

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO RÁPIDO E SIMPLES PARA A DOSAGEM DE CETOSSACARÍDIOS

Cecília Lalue, Alírio de Carvalho e Rubens Molinari.
Departamento de Química da Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Araraquara, C. P. 14.800
Araraquara, São Paulo, Brasil

SUMÁRIO

Propõe-se um método bastante simples, rápido e preciso, capaz de dosar até o equivalente a 2 μg de frutose e aplicável a cetossacarídeos em geral, sem a interferência de aldoses e de seus derivados. O processo é baseado na determinação espectrofotométrica direta de derivado furânico formado pelo aquecimento de açúcares em meio ácido.

O método espectrofotométrico pode ser convertido em colorimétrico pela formação de hidrazona, com 2,4-dinitrofenilhidrazina.

ABSTRACT

A simple, rapid and precise method is proposed for detecting up to 2 μg of fructose and applicable to ketosaccharides in general, without interference from aldoses and their derivatives. The process is based on the direct spectrophotometric determination of the furan compound, formed by heating of sugars in hydrochloric acid.

The spectrophotometric method can be converted into colorimetric method by the formation of the 2,4-dinitrophenylhydrazone of the furan compound.

INTRODUÇÃO

A decomposição de açúcares, a quente, por ácidos foi estudada por diversos pesquisadores (1-6). As cetoses são menos resistentes do que as aldoses à degradação ácida. Em tal decomposição, três moléculas de água são eliminadas da molécula do açúcar para formar o anel furânico. Obtém-se o furfural de pentoses e o 5-hidroxiacetilfurfural de hexoses.

No presente trabalho, as condições experimentais foram ajustadas de tal forma que, apenas os cetosacarídeos são convertidos em derivado furânico, que é medido diretamente pela absorção a 285 nm, como fizeram Nomura (7) e Liederman (8) para a determinação do 5-hidroximetilfurfural.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os açúcares foram dosados pelos métodos clássicos de Shaffertman (9) e Hagedorn-Jensen (10-11). A desproteção de sangue foi feita pelo método de Somogyi (12).

Os reagentes utilizados são de grau analítico. As amostras de açúcar comercial procedem da Companhia União de Refinadores, São Paulo.

As leituras espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetro Beckman, modelo DU e para aquecimento utilizou-se um banho-maria comum (aproximadamente 97°C).

O meio de cultura e as condições de cultivo do *Etreptomyces aureofaciens*, utilizado como um meio biológico complexo para a dosagem de sacarose, foi descrito por Molinari (13).

RESULTADOS

Estabelecimento das condições para o maior rendimento de derivado furânico, resultante do aquecimento de sacarose em meio ácido

Em experiências preliminares, verificou-se a formação de um produto que absorve a 285 nm, quando se aquecia sacarose em meio ácido. Considerou-se como branco o tubo de prova omitindo-se o aquecimento em banho-maria. ΔE_{285} exprime a diferença de extinção entre o tubo prova e o tubo branco.

Na figura 1, verifica-se que a quantidade de produto aumenta com a concentração, atingindo um máximo em ácido Clorídrico 4 N. Em concentrações maiores predomina a destruição do produto formado.

O controle do tempo de aquecimento é fundamental. A figura 2 mostra que a quantidade de produto aumenta com o tempo de aquecimento, atingindo um máximo em 8 minutos em ácido clorídrico 4N. Além deste tempo, predomina a velocidade de destruição do produto. Com ácido clorídrico 2 N, tende-se mais vagarosamente a um máximo inferior ao obtido com ácido clorídrico 4 N.

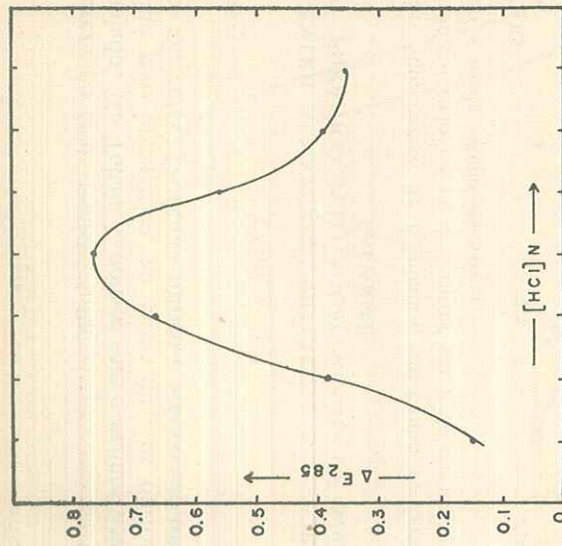


FIG. 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO SOBRE A FORMAÇÃO DE DERIVADO FURÂNICO.

