração do volume final gerado, sem mudança na

proporção entre as diferentes soluções empregadas, causa impacto no resultado da análise. Para tanto, utilizaram-se amostras com concentrações de grupos redutores variadas, oriundas de diferentes experimentos realizados no laboratório.

Cada amostra foi analisada das seguintes formas:

- 1,0 mL de amostra foi adicionado sobre 1,0 mL de reagente DNS. Após homogeneização, reação e resfriamento, o volume final foi completado para 10,0 mL com água destilada.
- 0,5 mL de amostra foi adicionado sobre 0,5 mL de reagente. Após homogeneização, reação e resfriamento, o volume final foi completado para 5,0 mL com água destilada.

A amostra de calibração foi feita nas mesmas condições de cada forma. A reação de formação de cor foi feita em banho-maria a 100 °C por 5 minutos, antes da adição de água destilada, sendo interrompida pela imersão dos tubos em banho frio. A mistura de cada tubo foi completada com água destilada para um volume final conforme determinado no início do experimento. Após homogeneização, a intensidade da cor foi lida em espectrofotômetro Varian Cary 50, a 540 nm, com auxílio do software Cary WinUV no módulo Simple Reads.

Resultados e Discussão

Estabilidade da mistura reacional antes do aquecimento

Dentro da rotina de laboratório, trabalha-se com um número elevado de amostras, muitas vezes realizando a análise em duplicata ou triplicata, o que consome um grande tempo de preparo e processamento, mesmo para uma marcha analítica relativamente simples. Aliás, quanto mais simples a análise, maior a tentação do analista em aumentar o número de amostras que trabalha por vez, criando uma certeza, nem sempre verdadeira, de otimização de seu tempo na bancada. O método de quantificação de grupos redutores por DNS, devido à sua baixa complexidade, é um bom exemplo desse fato.

Trabalhar com muitas amostras simultaneamente não é viável, pois, considerando que, no primeiro tubo, a amostra passa mais tempo homogeneizada com o reagente de DNS do que a amostra presente no segundo tubo de ensaio, a diferença de tempo de contato pode ser elevada. Simulando essa situação, avaliou-se o efeito do tempo de contato entre os reagentes sobre a geração de cor.

É possível verificar que ocorre uma redução gradual nos valores da absorbância à medida que o tempo de contato aumenta. Nota-se inclusive um padrão de decaimento linear (Figura 3), levando a redução de aproximadamente 7,3% na absorbância lida na primeira hora e a mesma proporção na segunda hora.

Os dados obtidos confirmam a observação de Ghose (1987) sobre a deterioração progressiva da amostra após homogeneização com reagente de DNS. Embora não explique o motivo dessa deterioração, o autor indica submeter a mistura reacional ao aquecimento o mais rápido possível. Sumner (1924) e Miller (1959) indicam que essa degradação ocorre pela oxidação do açúcar devido ao oxigênio dissolvido no reagente de DNS, onde o meio é muito alcalino. Miller (1959) sugere purgar o meio reacional com N_2 por 2 minutos antes da reação. Essa solução é pouco prática, pois eleva o custo e dificulta e aumenta o tempo da análise. Dessa forma, a recomendação de Ghose (1987) é mais viável.

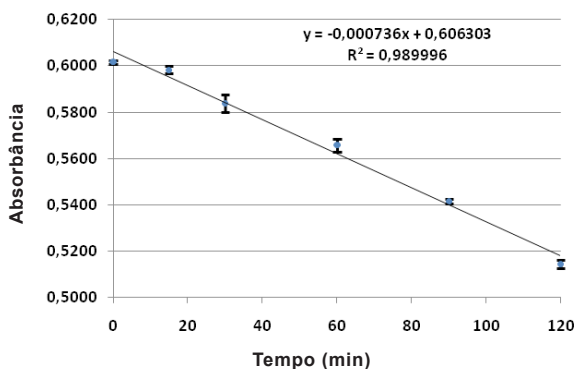


Figura 3. Avaliação da estabilidade da mistura reacional antes da reação de formação de cor.

Recomendamos: a) fazer, no máximo, seis amostras por vez, em duplicata ou triplicata; b) distribuir todas as amostras cujos grupos redutores se pretende quantificar, e suas replicatas, primeiro nos tubos, para em seguida adicionar o reagente de DNS; c) após a adição do reagente, homogeneizar a mistura reacional; d) apenas iniciar a adição do reagente de DNS com a água do banho-maria em fervura.

