

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO: APLICAÇÃO A AMOSTRAS DE RELEVÂNCIA SUCRO-ALCOOLEIRA

Resumo

Um sistema de análises por injeção em fluxo é proposto para a determinação espectrofotométrica de açúcares redutores totais, ART, em amostras de importância na agroindústria açucareira. Uma alíquota (100µl) de amostra previamente hidrolizada é inserida no fluxo transportador (água, 1,6 ml min⁻¹) originando uma zona de amostra que é transportada em direção ao detector. O reagente (1,5 mmol l⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] + 1,0 mol l⁻¹ NaOH, 1,6 ml min⁻¹) é adicionado por confluência, e a oxidação dos carboidratos ocorre em um reator (250 cm) imerso em um banho termostático 95°C. O sistema processa 120 amostras por hora, fornecendo resultados precisos (d.p.r. < 4%, n = 10). Outras características vantajosas são a resposta linear entre 0,0 – 100,0 mg l⁻¹ ART, ausência de derivas da linha base, e consumo de 49,4 mg K₃[Fe(CN)₆] por determinação. O sistema foi aplicado a amostras de caldo de cana-de-açúcar, mosto e vinhos provenientes do processo de produção de açúcar e álcool, e os resultados foram concordantes ao nível de 95% de confiança com os resultados obtidos por HPLC.

Palavras-chave: Análises em fluxo, sistema FIA, espectrofotometria, ART, açúcares redutores

*Evandro Roberto Alves,
Eduardo Poggi e Borges,
Valdemir Aparecido Fernandes
de Barros, Elias Ayres Guidetti
Zagatto**

Centro de Energia Nuclear na
Agricultura, Universidade de
São Paulo

*Autor para correspondência:
Caixa Postal 96
CEP 13400-970
Piracicaba. SP
Fone: (19) 3429-4650
E-mail: ezagatto@cena.usp.br

Summary

A flow-injection procedure is proposed for spectrophotometric determination of total reducing sugars, TRS, in samples relevant to the sugar agro-industry. A 100µl aliquot of a previously hydrolyzed sample is inserted into the carrier stream (water, 1.6 ml min⁻¹) originating a reproducible sample zone that is transported towards detection. The reagent (1.5 mmol l⁻¹ [Fe(CN)₆]³⁻ + 1.0 mol l⁻¹ NaOH, 1.6 ml min⁻¹) is added by confluence, and carbohydrate oxidation takes place inside a 250-cm reactor immersed in a thermostated bath (95 °C). The system handles 120 samples per hour, yielding precise results (r.s.d. < 4 %, n = 10). Other favorable characteristics are the linear response within 0.0 and 100.0 mg l⁻¹ TRS, no baseline drift, and a reagent consumption of 49.4 mg K₃[Fe(CN)₆] per determination. The system was applied to sugar cane juices, most and wine samples relevant to the sugar and alcohol production, and results were in agreement with those obtained by HPLC at the 95 % confidence level.

Keywords: Flow analysis, FIA system, spectrophotometry, total reducing sugars, reducing sugars

Introdução

O monitoramento de açúcares redutores totais, ART, é de grande importância para controle industrial da fabricação de açúcar e de álcool, principalmente no que se refere à melhoria da eficiência do processo industrial, ao pagamento da cana-de-açúcar em função do teor de sacarose, e à avaliação do estado de maturação da cana (1).

Nas usinas brasileiras, a determinação de ART é em geral conduzida por titulação de Lane-Eynon ou pelo método espectro-

fotométrico de Somogyi e Nelson (e suas adaptações), ambas envolvendo a redução de Cu²⁺ pelos monossacarídeos (2,3).