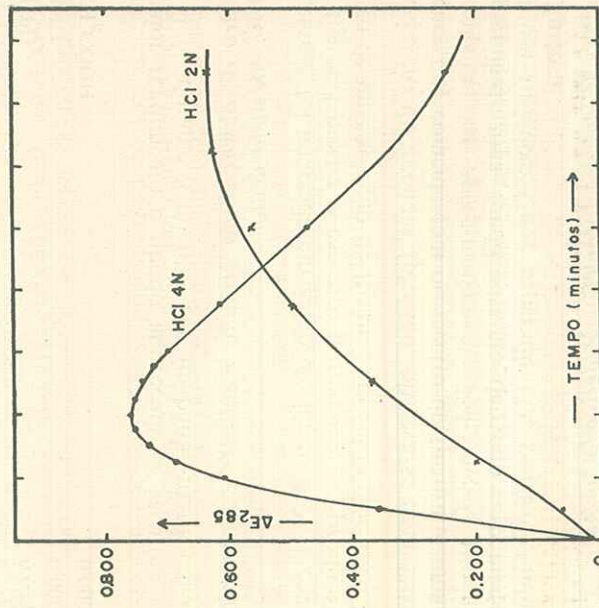


FIG. 2 - EFEITO DO TEMPO SOBRE A FORMAÇÃO DO DERIVADO FURÂNICO.

A natureza do ácido também influi no processo de formação do produto desejado. Na Tabela I, nota-se que o melhor ácido é o clorídrico, seguido pelo bromídrico, ao passo que, os outros ácidos são muito menos eficientes. Os ácidos nítrico e acético são totalmente ineficientes.

TABELA I

RELAÇÃO ENTRE A NATUREZA DO ÁCIDO E A FORMAÇÃO DE DERIVADO FURÂNICO PELO AQUECIMENTO DE SOLUÇÃO DE SACAROSE

CONDIÇÕES: Aquecimento de 8 minutos, em banho de água fervente, de 3 ml de solução contendo 100 µg de sacarose em ácido clorídrico 4N. Referência não aquecida usada como branco.

ÁCIDO	ΔE 285
HCl	0,774
HBr	0,607
HClO ₄	0,486
H ₂ SO ₄	0,213
CCl ₃ COOH	0,210
H ₃ PO ₄	0,021
HNO ₃	0,000
CH ₃ COOH	0,000

O maior rendimento é obtido aquecendo-se sacarose em ácido clorídrico 4 N, durante 8 minutos em um banho-maria em ebulição.

Espectro de absorção do produto resultante do aquecimento de sacarose em meio ácido

A sacarose foi aquecida em ácido clorídrico 4 N, durante 8 minutos. A figura 3 mostra o espectro ultravioleta do produto formado e o espectro de uma solução de furfural em ácido clorídrico 4 W.

No espectro do produto formado, observa-se uma faixa de absorção menor que coincide com o espectro do furfural e uma faixa de absorção máxima, em aproximadamente 284 nm. O produto forma 2,4-dinitrofenilhidrazona, sendo portanto derivado carbonílico de possível estrutura furânica, como esperado (1), provavelmente o 5-hidroximetilfurfural.

Comparação entre a formação de derivado furânico, a partir de frutose e outros glicídios

Nas condições experimentais utilizadas, a Tabela II mostra a não reatividade das aldoses, de seus derivados e de seus polímeros, ao lado

