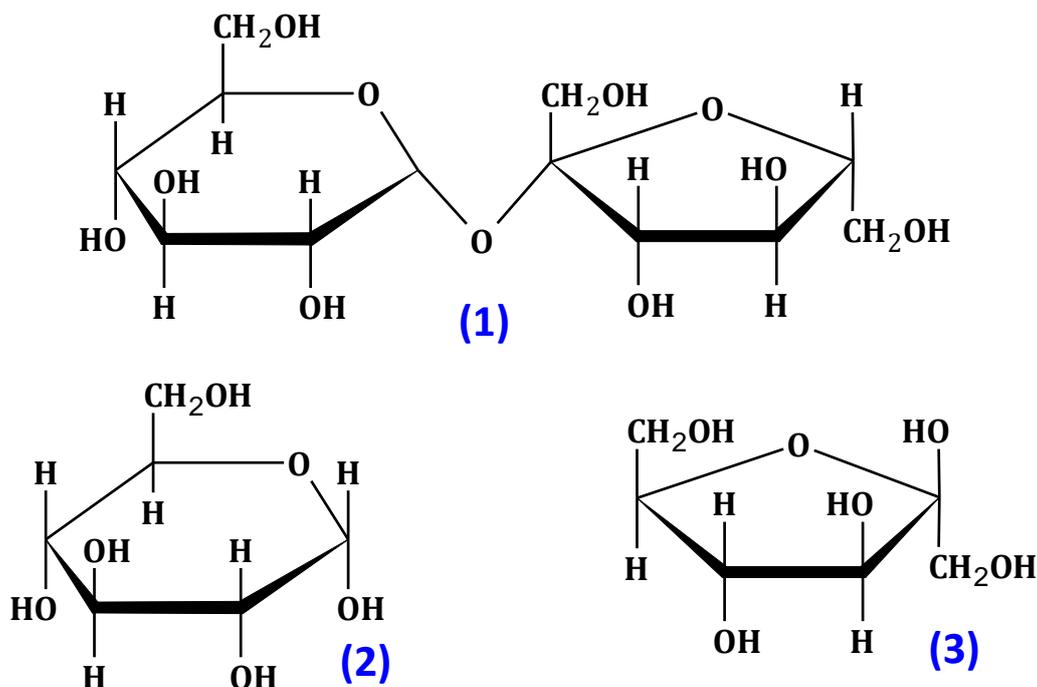


TRABALHO LABORATORIAL

DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE AÇÚCARES REDUTORES

INTRODUÇÃO

A sacarose, o vulgar açúcar, é um hidrato de carbono de ocorrência natural em muitas plantas, principalmente nas suas raízes, frutos e néctares pois é uma forma de armazenamento de energia, obtida principalmente a partir da fotossíntese. A molécula da sacarose, ou α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranósido (1), tem a fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ e é um dissacarídeo, ou seja é composta por duas unidades monoméricas, a D-glucose (2) e a D-frutose (3).



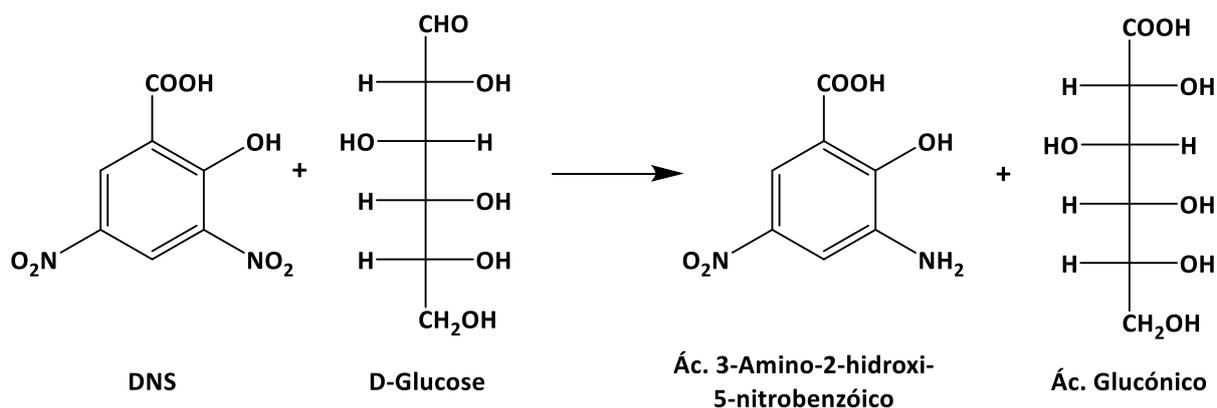
A hidrólise da sacarose, por via enzimática (ver texto de apoio Cinética da catálise pela invertase da UC de Termodinâmica) ou por via química (catálise ácida ou básica) resulta na formação dos dois monómeros referidos.