Estabilidade da intensidade de cor na mistura após a reação

Por outro lado, analisar, por vez, número reduzido de amostras é contraproducente. O trabalho se arrasta, levando a inevitável acúmulo de amostras a serem processadas, comprometendo ainda o espaço para armazenamento desse material, bem como a própria geração de resultados. A fim de trabalhar com número maior de amostras, apesar da limitação de seis por bloco de aquecimento, recomenda-se, após o aquecimento, resfriar, diluir e guardar as amostras reagidas para determinação da absorbância junto com as amostras de outros blocos.

Dessa forma, o ponto chave é verificar se a cor produzida é estável ao longo do tempo. Foi possível verificar que a mistura reacional apresenta valores de absorbância muito similares durante período de 4 horas à temperatura ambiente (Figura 4). A redução da intensidade de cor estimada, a partir de regressão linear, foi de 0,5% após este período.

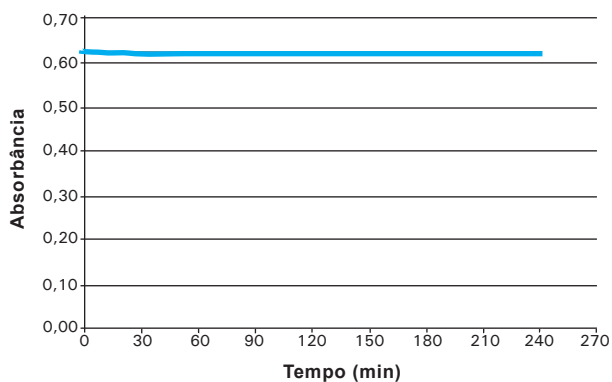


Figura 4. Avaliação da estabilidade da mistura reacional depois da reação de formação da cor.

Assim, recomenda-se: a) organizar as análises em blocos, de maneira que as amostras sejam submetidas ao aquecimento em grupos (até seis amostras em duplicata ou triplicata); b) diluir as amostras com água destilada, homogeneizar e reservar até o final do processamento do último bloco; c) realizar a determinação de absorvância no período de até 4 horas do final do primeiro bloco.

Avaliação do tempo de reação para formação da cor

Este item entrou em discussão pela divergência observada entre a referência citada, tanto pelo nosso laboratório como por tantos outros (MILLER, 1959), com o que é executado na prática, que é muito similar à metodologia descrita por Bernfeld (1955). Composição de reagente, proporção amostra/reagente e tempo de reação são, na maioria dos laboratórios, iguais a Bernfeld (1955).

Miller (1959), embora inicialmente utilizasse o tempo de 5 minutos para o aquecimento, na apresentação do método ajustado indicou 15 minutos. Segundo o autor, o tempo de aquecimento maior foi necessário para que a reação fosse concluída, porém não mostrou qualquer experimento que suportasse essa sugestão. Mais uma vez, o que vivenciamos neste e em outros laboratórios é que esse detalhe, como outros pontos da metodologia de Miller, não é levado em consideração, apesar de todos referenciaros seu trabalho para a análise de açúcares redutores por DNS.

As repetições aquecidas por 15 minutos apresentaram maior intensidade de cor formada do que as aquecidas por apenas 5 minutos (Tabela 2).

Utilizando as respectivas curvas-padrão de 5 ou 15 minutos, observou-se também que o maior tempo de reação sempre estimou valores superiores de concentração de grupos redutores. As médias das concentrações de grupos redutores foram diferentes e significativas ao nível de 5% segundo o teste t de Student (Tabela 3). Esses dados corroboram a sugestão de Miller (1959), de que o tempo de aquecimento maior é necessário para que seja observado completo desenvolvimento da cor e, conseqüentemente, melhore a precisão do método.

Tabela 2. Médias das absorvâncias para os tempos de reação de 5 e 15 minutos.

Amostra	Tempo (min)	Médias das absorvâncias
A1	5	0,2614
	15	0,2992
A2	5	0,3628
	15	0,4178
A3	5	0,3891
	15	0,4404
A4	5	0,3738
	15	0,4144
A5	5	0,4206
	15	0,4755
A6	5	0,3240
	15	0,3691
A7	5	0,2774
	15	0,3144
A8	5	0,3106
	15	0,3490

Tabela 3. Comparação entre médias da concentração de glicose (mg L^{-1}) considerando o tempo de reação de 5 e 15 minutos, pelo teste t de Student para médias pareadas.