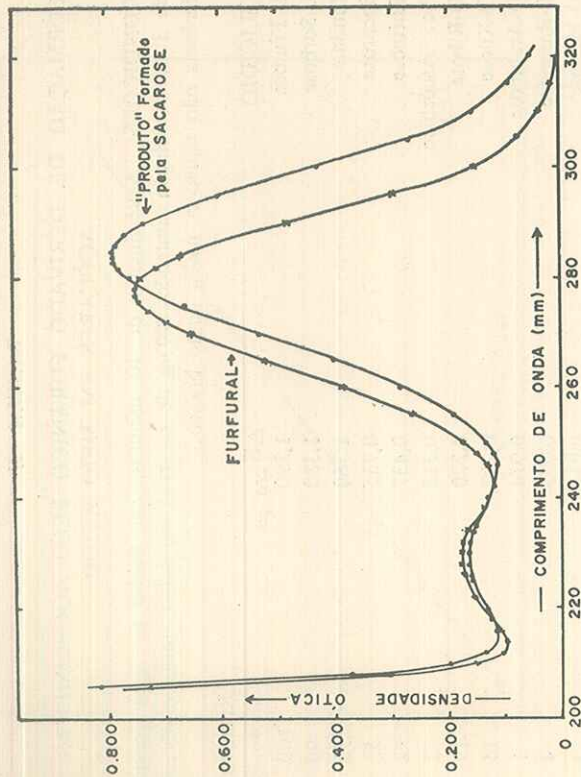


FIG. 3 - ESPECTRO DO FURFURAL 5x10⁻⁵M EM ÁCIDO CLORÍDRICO 4N E DO PRODUTO FORMADO PELO AQUECIMENTO DE SACAROSE 10,2x10⁻⁵M EM ÁCIDO CLORÍDRICO 4N.

da resposta dos cetossacarídeos, proporcional ao teor de cetohexoses. A sacarose deu conforme se esperava, um rendimento de aproximadamente 50%, a rafinose deu equivalente a um terço, e a unilina, sendo um polímero da cetohexose de referência, deu um rendimento de 100%. As aldopentoses (ribose e xilose) e o ácido ascórbico também formam, nessas condições, compostos que absorvem a 285 nm, interferindo, portanto, com a dosagem de cetossacarídeos. As demais substâncias, que absorvem radiação ultravioleta a 285 nm e que não se modificam pelo aquecimento em ácido, não interferem com a dosagem, pelo método proposto, devido ao tipo de branco utilizado.

Adiciona-se em cada tubo de ensaio, 2 ml de ácido clorídrico 6 N e 1 ml da solução da amostra. Os tubos são mergulhados em um banho-maria em ebulição. Após 8 minutos resfria-se os tubos rapidamente, pela sua imersão em banho de gelo. Seguem-se as leituras das densidades óticas a 285 nm, à temperatura ambiente. O branco é constituido pelo mesmo tubo de prova, omitindo-se o aquecimento.

Curvas Padrão

A figura 4 mostra a linearidade da curva de dosagem da sacarose e a grande sensibilidade que o método permite. Pode-se dosar

TABELA II

FORMAÇÃO DE DERIVADO FURÂNICO PELO AQUECIMENTO DE AÇÚCARES EM MEIO ÁCIDO

CONDIÇÕES: Aquecimento de 10 minutos, em banho de água fervente, de 3 ml de solução contendo 100 µg de sacarose em ácido clorídico 4N. Referência não aquecida usada como branco.

GLICÍDIO	$\Delta E_{285 \text{ nm}}$	Relativo a Frutose (%)
D-Frutose	1,390	100
L-Sorbose	1,380	99
Inulina	1,380	99
Sacarose	0,735	53
Rafinose	0,437	32
Ac. Ascórbico	0,315	22
D-Ribose	0,270	19
D-Xilose	0,202	15
D-Arabinose	0,074	5
L-Ramnose	0,053	4
D-Manose	0,034	3
Dextrana	0,030	2
Lactose	0,028	2
Amido Solúvel	0,019	1
D-Glicose	0,019	1
D-Galactose	0,014	1
D-Manitol	0,002	0

de 5 µg a 10 µg de sacarose, cobrindo-se uma faixa de densidade ótica de 0,040 a 0,765.

A figura 5 mostra a curva de dosagem da frutose pelo novo método, bem como pela sua variante colorimétrica, quando o derivado furânico é transformado em 2,4-dinitrofenilhidrazona, que é acompanhada a 435 nm, segundo procedimento analítico descrito por Robinson e colab. (14) para α -cetoácidos.

O método espectrofotométrico proposto, bem como sua variante colorimétrica, permite dosar quantidades tão pequenas quanto 2 µg de frutose.