Embora a sacarose não seja um açúcar redutor os seus monómeros constituintes, glucose e frutose, possuem propriedades redutoras (ver capítulo teórico de Hidratos de Carbono). Esta propriedade, que se baseia na existência de um grupo aldeído ou cetona livres nos hidratos de carbono, é a base de diversos métodos de doseamento dos açúcares em

matrizes complexas, das quais se destacam os alimentos, através da redução de diversos materiais, como por exemplo sais de cobre ou prata em maio alcalino.

O método utilizado neste trabalho laboratorial utiliza a referida característica redutora para efetuar a quantificação dos açúcares. Assim, o método baseia-se na promoção da oxidação da glucose ou frutose pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que apresenta uma cor laranja, em meio básico. Nesta reação a glucose é oxidada a ácido glucónico e o DNS é reduzido ao ácido 3-amino-2-hidroxi-5-nitrobenzóico que apresenta uma cor acastanhada (Ver figura abaixo). Através desta alteração de coloração no reagente reduzido é possível medir a quantidade de açúcar redutor já que a reação tem a estequiometria de 1:1. No entanto, a equivalência entre o ácido 3-amino-2-hidroxi-5-nitrobenzóico produzido e a quantidade de açúcar não é sempre a mesma pois açúcares diferentes produzem intensidades de cor diferente, o que sugere que a reação química possa ser mais complexa que a expressa na figura. Assim, para que esta determinação seja possível é necessário construir uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas dos açúcares em estudo.

Baseando-nos nas premissas anteriores, o presente trabalho laboratorial consiste na construção de uma curva padrão para o doseamento dos açúcares redutores glucose e frutose utilizando-se o método espectrofotométrico do UV-Vis para medir a intensidade de cor do ácido 3-amino-2-hidroxi-5-nitrobenzóico a 540 nm. Os dados obtidos nesta prática laboratorial serão utilizados para o trabalho laboratorial de cinética da enzima invertase na UC de Termodinâmica.



Procedimento – Solução Padrão Glucose/Frutose:

- 1 - Identifique convenientemente os tubos conforme a tabela abaixo.
- 2 - Proceda à transferência com pipeta automática para os respectivos tubos do volume correspondente de solução padrão de glucose/frutose, conforme tabela.
- 3 - Adicione o volume correspondente de solução tampão conforme indicado na tabela. Agite os tubos no vórtex.
- 4 - Adicione o reagente de DNS e agite imediatamente no vórtex até a solução estar perfeitamente homogênea. Repita o processo para todos os tubos.

		Padrões					
TUBO (mL)	B	1	2	3	4	5	6
Reagente de DNS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sol. Padrão Glucose/Frutose	-	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0
Solução Tampão	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	-
Agitar os tubos no vórtex							

- 5 - Coloque os tubos de ensaio em banho-maria à ebulição durante exatamente 8 minutos. É importante que a água esteja em ebulição quando os tubos forem colocados no banho.
- 6 - Colocar os tubos num banho de gelo. Adicionar 10 mL de água destilada a cada um dos tubos e retirar do gelo. Agitar os tubos no vórtex até solução perfeitamente homogênea.
- 7 - Quando os tubos estiverem à temperatura ambiente ler no espectrofotômetro a absorvância das soluções a 540 nm, usando o tubo de branco como referência.

Solução de Sacarose

- 8 - Repita os pontos 1 a 4 do procedimento anterior, como se fosse para o tubo 6, utilizando a solução de sacarose disponibilizada em substituição da solução padrão de glucose.
- 9 - Coloque o tubo de ensaio em banho-maria à ebulição durante X minutos. É importante que a água esteja em ebulição quando o tubo for colocado no banho.
- 10 - Repetir os pontos 6 e 7 do protocolo experimental.