O método baseado na redução de hexacianoferrato (III) foi também proposto para determinação de açúcares redutores (4), apresentando vantagens sobre as metodologias utilizando Cu²⁺, como por exemplo, a estabilidade da solução e a robustez do procedimento (2). A redução, devida ao grupo aldeído do carboidrato, ocorre sob condição alcalina e aquecimento,

produzindo hexacianoferrato (II), de coloração menos intensa. ART é então determinado espectrofotometricamente pela diminuição da absorbância. Como esta é proporcional à concentração de ART, a elaboração de ábacos para obtenção de fatores de conversão não é necessária. Ainda, não se requerem precauções quanto à reoxidação pelo oxigênio do ar. A oxidação de açúcares por hexacianoferrato (III) tem sido explorada em procedimentos de análises em fluxo (5) nos quais a adição posterior de 1,10-fenantrolina e Fe^{3+} permite a formação do azul da Prússia. Entretanto estes sistemas são menos adequados para análises em larga escala em função de sua complexidade.

Os sistemas de análises por injeção em fluxo, FIA¹ (6,7), são reconhecidos como excelentes gerenciadores de soluções (8). Os procedimentos envolvem a inserção da amostra em um fluxo transportador, a dispersão da zona de amostra estabelecida e a temporização, o que possibilita a consecução das etapas inerentes à determinação analítica específica com menor ingerência do operador e menor possibilidade de contaminação pelo ambiente laboratorial. Em sua versão mais simples, os sistemas FIA compreendem uma bomba peristáltica para impulsionar o fluxo transportador e os reagentes, um injetor para introduzir com precisão uma alíquota pré-definida da amostra, uma bobina de reação, onde a zona de amostra se dispersa formando as espécies químicas a serem monitoradas, um detector e um dispositivo para registrar o sinal analítico transiente gerado durante a passagem da amostra processada através do mesmo.

Dentre as características favoráveis dos sistemas FIA, destacam-se a possibilidade de automação, o baixo custo, a facilidade operacional, a possibilidade de miniaturização, o baixo consumo de amostras e de reagentes, a versatilidade e a alta frequência analítica. Nestes sistemas, os equilíbrios químicos podem não ter sido atingidos quando a zona de amostra é quantificada, o que expande a aplicabilidade dos métodos (7).

Com relação às técnicas de detecção em sistemas FIA, destaca-se espectrofotometria UV-Vis (6), e seu emprego crescente se deve ao aprimoramento instrumental e à disponibilidade comercial de novos reagentes.

Os sistemas FIA apresentam a beleza da simplicidade instrumental e operacional, sendo aceitos mundialmente como ferramenta importante para análises de rotina em larga escala. Este aspecto pode ser confirmado pelas inúmeras publicações, livros, teses acadêmicas e analisadores comerciais disponíveis (6,9,10).

Este artigo relata o desenvolvimento de um sistema FIA simples e robusto para a determinação de açúcares redutores totais em caldo de cana-de-açúcar, vinhos e mosto, envolvendo a oxidação de açúcares por hexacianoferrato (III).

Experimental

Soluções

O reagente oxidante ($1,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 1,0 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$) era preparado adicionando-se 49,4 mg do sal em 50 ml de uma solução $2,0 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$ e, após dissolução,

¹ do inglês "Flow Injection Analysis".

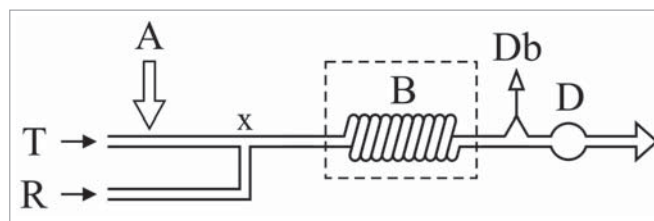


Figura 1. Diagrama de fluxos do sistema FIA. A = amostra; T = fluxo transportador; R = reagente oxidante; B = reator imerso em banho termostatizado (linha tracejada); D = detector (420 nm); Db = desborbulhador; x = ponto de confluência. Para detalhes e operação do sistema, V. texto

completando-se o volume até 100 ml com água destilada. Este reagente era armazenado em frasco âmbar, sendo estável por pelo menos uma semana.

As soluções-padrão estoque, 1000 mg l^{-1} de frutose ou glicose, foram preparadas dissolvendo-se 100,0 mg em 100 ml de água. A solução-padrão estoque de açúcar invertido foi preparada conforme referência (11). As soluções-padrão de trabalho eram preparadas diariamente por diluições das soluções-padrão estoque com água.