Agentes inibidores da formação de derivado furânico pela sacarose

A Tabela III mostra o efeito inibidor dos nitratos, nitritos e da água oxigenada, sobre a formação do composto furânico. Nitratos, na concentração de aproximadamente 3×10^{-3} M, bloqueiam completa-

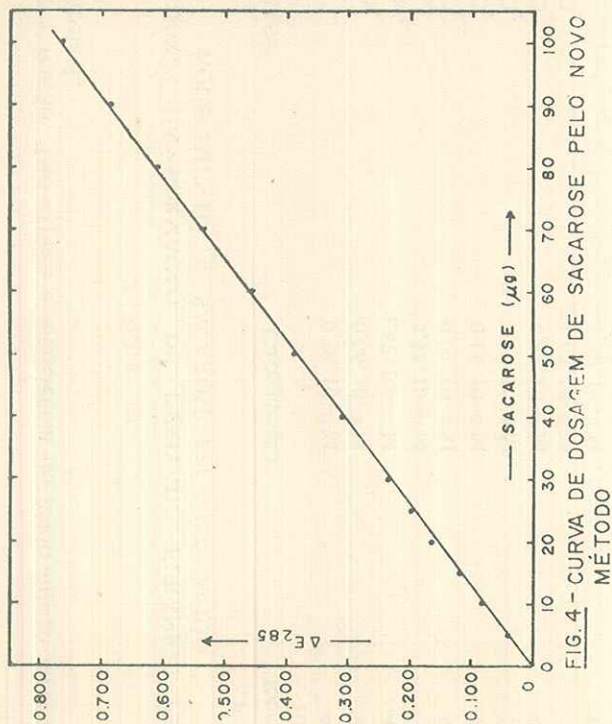


FIG. 4 - CURVA DE DOSAGEM DE SACAROSE PELO NOVO MÉTODO

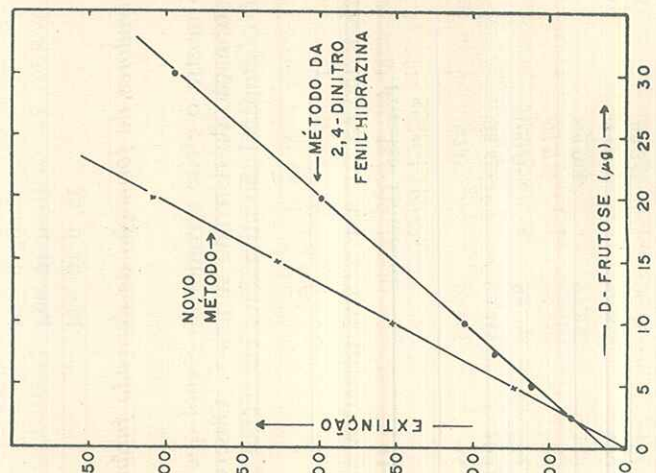


FIG. 5 - CURVAS DE DOSAGEM DA FRUTOSE

mente a reação. Isto explica a ineficiência do ácido nítrico mostrada na Tabela I.

TABELA III

INIBIDORES DA FORMAÇÃO DE DERIVADO FURÂNICO PELO AQUECIMENTO DE SACAROSE EM MEIO ÁCIDO

Substância	Concentração	ΔE_{285} Relativo
KNO ₃	0,38.10 ⁻³ M	100
KNO ₃	0,66.10 ⁻³ M	94
KNO ₃	1,67.10 ⁻³ M	89
KNO ₃	3,33.10 ⁻³ M	44
NaNO ₂	0,02.10 ⁻³ M	0
NaNO ₂	0,16.10 ⁻³ M	92
NaNO ₂	0,67.10 ⁻³ M	79
NaNO ₂	0,83.10 ⁻³ M	52
NaNO ₂	1,67.10 ⁻³ M	49
H ₂ O ₂	1,90.10 ⁻³ M	0
H ₂ O ₂	3,80.10 ⁻³ M	85
H ₂ O ₂	19, 0.10 ⁻³ M	71
H ₂ O ₂	38, 0.10 ⁻³ M	40
		0

Agentes ativadores da formação de derivado furânico pela sacarose

A figura 6 mostra o efeito ativador do etanol que chega aumentar em 30% a formação do derivado furânico. Observamos também que o metanol e o propanol são ativadores em menor grau.