Estatística	Amostra A			Amostra B		
	1	2	3	1	2	3
Média (amostras 5 min)	13.055,88	12.976,15	12.317,93	5.372,59	5.339,78	5.068,92
Média (amostras 15 min)	13.807,39	13.827,23	13.292,47	5.895,82	5.904,29	5.675,95
Número de amostras	8	8	8	18	18	18
r (correlação de Pearson)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$t_{\text{calculado}}$	-11,71	-13,98	-12,69	-13,55	-12,91	-14,42
$t_{\text{tabelado}} - 5\%$ (bicaudal)	2,36	2,36	2,36	2,11	2,11	2,11
Probabilidade (bicaudal)	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Dessa forma, recomenda-se que o tempo de aquecimento, tanto para a montagem da curva-padrão, quanto para análise das amostras, seja de 15 minutos.

Avaliação da redução de volume da mistura reacional

No laboratório onde este estudo foi conduzido, o volume de resíduos de DNS gerado por mês está em torno de 50 litros, o que resulta em um volume de 600 litros de resíduos de uma única análise gerado por um laboratório a cada ano.

O descarte indiscriminado de resíduos no ambiente resulta em contaminação dos cursos d'água, do solo, da fauna e da flora. O descarte adequado, por sua vez, traz um impacto econômico mensurável. O manejo e a destinação final correta de resíduos implicam o emprego de importante material humano e financeiro. Portanto, a redução no volume gerado representa economia em diversos aspectos, como tempo, espaço físico e dinheiro.

Muitos laboratórios utilizam a proporção de 1:1 (amostra e reagente DNS) como indicada tanto por Miller (1959) quanto Bernfeld (1955), embora utilizem volumes distintos de um ou ambos os artigos. O volume de água adicionado após a reação também varia de local para local. No caso deste estudo, foi adicionado 1 mL do reagente a 1 mL da amostra e, após o aquecimento, completou-se o volume para 10 mL com água destilada, para em seguida homogeneizar e realizar a leitura. A redução de 50% no volume da amostra empregado anteriormente, reagente DNS e água destilada, mantendo a proporção de 1 para 1, não alterou a concentração determinada de GRT, segundo a comparação entre médias pelo teste t de Student, ao nível de significância de 5% (Tabela 4).

Dessa forma, recomenda-se utilizar 0,5 mL de reagente DNS sobre 0,5 mL de amostra, completando o volume para 5,0 mL com água destilada.

Tabela 4. Comparação entre médias da concentração de glicose (mg/L) considerando o volume 0,5:0,5 e 1:1 (amostra:DNS), pelo teste t de Student para médias pareadas.

Estatística	Amostra A			Amostra B			Amostra C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Média (amostras 0,5:0,5)	27.817,98	28.043,53	27.286,73	4.658,28	4.730,06	4.602,41	5.732,59	5.820,92	5.663,83
Média (amostras 1:1)	28.042,20	28.269,45	27.511,44	4.470,07	4.506,29	4.385,46	5.763,60	5.810,31	5.654,51
Número de amostras	10	10	10	34	34	34	18	18	18
r (correlação de Pearson)	1,00	1,00	1,00	> 0,99	> 0,99	> 0,99	1,00	1,00	1,00
t _{calculado}	-0,89	-0,70	-0,72	0,44	0,52	0,51	-0,20	0,07	0,06
t _{tabelado - 5% (bicaudal)}	3,25	3,25	3,25	2,73	2,73	2,73	2,90	2,90	2,90
Probabilidade _(bicaudal)	0,33	0,50	0,49	0,67	0,62	0,61	0,84	0,94	0,95

Conclusão

A determinação de grupos redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), seguindo o descrito por Bernfeld (1955), com a modificação no tempo de reação introduzida por Miller (1959) e observando os passos e modificações indicadas neste Boletim de Pesquisa, representam uma ferramenta robusta e prática para a rotina laboratorial com grande volume de amostras a serem processadas.

Seguindo o exposto, a forma mais adequada de referenciar a metodologia de determinação de açúcares redutores por DNS, sem utilizar fenol e bissulfito de sódio, é a apresentada por Bernfeld (1955), com modificações introduzidas por Miller (1959) e consolidadas neste trabalho. No caso de usar esses dois reagentes, indica-se continuar utilizando Miller (1959).

Referências

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149-157, 1955.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

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

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

NATIONAL FIRE PROTECTION ASSOCIATION. **Standards system for the identification of the hazards of materials for emergency**: NFPA 704. Massachusetts, 2007.

SUMNER J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 47, p. 5-9, 1921.

SUMNER J. B. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 62, p. 287-290, 1924.

SUMNER J. B. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 65, p. 393-395, 1925.

SUMNER J. B.; HOWEL S. F. A method for determination of saccharase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 108, p. 51-54, 1934.



Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