As amostras de caldo de cana-de-açúcar, vinhos, mostos e melaços foram obtidas de usinas locais, e submetidas à hidrólise ácida (12). Imediatamente antes das análises, as amostras eram diluídas com água por um fator de 4000 v/v (caldo ou mosto), 100 v/v (vinho - mosto fermentado) ou 40000 m/v (melaço).

O sistema FIA

O sistema de análises por injeção em fluxo (Fig. 1) compreende uma bomba peristáltica Ismatec IPC-4, um injetor operado manualmente (8), um espectrofotômetro FEMTO 432 equipado com cubeta de fluxo Hellma 178 OS (passo óptico = 10 mm; volume interno = $80 \mu\text{l}$), um registrador potenciométrico Kipp & Zonen, tubos de polietileno (d.i. 0,8 mm) para confecção de linhas de transmissão, reatores e alças de amostragem, um banho termostatizado, um desborbulhador (13), e demais acessórios.

Uma alíquota de amostra ($100 \mu\text{l}$) é inserida em um fluxo transportador ($\text{água}, 1,6 \text{ ml min}^{-1}$), e a zona de amostra

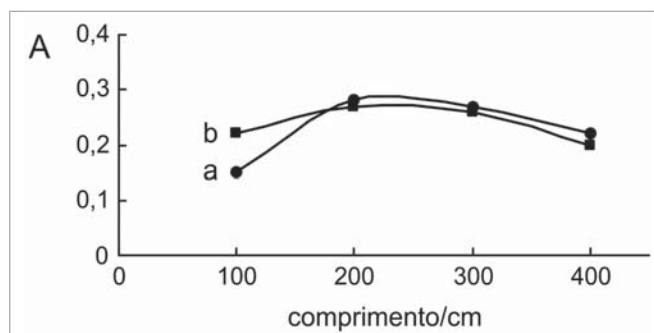


Figura 2. Influência do comprimento do reator. A = altura de pico, em absorbância; curvas a e b se referem a $60,0 \text{ mg l}^{-1}$ de frutose e de glicose

estabelecida conflui com o reagente oxidante ($1,6 \text{ ml min}^{-1}$) no ponto x (Fig. 1). A oxidação dos açúcares e consequente formação de hexacianoferrato (II) ocorre no reator B imerso em banho termostatizado contendo glicerina e aquecido a 96°C . A amostra processada flui então através do desburbulhador e, após remoção das bolhas de ar resultantes do aquecimento ($\text{vazão} = 0,6 \text{ ml min}^{-1}$), passa pelo detector. A variação transiente na absorbância é monitorada a 420 nm e registrada em forma de pico, cuja altura é proporcional à concentração de ART.

O sistema foi dimensionado para prover alta dispersão da amostra. O volume injetado foi fixado em $100\mu\text{l}$ e os fluxos confluentes foram de mesma vazão, o que garantiu melhores condições de mistura. Os demais parâmetros foram investigados processando-se em triplicata soluções-padrão $0.0 - 100.0 \text{ mg l}^{-1}$ de glicose, frutose ou açúcar invertido.

Resultados e Discussão

Dimensionamento do sistema FIA

Inicialmente, investigou-se a influência da concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ entre 0.5 e 2.0 mmol l^{-1} no sistema FIA da Fig. 1 com $B = 200 \text{ cm}$. Testes preliminares indicaram que concentrações maiores não eram adequadas em função do aumento da linha base que comprometia a razão sinal/ruído e a precisão das medidas, bem como do aumento da geração de resíduos. Não foram observadas variações em sensibilidade analítica para $> 1.5 \text{ mmol l}^{-1}$ e, para menores concentrações, notou-se perda em linearidade da curva analítica.

Como a oxidação dos açúcares é dependente da alcalinidade (14), foi também investigada a influência da concentração de NaOH no reagente oxidante. Os sinais analíticos variaram de -8 e $+7\%$ para glicose e frutose, respectivamente, quando a concentração de NaOH variou de 1.0 para 2.0 mol l^{-1} . Para a menor alcalinidade, a diferença entre sinais analíticos referentes à glicose e à frutose foi de apenas *ca* 3% . Desta forma, o reagente oxidante

foi definido como $1,5 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 1,0 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$.

O comprimento do reator B foi investigado entre 100 e 400 cm , verificando-se que os sinais analíticos referentes à glicose e frutose tendiam a se igualar para maiores comprimentos, esta equivalência sendo verificada para $B > 250 \text{ cm}$. Para menores reatores, o desenvolvimento das reações envolvidas era prejudicado em função do menor intervalo de tempo disponível e das piores condições de aquecimento, o que se refletiu em redução do sinal analítico (Fig. 2). Por outro lado, maiores reatores não seriam recomendados para se evitar excessiva dispersão da amostra no percurso analítico e consequente redução da frequência analítica. Optou-se então pelo emprego de um reator de 250 cm de comprimento.

Alternativamente, o intervalo de tempo disponível para a oxidação foi modificado alterando-se a rotação da bomba peristáltica de forma a modificar a vazão total (fluxo através da cubeta) sem alterar a razão dos fluxos envolvidos. Para menores rotações (até 25% das especificadas acima) observou-se linearidade entre sinal obtido e vazão, indicando melhoria em sensibilidade, entretanto aliada à deterioração da frequência analítica. Maiores vazões não podem ser recomendadas, pois notou-se novamente diferenças entre os sinais analíticos referentes a glicose e frutose. Como a sensibilidade não era crítica, optou-se por manter as vazões do sistema.

A temperatura do banho termostatizado no qual o reator B estava imerso foi investigada entre 40 e 100°C , porém só foram observados sinais analíticos para $T > 70^\circ\text{C}$. Este parâmetro se mostrou com relevante (Fig. 3), enfatizando a diferença entre as taxas de oxidação dos monossacarídeos (1). A diminuição pronunciada dos sinais analíticos para menores temperaturas não pode ser explorada no sentido de se ajustar a sensibilidade do método porque, na medida em que a temperatura diminuiu, as diferenças entre alturas de pico referentes à glicose e frutose se pronunciaram. Este aspecto se tornou menos limitante para $T > 90^\circ\text{C}$, sendo praticamente superado para $T = 96^\circ\text{C}$. Este parâmetro foi então definido como 96°C .

Aplicação

Após o dimensionamento, o sistema FIA proposto foi aplicado a amostras de caldo de cana-de-açúcar, mosto, vinho e melaços provenientes do processo de produção do açúcar e do álcool. O sistema processa 120 amostras por hora e a linha base é estável, o que se comprova pela ausência de derivas durante períodos de 4 h de operação. A curva analítica apresenta linearidade entre $0,0$ e $100,0 \text{ mg l}^{-1}$ ($r > 0,9996$; $n = 5$). Os resultados são precisos ($\text{d.p.r.} < 4\%$) e concordantes com aqueles obtidos por cromatografia de íons com detecção por amperometria pulsada (15), ao nível de 95% de confiança (Tab. 1).

Conclusões

Em função de suas características vantajosas de facilidade operacional, robustez, baixo consumo de reagentes, alta frequência analítica e, principalmente, possibilidade de fornecer resultados de forma expedita, aliadas à precisão e exatidão dos resultados

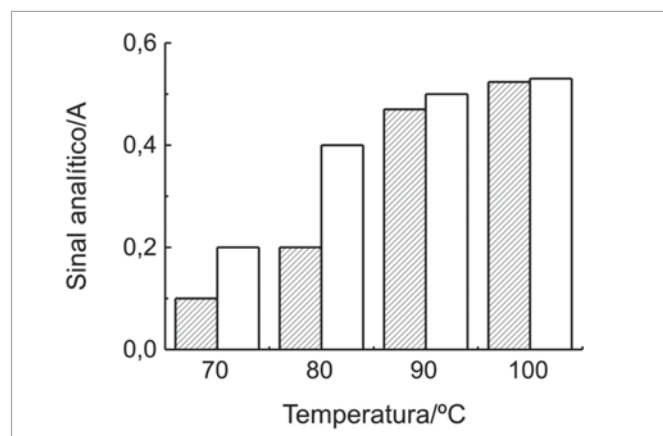


Figura 3. Influência da temperatura. A figura se refere ao sistema da Fig. 1, e a $60,0 \text{ mg l}^{-1}$ de glicose (barras hachuradas) e de frutose (barras vazias). Para detalhes, V. texto

Tabela 1. Resultados comparativos. Teores de ART, em % m/v, determinados pelo método proposto (FIA) e por cromatografia iônica (REF)

Amostra	FIA	REF
Vinho 1	0,13	0,14
Vinho 2	0,13	0,16
Vinho 3	0,15	0,16
Vinho 4	0,15	0,14
Mosto 1	18,1	17,3
Mosto 2	22,5	21,7
Mosto 3	17,1	17,4
Mosto 4	18,4	21,8
Caldo 1	13,7	13,2
Caldo 2	16,9	15,9
Caldo 3	15,6	14,8
Caldo 4	21,0	18,6
Melaço 1	56,7	58,1
Melaço 2	56,1	58,6
Melaço 3	57,4	58,1

obtidos e a sua facilidade de implantação, o sistema proposto é recomendável para análises industriais rotineiras.

A sensibilidade analítica pode ser selecionada alterando-se o comprimento da alça de amostragem. Entretanto, este não pode ser aumentado acima do valor aqui proposto, para não comprometer a linearidade da curva analítica. Emprego de menores volumes injetados é recomendável porque leva a uma maior dispersão da amostra, evitando-se assim as etapas de diluição

prévia. A etapa de hidrólise da sacarose pode ser realizada em linha, o que permitirá que o sistema aqui proposto possa processar amostras *in natura*. Estudos neste sentido estão em progresso.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra Maria Tereza M.R. Borges pelas críticas e sugestões.

Referências

01. Mattos IL. *Determinação sequencial de frutose e glicose em materiais de relevância agroindustrial empregando sistemas de análise por injeção em fluxo*. Piracicaba, 98p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 1991.
02. Alves ER. *Determinação espectrofotométrica de açúcares redutores totais em sistema de análises em fluxo*. S. Carlos, 74p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de S. Carlos, Universidade de São Paulo, 2005.
03. Schneider F, **Sugar Analysis**. *Official and Tentative Methods Recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis*. Peterborough: ICUMSA, 265p, 1979.
04. Friedemann TE, Weber CW, Witt NF. *Determination of reducing sugars by oxidation in alkaline ferricyanide solution*. **Anal. Biochem.** 4 (1962) 358.
05. Mattos IL, Zagatto EAG, Jacintho AO. *Spectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses*. **Anal. Chim. Acta** 214 (1988) 247.
06. Trojanowicz M. *Flow Injection Analysis. Instrumentation and Application*, **Word Scientific**, Singapura, 2000, 481p.
07. Ruzicka J, Hansen EH. **Flow Injection Analysis**. 2 edn., Wiley- Interscience, Nova Iorque, 499p, 1988.
08. Krug FJ, Bergamin HF^o, Zagatto EAG. *Commutation in flow injection analysis*. **Anal. Chim. Acta** 179 (1986) 103.
09. Smith JP, Hinson-Smith V. *Flow injection analysis: quietly pushing ahead*. **Anal. Chem.** 74 (2002) 385A.
10. Ukeda H. FIA bibliography (42). **J. Flow Injection Anal.** 21 (2004) 159.
11. Meade GP, Chen JCP. **Cane Sugar Handbook: a Manual for Cane Sugar Manufacturers and their Chemists**, 10 edn. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1977, 947p.
12. Honig P. **Princípios de Tecnologia Azucarera**. Mexico: Continental, 1969. v.1, p1.
13. Tumang CA, Tomazzini MC, Reis BF. *Automatic procedure exploiting multicommutation in flow analysis for simultaneous spectrophotometric determination of nonstructural carbohydrates and reducing sugar in forage materials*. **Anal. Sci.** 19 (2003) 1683.
14. Yang BY, Montgomery R. *Alkaline degradation of sucrose: effect of initial concentration of reactants*. **Carbohydr. Res.** 280 (1996) 27.
15. Procedimento analítico conduzido na Fermentec Sociedade Civil Ltda. Assessoria Fermentação Alcoólica.