TABELA IV

ANÁLISES COMPARATIVAS DE AMOSTRAS DE AÇÚCAR COMERCIAL

Amostra	Processo Titimétrico		Processo Espectrofotométrico	
	Shaffer-Hartman			
Açúcar Demarara	97,0%	99,0%	96,4%	95,0%
Açúcar Cristal	98,4%	98,4%	100,0%	99,4%
Açúcar Cristal	100,0%	99,2%	99,2%	99,0%
Açúcar Cristal	97,7%	98,1%	98,4%	98,6%
Açúcar Cristal	99,9%	97,8%	100,0%	98,8%
Açúcar Refinado	99,4%	98,8%	100,3%	102,0%
Açúcar Refinado	98,3%	100,4%	101,0%	101,0%
Açúcar Refinado	100,0%	101,0%	100,0%	101,0%
Açúcar Refinado	99,0%	100,1%	100,6%	99,1%

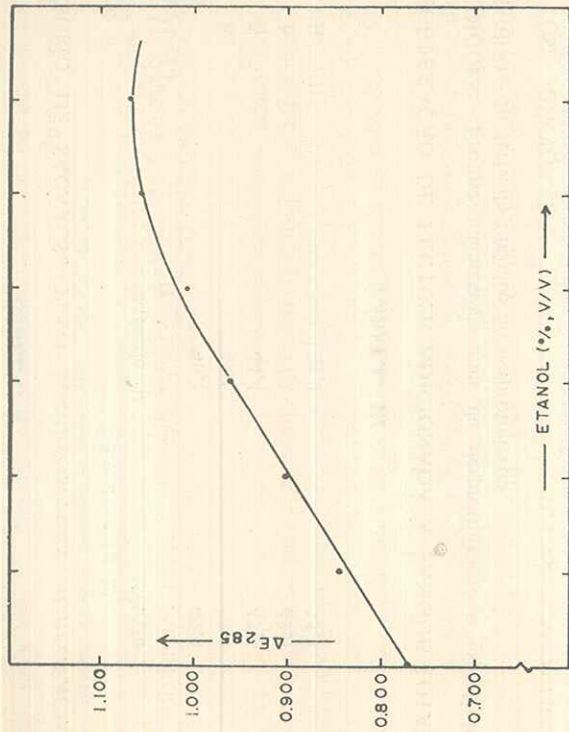


FIG. 6 - AUMENTO DA PRODUÇÃO DE DERIVADO FURÂNICO PELO ETANOL.

Aplicações do Método

O método foi aplicado na determinação de sacarose em amostras de açúcar comercial, no consumo de sacarose pelo *Streptomyces aureofaciens* em meio de cultura, e na determinação de frutose adicionada a sangue de coelho.

A Tabela IV mostra boa correspondência entre o método de Shaffer-Hartman (9) com o novo método, na determinação de sacarose em amostras de açúcar comercial.

Na Tabela V pode-se comparar a eficiência do novo método com o método de Hagedorn-Jensen (10-11), na medida do consumo de sacarose pelo *S. aureofaciens*. Apesar da complexidade das amostras ser maior, tem-se como na Tabela anterior, boa correspondência entre os dois métodos, na determinação de sacarose.

Finalmente, a Tabela VI mostra a recuperação perfeita da frutose, adicionada em sangue de coelho total, pela aplicação do novo método, após desproteínização.

TABELA V

CONSUMO DE SACAROSE PELO *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

Tempo de Fermentação início	Sacarose (g/l)	
	Método de Hagedorn-Jensen	Método Espectrofotométrico
8 h	49,5	49,4
16 h	49,6	50,4
24 h	44,4	47,6
36 h	37,3	42,3
	35,3	35,3

TABELA VI

RECUPERAÇÃO DE FRUTOSE ADICIONADA A SANGUE TOTAL

CONDIÇÕES: Frutose adicionada antes da desproteíntização e espectrofotometria direta do derivado furânico no desproteíntizado.

FRUTOSE ADICIONADA mg/ 100 ml	FRUTOSE ENCONTRADA PELO NOVO MÉTODO
10,0	2,0
20,0	13,2
40,0	23,2
	43,0

DISCUSSÃO

Wolfrom e colab. (15) utilizaram a espectrofotometria ultravioleta para elucidar o mecanismo de conversão de D-glicose em 5-hidroximetilfurural. O ácido foi utilizado como catalizador. Comparando-se o espectro ultravioleta do presente trabalho com os espectros de Wolfrom e colab. (15), concluiu-se que o produto resultante do aquecimento de sacarose e frutose em ácido clorídrico 4N., durante 8 minutos, é o 5-hidroximetilfurural. Garrett e Blanch (3) mostraram, cromatograficamente, que o produto da degradação de frutose em ácido clorídrico a 80°C, é o 5-hidroximetilfurural.

Os dados experimentais sugerem que a formação do derivado furânico não depende apenas da concentração, mas também, da natureza do ácido, pois, ácidos diferentes levam a resultados diferentes e os ácidos acético e nítrico não agem.

Teunissen (16) estudou o efeito do etanol sobre a decomposição do 5-hidroximetilfurural em ácido fórmico e levulínico, verificando

que a velocidade da decomposição do 5-hidroximetilfurural é diminuída pelo etanol. No presente método, a adição de etanol atuaria como um agente preventivo da decomposição do produto da reação, o que aumentaria a sensibilidade das determinações.

O efeito inibitório do íon nítrico, do íon nitrato e da água oxigenada podem estar relacionados com o processo de formação do derivado furânico, como catalizador negativo, uma vez que se observa interferências, em concentrações baixas.

O método foi aplicado em amostras biológicas complexas, tais como, sangue e meio de cultura, com resultados satisfatórios. Isso mostra que o processo não sofre a interferência dos constituintes biológicos, pelo menos nas concentrações em que eles aparecem nas amostras. Além disso, trata-se de método que supera os métodos clássicos, quanto à simplicidade e rapidez.

O método espectrofotométrico, proposto por Garrett e Blanch (3), para a dosagem de sacarose e frutose e o método de Pfeifer e Doyle (17) são muito semelhantes a este método. O método de Garrett e Blanch (3) utiliza ácido clorídrico 1N e um tempo de aquecimento a 80°C, acima de 9 horas. O método de Pfeifer Doyle (17) utiliza o ácido clorídrico 4 N, mas o tempo de aquecimento a 80°C, é igualmente longo. Também o método proposto é anterior aos acima citados, pois já fora apresentado em 1964, em reunião científica, cujo resumo foi publicado na mesma data (18).

O novo método não se baseia na determinação de nenhum evento químico novo, apenas aproveita o que se conhece desde há muito tempo sobre química de açúcares. A concentração de ácido clorídrico e o tempo de aquecimento foram ajustados de tal forma que praticamente só as cetoses são degradadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — Newth, F. H., "The Formation of furan compounds from hexoses", vol. 6, Academic Press, New York, 1951, p. 83.
- 2 — Doyle, R. J., and Pfeifer, M. A., *Microchem. J.* 16, 273, 1971.
- 3 — Garrett, E. R. and Blanch, J., *Anal. Chem.* 39, 1109, 1967.
- 4 — Garrett, E. R., Blanch, J. and Seydel, J. K., *J. Pharm. & Ci.*, 39, 1560, 1967.
- 5 — Garrett, E. R. and Dvorchik, B. H., *J. Pharm. Sci.*, 58, 813, 1969.
- 6 — Seydel, J. K. and Garrett, E. R., *Anal. Chem.* 37, 271, 1965.
- 7 — Nomura, D., *J. Fermentation Technol.* 33, 494, 1955.
- 8 — Liederman, E., *Die Stärke* 7, 280, 1955.
9. — Shaffer, P. A. and Hartman, A. F., *J. Biol. Chem.* 45, 349, 1921.

- 10 — Hagedorn, H. C. and Jensen, B. N., *Biochem., Z.*, 135, 46, 1923.
- 11 — Hagedorn, H. C. and Jensen, B. N., *Biochem., Z.*, 137, 92, 1923.
- 12 — Somogyi, M., *J. Biol. Chem.*, 86, 655, 1930.
- 13 — Molinari, R., *Anais do 1º Simpósio de Fermentação*, São Paulo, 1964.
- 14 — Robinson, J. C., Keay, L., Molinari, R. and Sizer, I., *W.*, 237, *J. Biol. Chem.*, 2001, 1962.
- 15 — Wolfrom, M. L., Schuetz, R. D. and Cavalieri, L. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 514, 1948.
- 16 — Teunissen, H. P. *Rec. Trav. Chim.*, 50, 1, 1931.
- 17 — Pfeifer, M. A. and Doyle, R. J., *Microchem. J.*, 17, 508, 1972.
- 18 — Molinari, R. e Lalue, C., *Ciência e Cultura*, 16, 184, 1964.

Agradecimentos.

A Laboroterapica Bristol S.A., Indústria Química e Farmacêutica que possibilitou a realização das experiências deste trabalho em sua Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento.