



CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS

Carla Maris Bittar
carla@esalq.usp.br





Análise de carboidratos não estruturais

- O método é apropriado?
- O método é robusto, tem repetibilidade,...?
- Qual é a magnitude do erro?
- Preocupações específicas, substratos problemáticos?
- Aplicação?

Definição de método



- Empírico
 - O método define a fração
 - Deve seguir o método de maneira precisa
 - Não existem padrões para confirmar a análise
 - Exemplos: FDN, Lignina Klason, CHO's solúveis



Definição de método

- Não-empírico
 - Método mede um analito específico
 - Padrões estão disponíveis para confirmar a análise
 - Exemplos: cálcio, amido, glicose

- Qualitativo
 - Pode fornecer um dado numérico, mas o valor não é absoluto.
 - Exemplo: digestibilidade

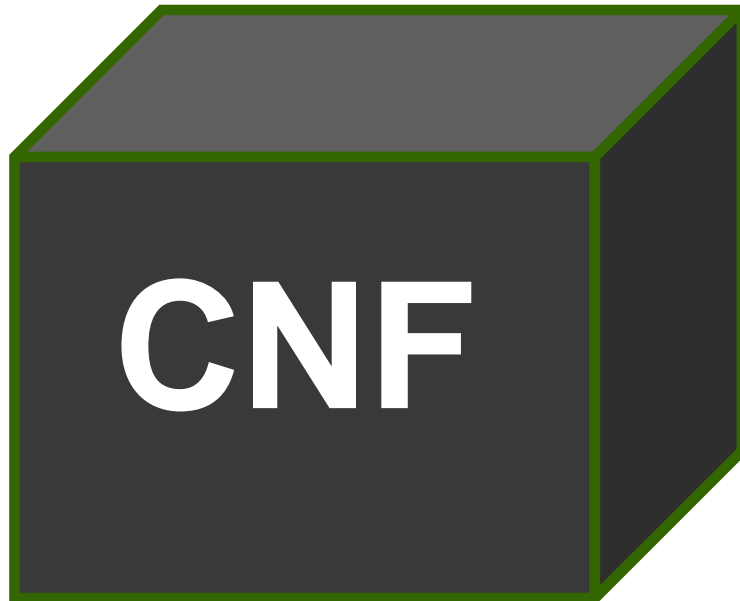
Definição de carboidrato



- Grau de polimerização (GP)
 - No. de unidades de açúcar ligadas covalentemente
 - Monossacarídeos
 - Dissacarídeo: 2 unidades de açúcar
 - Oligosacarídeos: 2 a ~9 unidades de açúcar
 - Polissacarídeos: $GP > 9$ unidades de açúcar
- Fibra: Carboidrato indigestível a enzimas mamíferas

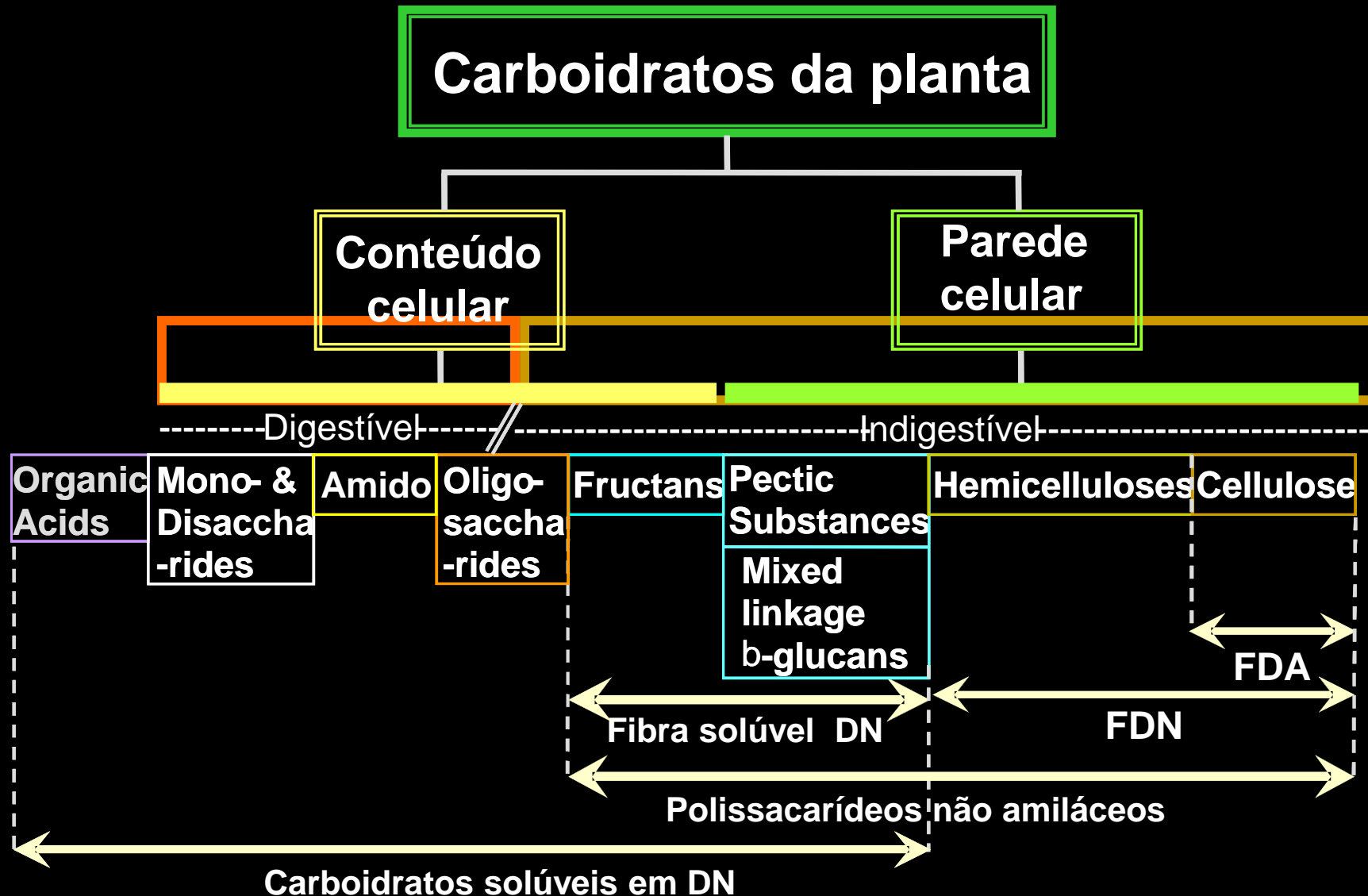
Carboidratos Não-FDN (~1860)

- $ENN = 100 - PB - FB - EE - Cz$
- $CNF = 100 - PB - (FDN - FDN_{PB}) - EE - Cz$

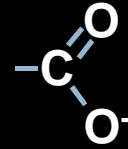


- Muito digestível (98%?)
- Erro
- Acurácia de N x 6,25
- química e nutricionalmente diverso

Fracionamento de carboidratos

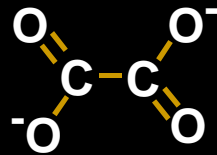


Ácidos Orgânicos

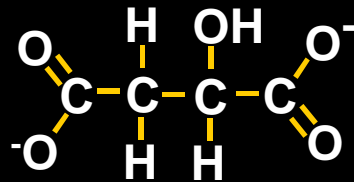


Ácidos orgânicos de plantas

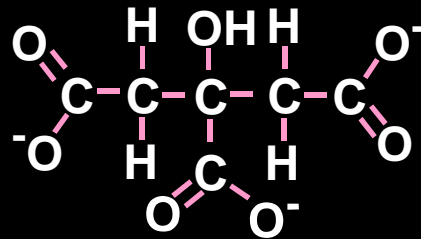
Oxalato



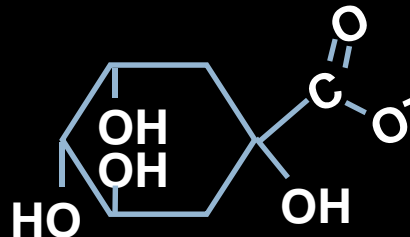
Malato



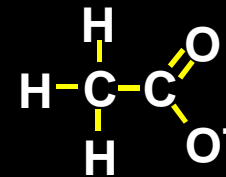
Citrato



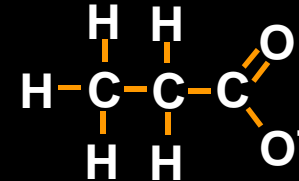
Quinato



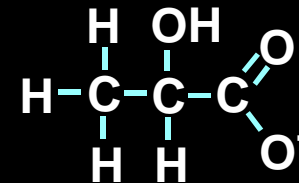
Ácidos de fermentação



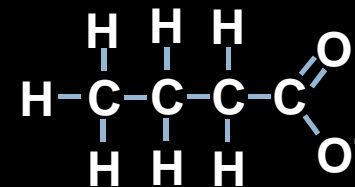
Acetato



Propionato

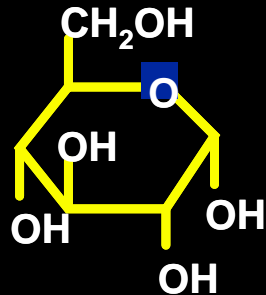


Lactato

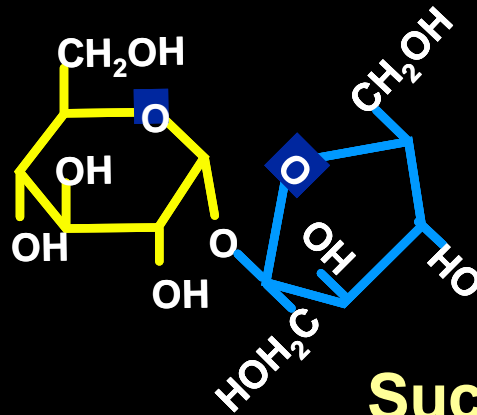


Butirato

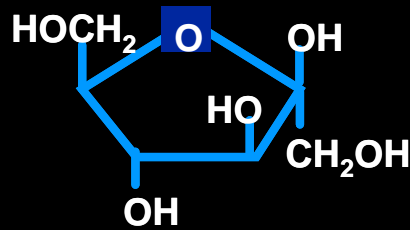
Mono- e Oligosacarídeos



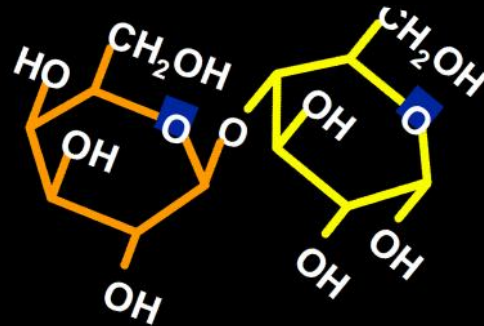
Glucose



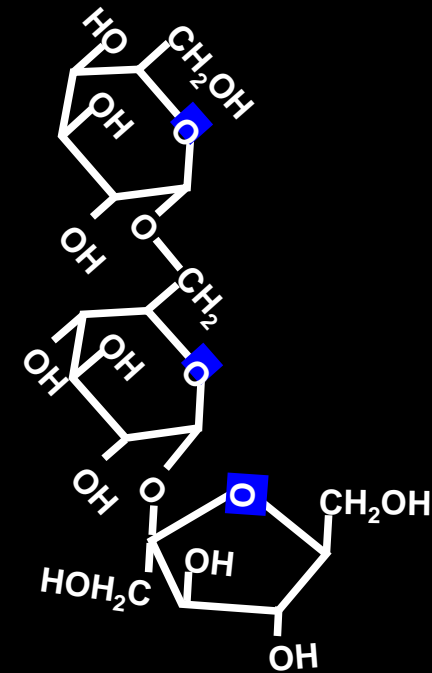
Sucrose



Fructose



Lactose

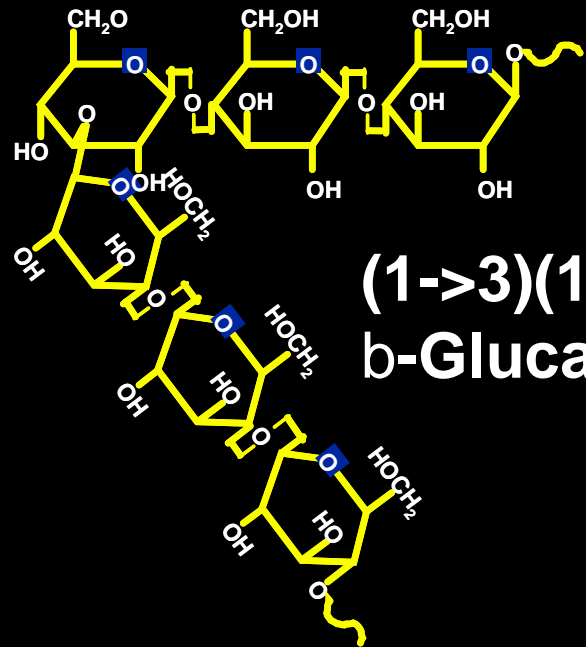


Rafinose

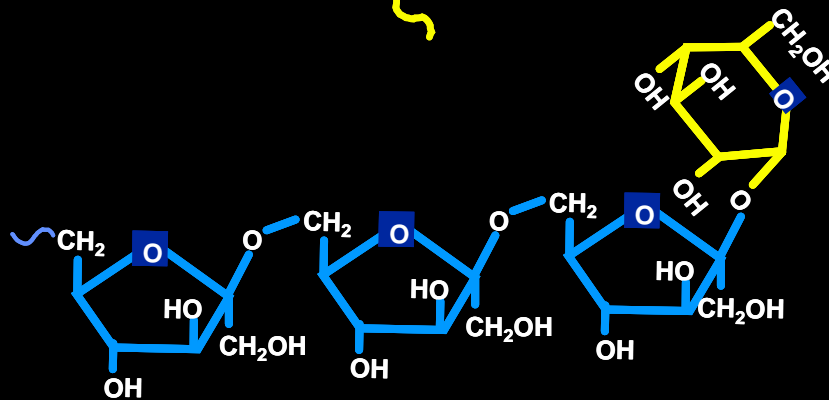
Fermentável, possivelmente digestível por enzimas mamíferas.

Fermentável, não digestível por enzimas mamíferas.

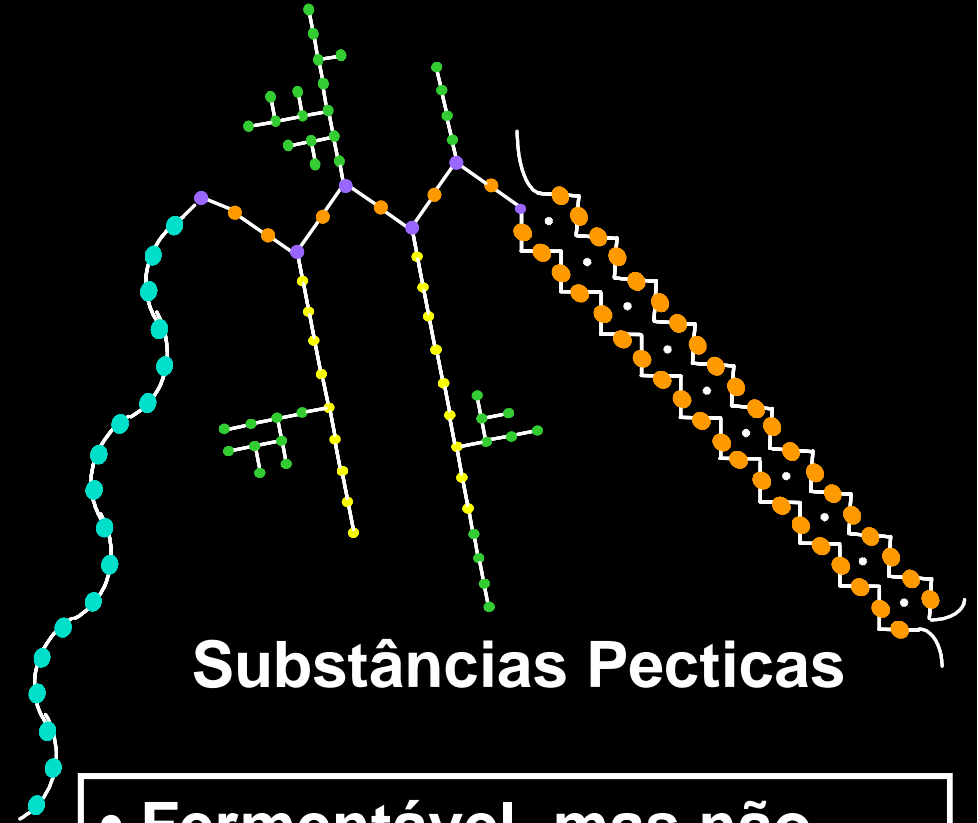
Fibra solúvel: grande diversidade



(1->3)(1->4)-
 β -Glucana



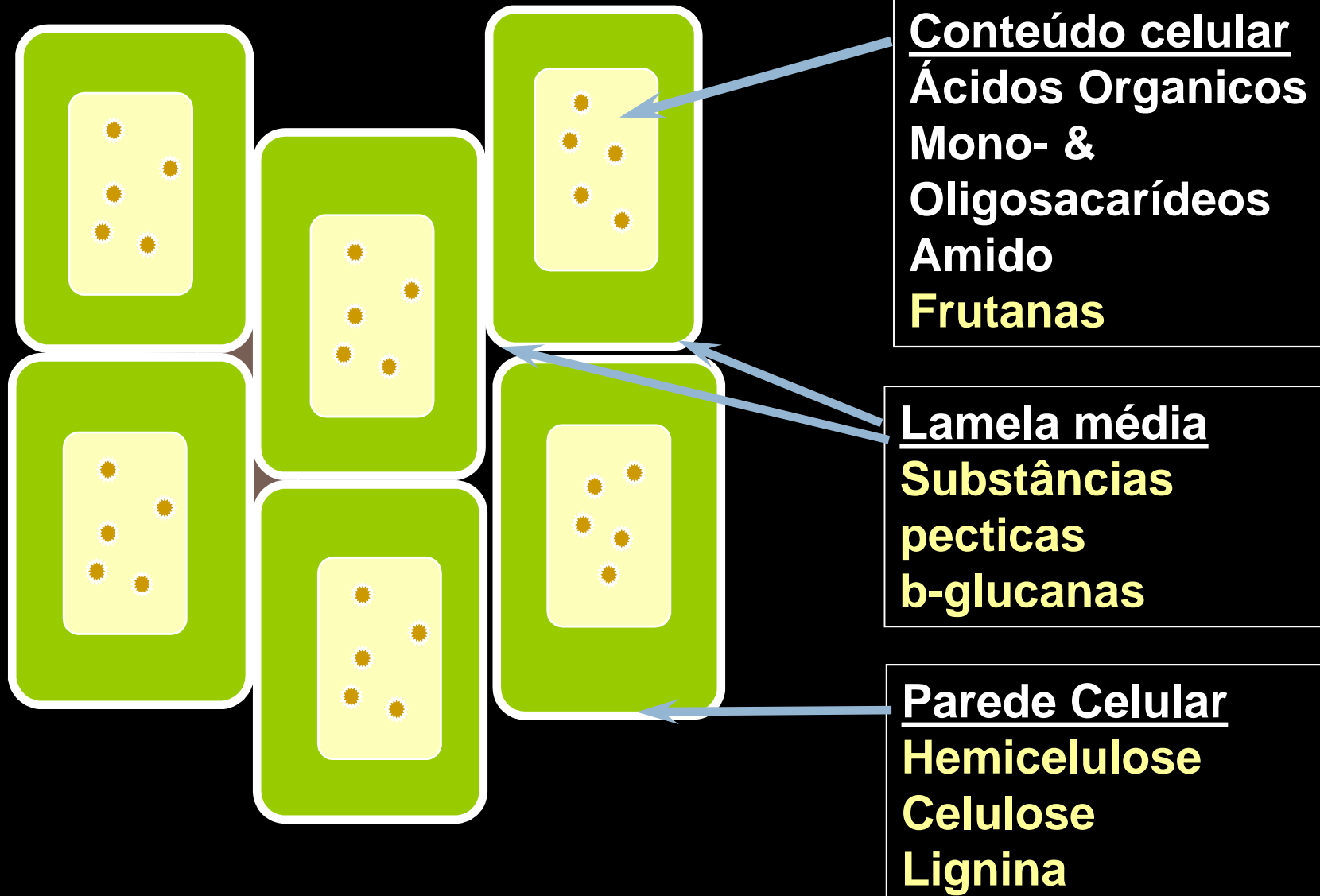
Fructanas



Substâncias Pecticas

- Fermentável, mas não digestível por enzimas mamíferas
- Solúveis em detergente neutro; não estão no FDN

Estrutura celular de plantas



Alimentos processados/Co-produtos



Ác. orgânicos

Mono- &

Oligossacarídeos

Amido

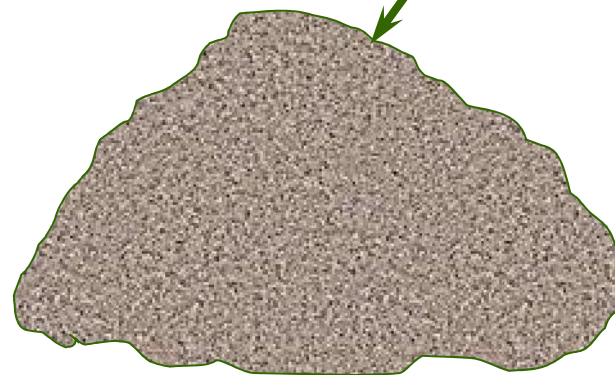
Dextrinas

Fructanas

Substancias

Pecticas

β -glucanas



Hemicelulose

Celulose

Lignina

O protocolo fraciona os carboidratos de forma acurada quando associações iônicas, covalentes e físicas normalmente presentes nas células vegetais estão ausentes?

Preparo da amostra



- Amostra úmida
 - estufa de ventilação forçada a 55°C
 - Liofilizador
- Moagem: Moer TUDO através da peneira
 - Pré moagem em peneira de 8 ou 5 mm (?)
 - 1 mm ou 0,5 mm em moinho de faca (Wiley)
 - 1 mm abrasão (Cyclone)
- Mistura inicial e subamostragem
- Subamostragem para análise



Efeito da temperatura de secagem



Valores analíticos de amostras de silagem de milho moídas através de moinho de abrasão ou de facas após secagem a 55 ou 105°C

| | Moinho de abrasão | | Moinho de faca | | EPM | <i>p</i> | | |
|---------------------------|-------------------|-------|----------------|-------|------|----------|-------|-------|
| | 55°C | 105°C | 55°C | 105°C | | M | T | M x T |
| MS, % | 90,2 | 92,8 | 90,3 | 92,6 | 0,23 | 0,79 | <0,01 | 0,47 |
| Glucose livre x 0,9, % MS | 0,36 | 0,11 | 0,39 | 0,12 | 0,10 | 0,75 | <0,01 | 0,93 |
| Amido, % MS | 33,1 | 33,0 | 34,0 | 32,5 | 1,8 | 0,72 | 0,15 | 0,26 |
| EP do valor de amido | 0,37 | 0,28 | 0,54 | 0,47 | 0,09 | 0,01 | 0,20 | 0,93 |

M: efeito de moagem

T: efeito de temperatura de secagem

Adaptado de Hall & Mertens, 2008

Efeito da moagem



Valores analíticos de amostras de milho laminado a seco ou silagem de grão úmido moídas através de moinho de abrasão ou de facas

| | Moinho de abrasão | | Moinho de faca | | EPM | <i>p</i> | | |
|---------------------------|-------------------|------|----------------|------|------|----------|-------|-------|
| | MLS | SGU | MLS | SGU | | M | P | M x P |
| MS, % | 94,6 | 95,2 | 93,5 | 94,1 | 0,13 | <0,01 | 0,03 | 0,97 |
| Glucose livre x 0,9, % MS | 0,32 | 0,09 | 0,37 | 0,09 | 0,02 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| Amido, % MS | 73,1 | 74,6 | 69,7 | 74,1 | 0,7 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| EP do valor de amido | 0,44 | 0,69 | 0,69 | 0,88 | 0,25 | 0,40 | 0,82 | 0,91 |

Adaptado de Hall & Mertens, 2008

MLS= milho laminado a seco

SGU= milho de grão úmido

M: efeito de moagem

P: efeito de processamento

Solubilidade



- Solúvel em que?
- Fatores que afetam extração
 - afinidade extrator vs. matriz
 - Temperatura
 - Polímeros ramificados tendem a ser mais solúveis
 - Tamanho do carboidrato
 - Tamanho de partícula
 - Relação amostra:extrator

Extratores: Carboidratos



- Água
- Solução tampão
- Solução alcoólica

Água destilada



- Extrai carboidratos de baixo PM e polissacarídeos
- Água fria
 - Frutanas (Wylam, 1954)
 - Parte das pectinas (Bailey et al., 1978)
 - Dextrinas (Southgate, 1976)
- Southgate, 1976: Use água se substâncias interferentes não são um problema

Tampões

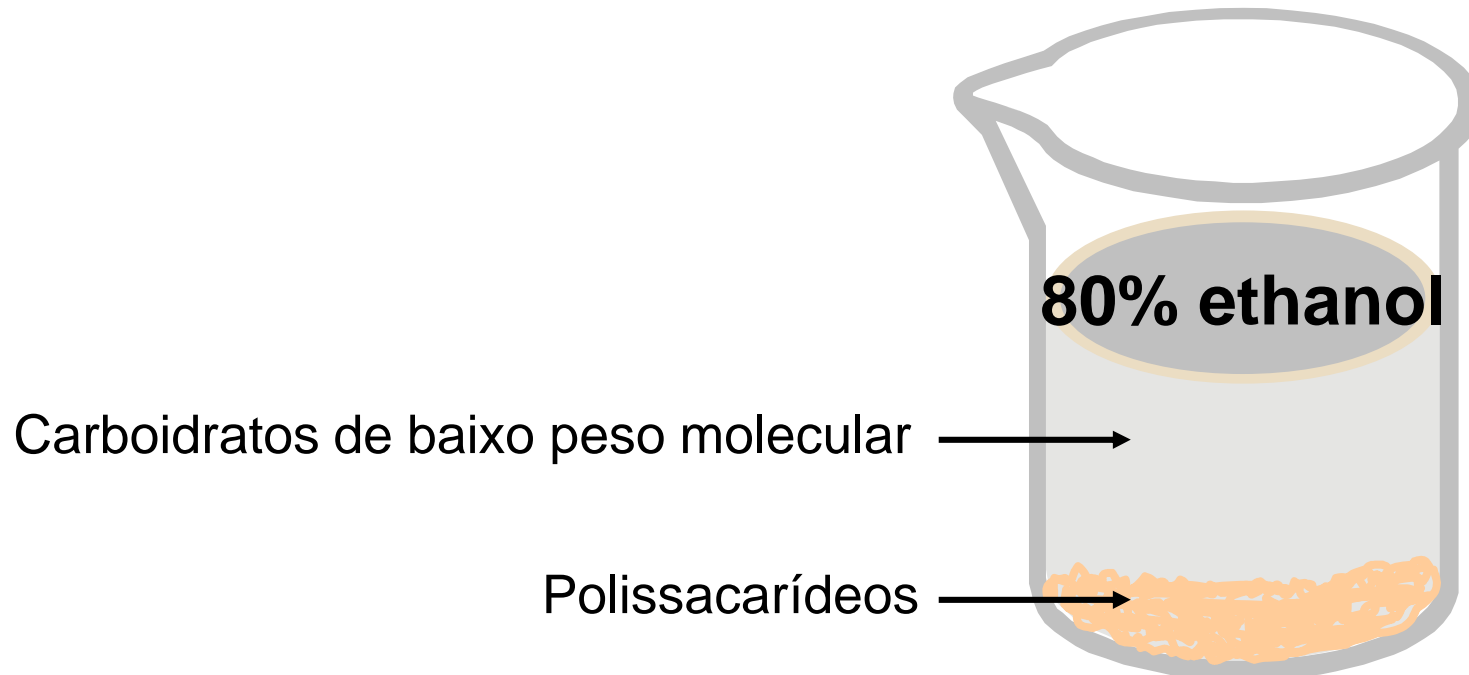


- Polissacarídeos
 - Tampão de acetato (0,1 M, pH 4,0)
 - Tampão de fosfato (0,1 M, pH 6,0)
- Pectina despolimerizada em pH próximo a neutralidade
 - Tampão fosfato (Albersheim, 1959; Monro, 1991)

Solução Alcoólica



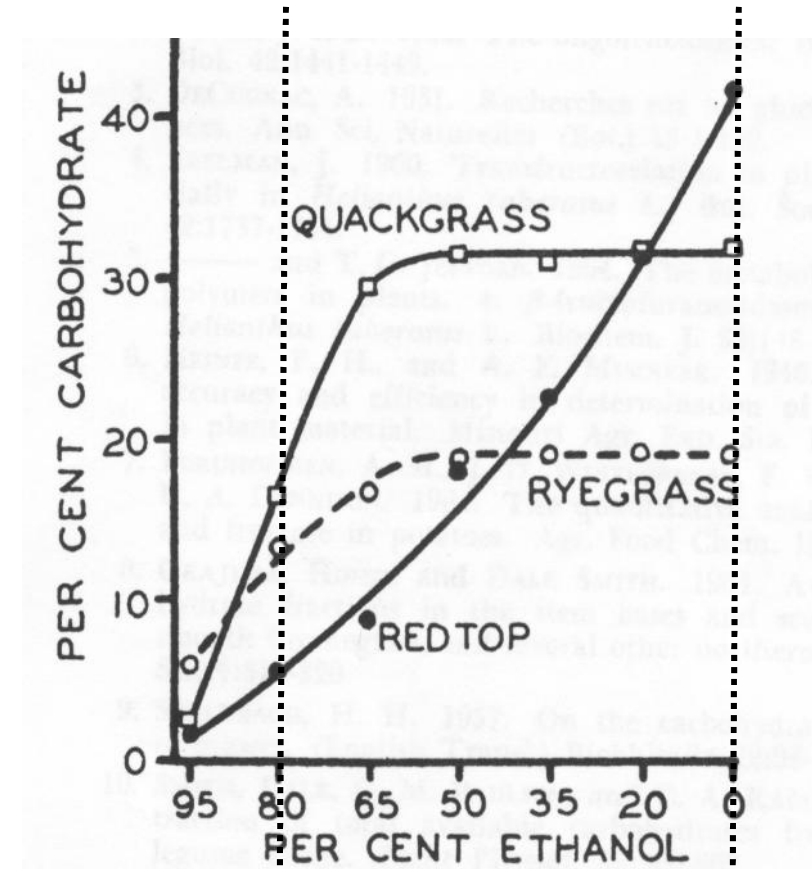
- Etanol 78 - 80% utilizado para separar carboidratos de baixo peso molecular de polissacarídeos e proteínas (Asp, 1993).



Solução alcoólica



- Material extraído varia com a concentração de etanol
- Frutanas variam em solubilidade em 70-90% EtOH, provavelmente de acordo com o GP



Mono, di e oligossacarídeos+ frutanas



Predação microbiana

- Soluções que permitem crescimento microbiano podem apresentar redução em carboidratos
- Preservante adicionado após extração em extratos com água fria (Thomas, 1977)
- Soluções padrão de CH_2O em água destilada: sujeitas a redução mesmo em baixas temperaturas
- Ácido benzóico saturado: bom preservante para soluções estoque; checar compatibilidade com o protocolo de análise
- 80% EtOH também é um bom preservante

Carboidratos solúveis



- Análise de açúcares redutores
- Reações de condensação
- Método enzimático
- GC ou HPLC



Açúcares redutores

- Em uso desde 1841*
- Todos os carboidratos devem ser hidrolisados a monômeros para a determinação
 - Frutose (cetose) é mais sensível a destruição do que glicose (aldose)
 - Condições da hidrólise devem ser escolhidas de forma a maximizar hidrólise e minimizar destruição
- Padronização necessária para bons resultados
- Proteína e substâncias redutoras podem interferir
- Não funciona com soluções de etanol

*McCollum, 1957

Análise de condensação



- Reação de monossacarídeos com compostos fenólicos em ácido forte
- Especificidade para diferentes monômeros conseguida com ajustes nas condições de aquecimento e força do ácido
- Pré-hidrólise não é necessária
- Pode analisar soluções aquosas contendo etanol
- Usa carboidrato predominante como padrão.

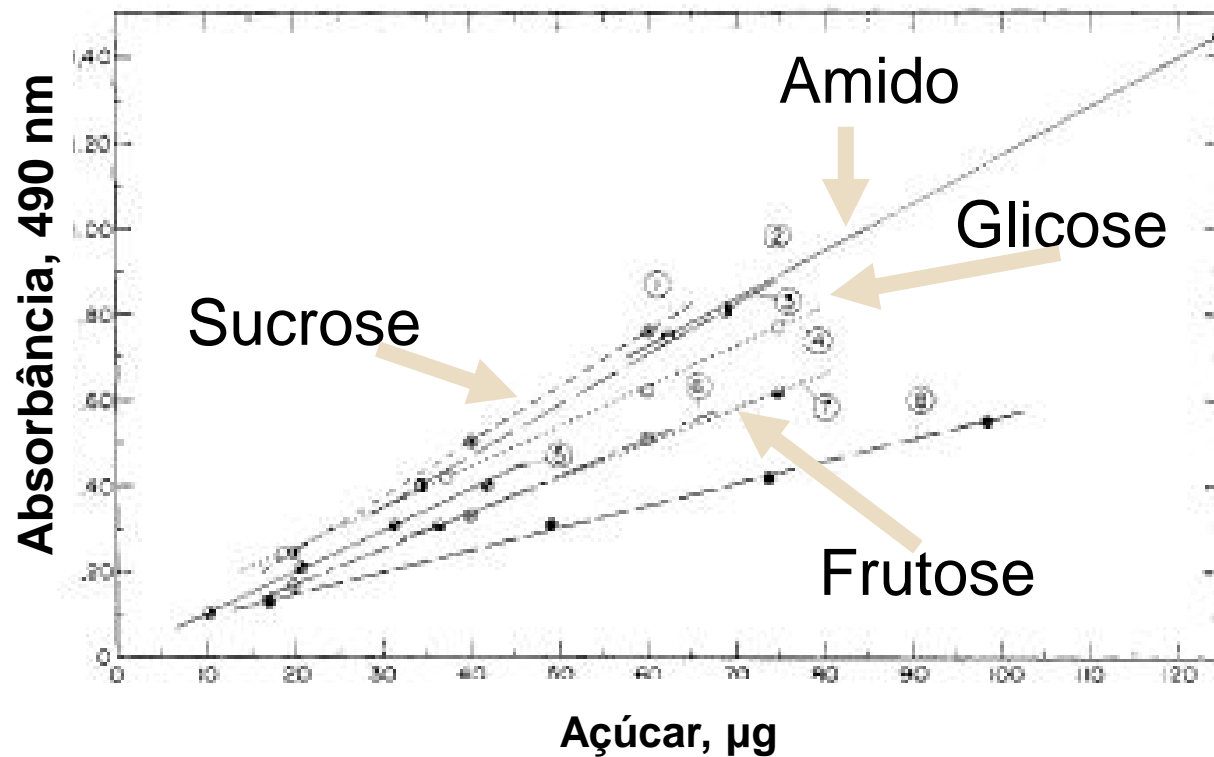
- Como escolher o padrão?



Protocolo fenol-ácido sulfúrico

- Carboidratos diferentes resultam em curvas padrão diferentes (Dubois et al., 1956).
- Contaminação com carboidrato
 - lave tubos de teste
 - análises em triplicata
- Quando analisar soluções contendo etanol, dilua com água para minimizar perdas por aquecimento quando adicionar ácido na solução

Protocolo fenol-ácido sulfúrico



- Açúcares diferentes respondem de forma diferente
- Escolha do açúcar como padrão altera a curva padrão



Protocolo fenol-ácido sulfúrico

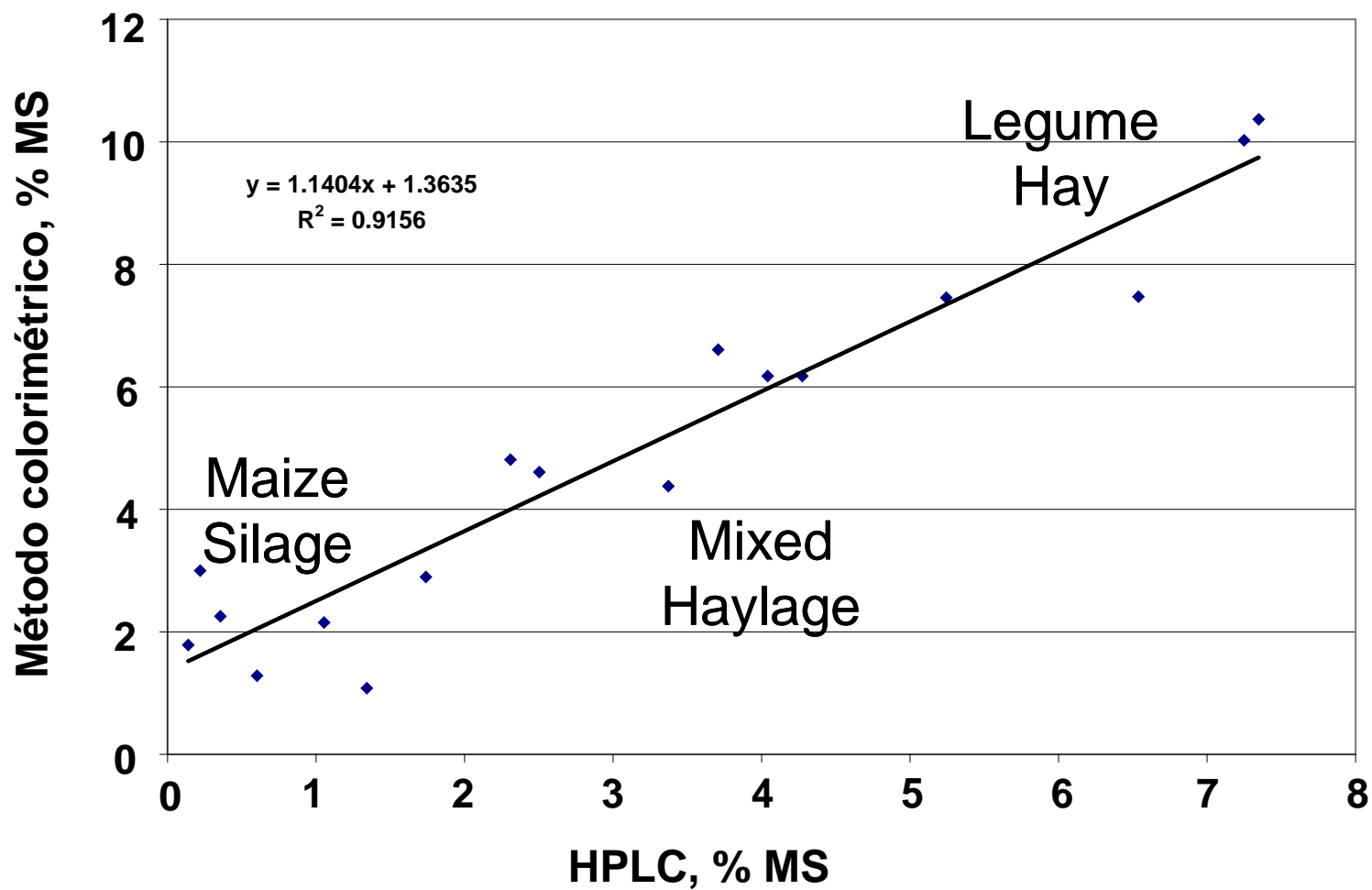
- Solução 5% fenol, ácido sulfúrico concentrado, amostra diluída
- Pipete 0,5 mL de amostra no tubo, triplicata
- Pipete 0,5 mL solução de fenol no tubo
- Adicione 2,5 mL H_2SO_4
- Agite e cubra com bolas de vidro
- Incube 20 min a 30°C
- Leia a absorbância a 490 nm em cubetas resistentes a ácido

Proteja amostras da luz solar!

Protocolo fenol-ácido sulfúrico



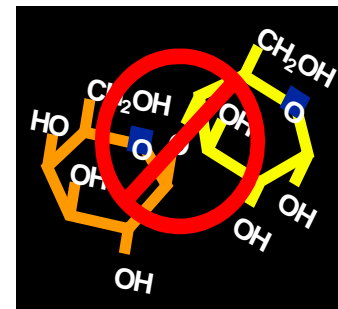
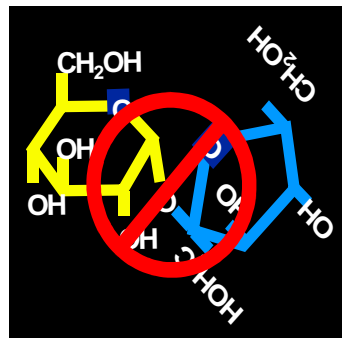
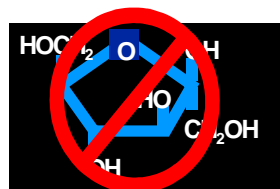
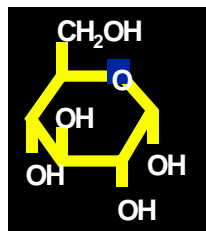
Análises vs. analíto



Hall and Taysom, não publicado

Método enzimático

- Glicose oxidase-peroxidase (Karkalas, 1985)
- Sistema YSI: membrana com glicose oxidase
- Muito específico para glicose livre
- Não detecta monômeros ou glucanas não hidrolisadas
- Não estima completamente carboidratos solubilizados



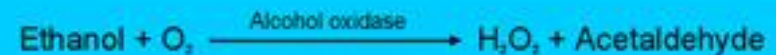
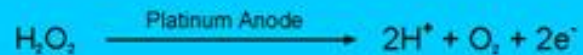
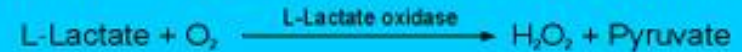
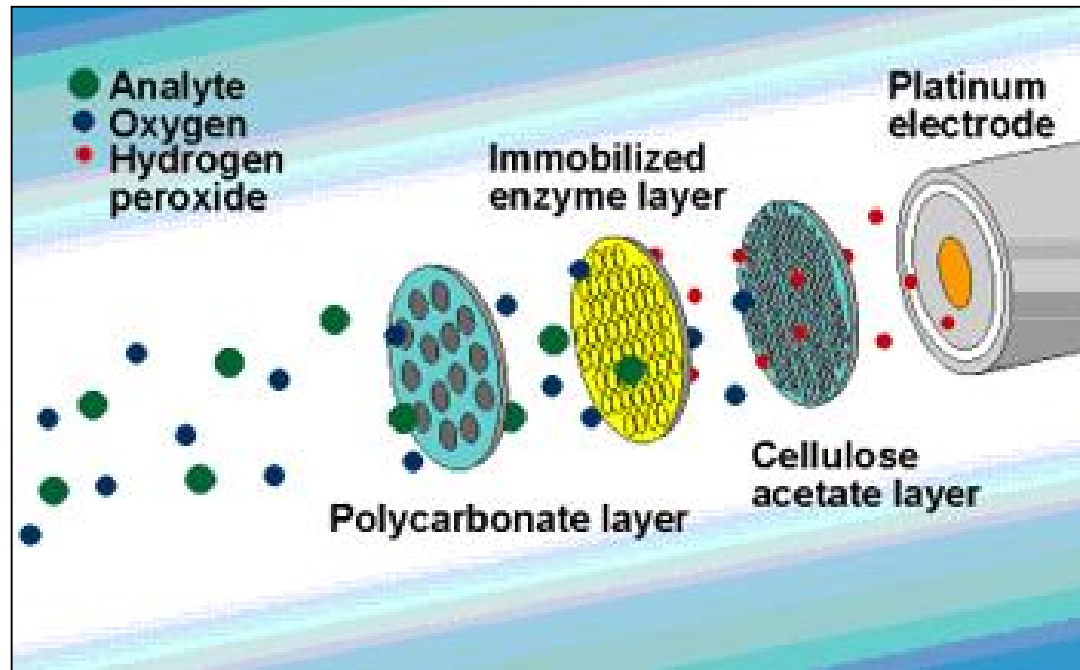
YSI 2700



- Glicose
- Lactato
- Glutamina
- Glutamato
- Ethanol
- Lactose
- Sucrose Galactose
- Hydrogen peroxide
- Metanol
- Colina
- Xilose

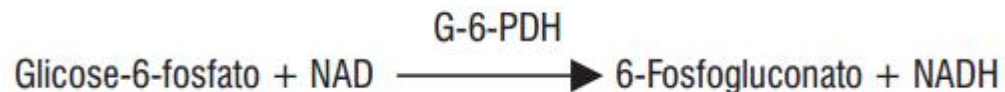


YSI 2700



Método enzimático

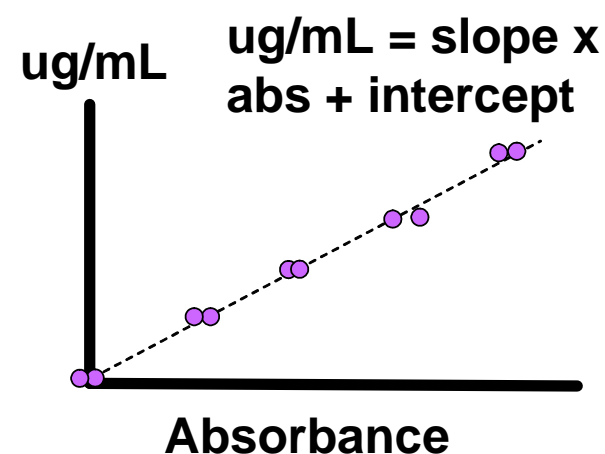
- Kits enzimáticos específicos
- Incubação no próprio equipamento
- Leitura em comprimento de onda específico



Preparação da curva padrão



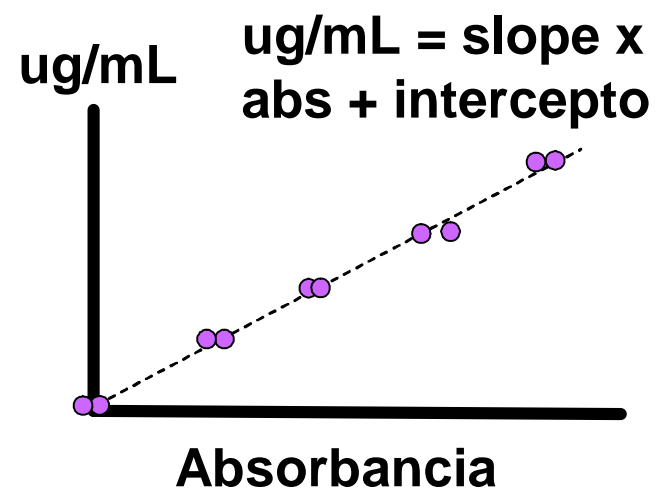
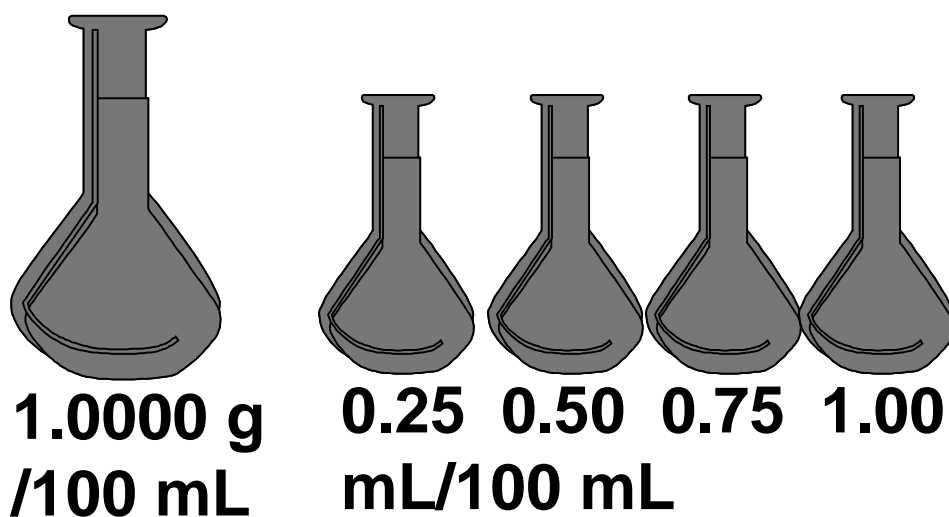
- Deve estar dentro da parte linear da curva de resposta
- Padrão: usar CHO de alta e conhecida pureza
- Pesagem e transferência do padrão para os tubos de teste extremamente importantes
- Agitar frascos para dissolver
- Frascos devem estar entre $1/3$ e $1/2$ cheios
- Avaliar R^2 da linha



Curva Padrão



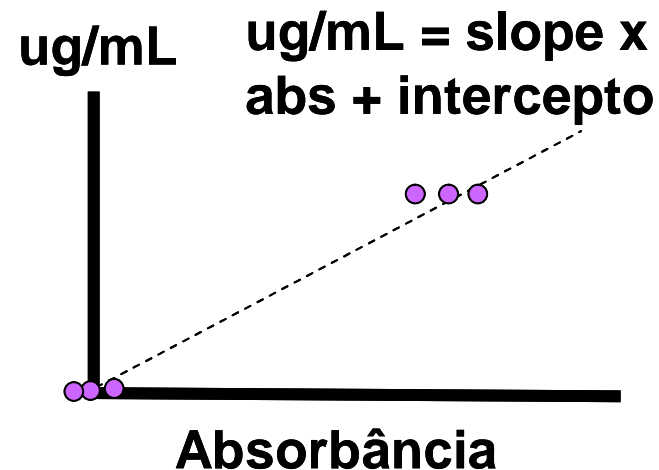
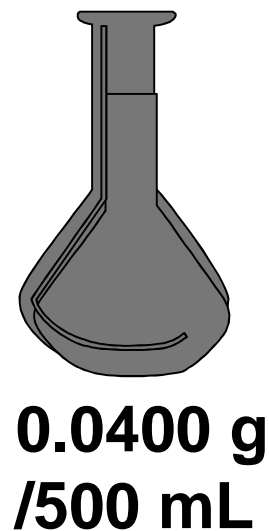
- 1 solução concentrada (estoque) a ser diluída em 5 pontos da curva



Assume que solução estoque foi preparada adequadamente, exige pipetagem acurada

Curva Padrão

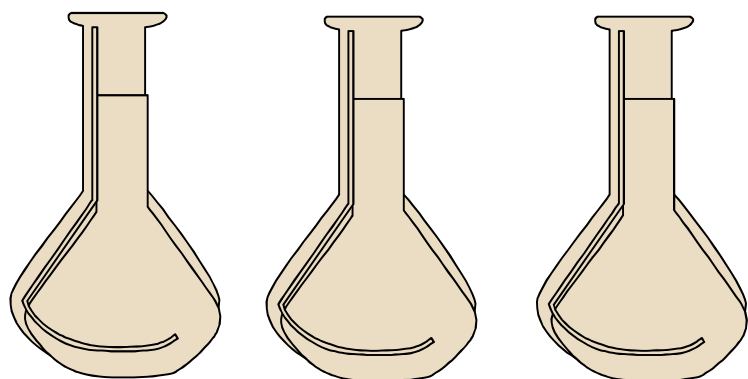
- 1 solução concentrada (estoque)
- Ler solução estoque e 0 mg/dL 3 x



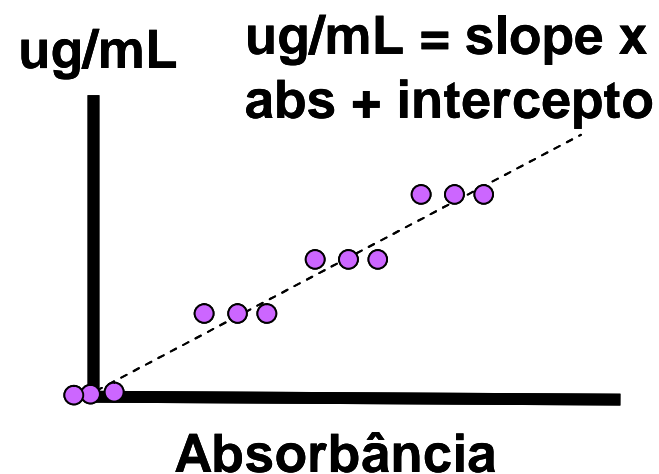
Assume que solução estoque foi preparada adequadamente

Curva Padrão

- 3 soluções estoque + 0 ug/mL
- Ler solução estoque e 0 ug/dL 3 x



0,0200 g /500 mL 0,0300 g /500 mL 0,0400 g /500 mL

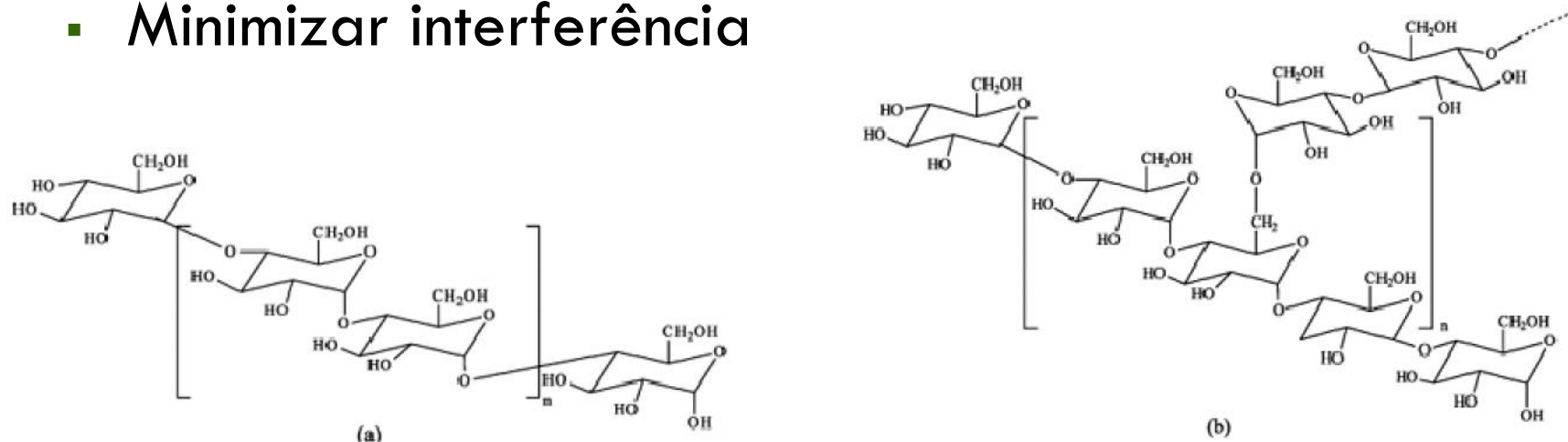


Três soluções independentes para determinar curva padrão

Análise de amido



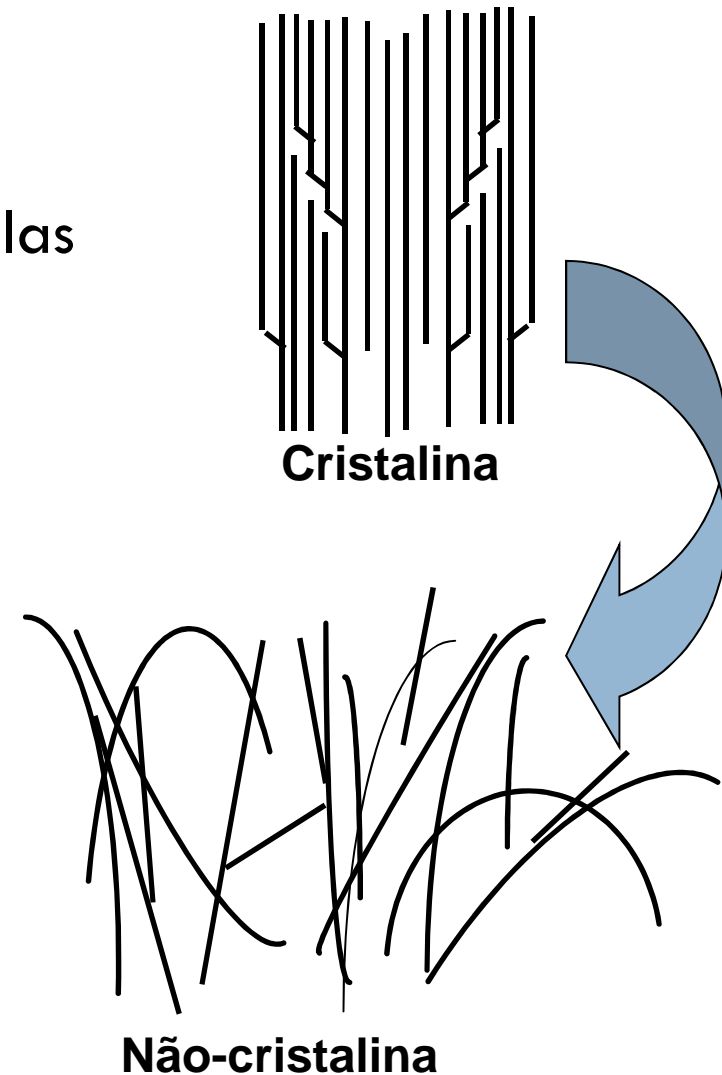
- Geleificação completa do amido
- Enzimas específicas para α -glucana
- Hidrólise completa do amido a glicose
- Protocolos específicos para determinar glicose liberada
- Minimizar interferência



Geleificação



- Rompe a cristalinidade do amido
- Permite acesso de enzimas as moléculas de amido para realizar hidrólise
- Conseguída com calor e umidade, tampão alcali
- Amido puro:
 - controle de qualidade: eficácia da gelatinização, enzimas e protocolo

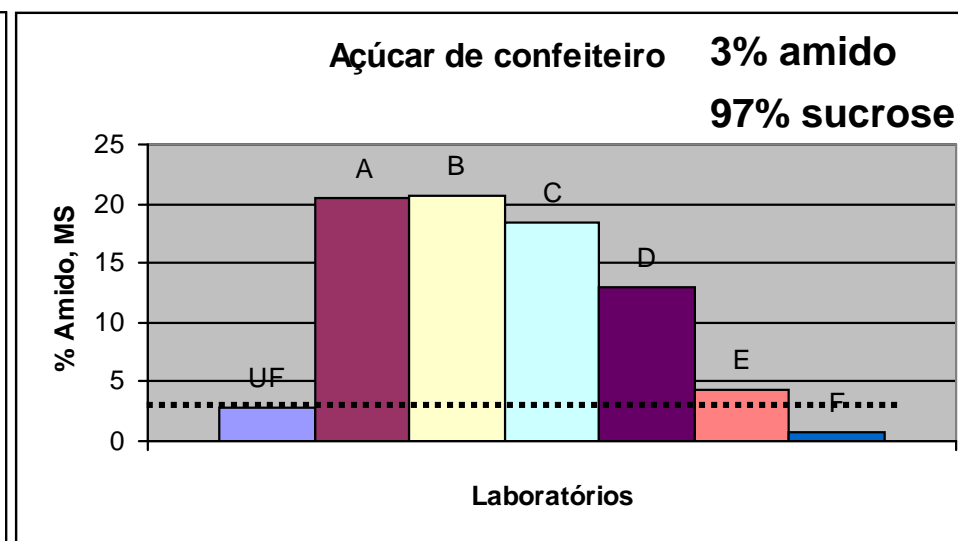
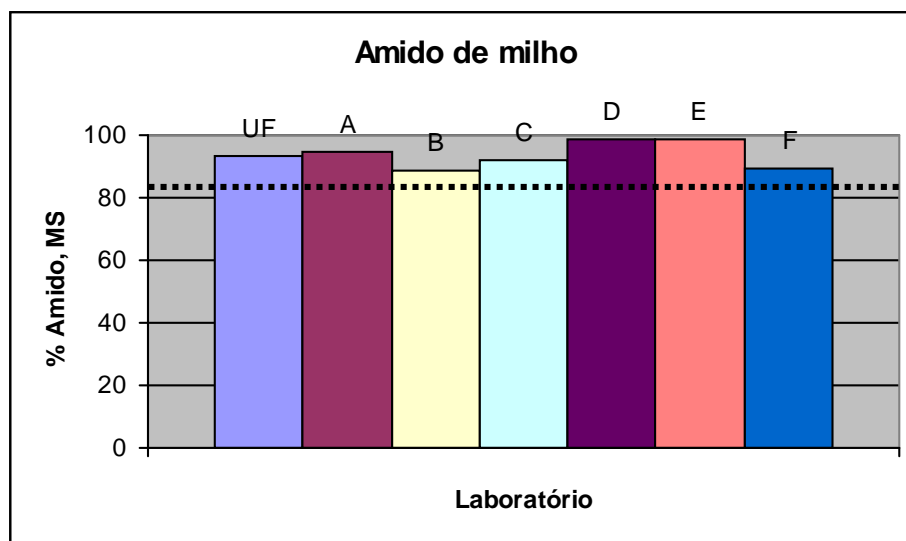




Amido: Análise enzimática

- Repetibilidade: $\pm 2\%$
- Fontes de erro:
 - Fonte de glicose: pureza
 - Atividade de enzima não-amilase
 - Glicose na enzima
 - Geleificação inadequada
 - Hidrólise incompleta: Condições da rodada?
 - Detecção de produtos finais que não sejam glicose
 - Desaparecimento de produto final
 - Moagem inadequada
 - Acurácia de pesagem e pipetagem
 - Curva padrão

Análise de amido: interferências



Sucrose pode ser hidrolisada por enzimas ou por meio ácido, liberando glicose.

Considerando a glicose livre



- Glicose livre em amostras será considerada como amido
- Medir glicose livre em amostras: Subtrair do valor medido no protocolo de amido
- Pre-extrair amostras com etanol 80%



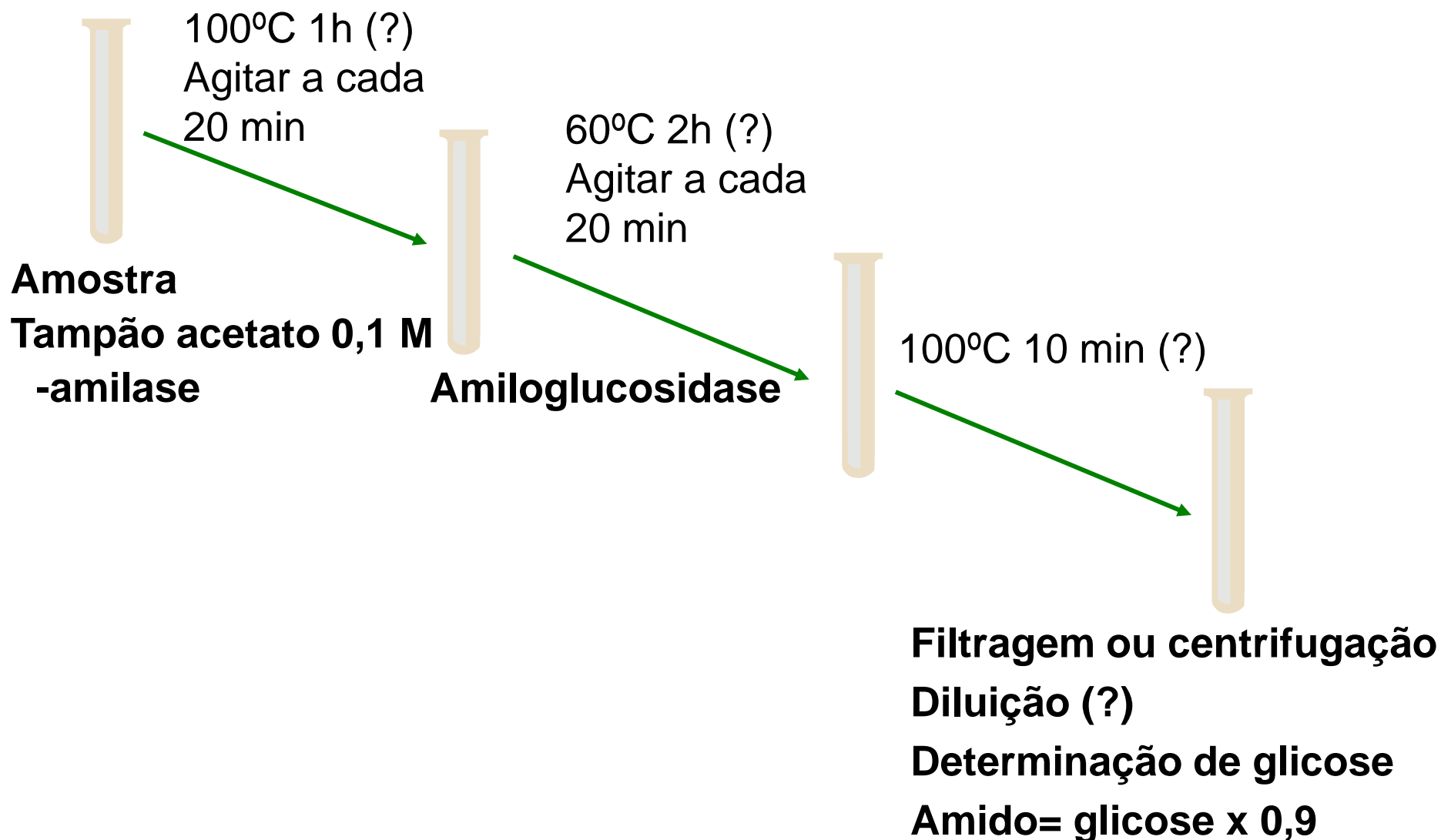
Recuperação do amido: amido puro

- $= \text{amido medido (g)} / \text{amido esperado (g)}$
- Baixa recuperação: $< 100\%$
 - Hidrólise reduzida, detecção de glicose, perda de amostra (pesagem, condução, microbiana), problemas com a curva padrão
- Alta recuperação: $> 100\%$
 - Problemas com pipetagem, pesagem, curva padrão

Não ajustar amido de amostras de acordo com a recuperação do amido puro.

Que valores de recuperações são aceitáveis?

Amido: Bach Knudsen, 1997



Pesagem das amostras

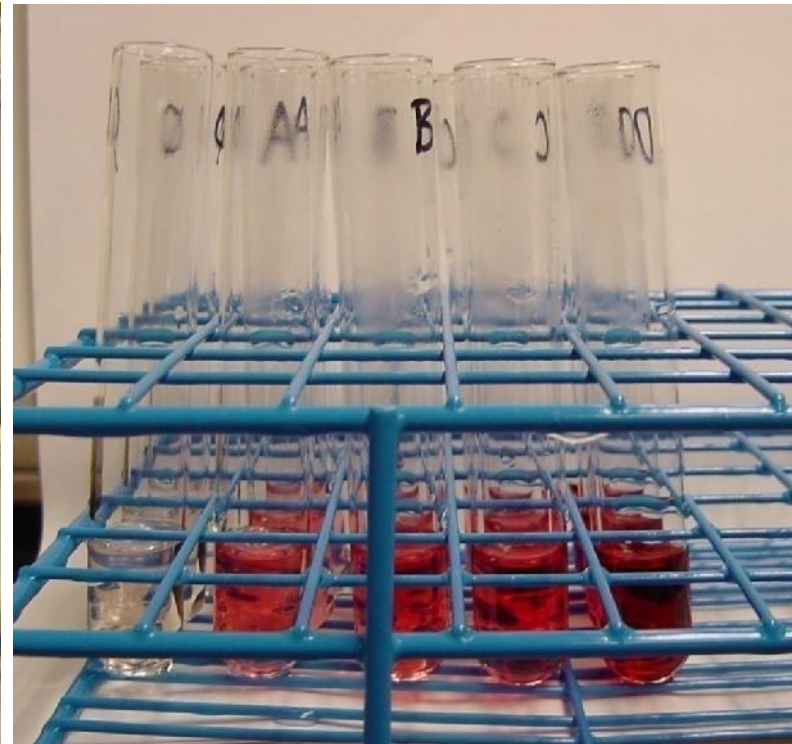


Tubos de 50 mL
com tampa de
rosca PFTE

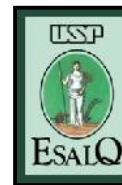
Glicose Oxidase-Peroxidase



Tubos com solução de amostra e reagente GOP



Desenvolvimento da cor terminado



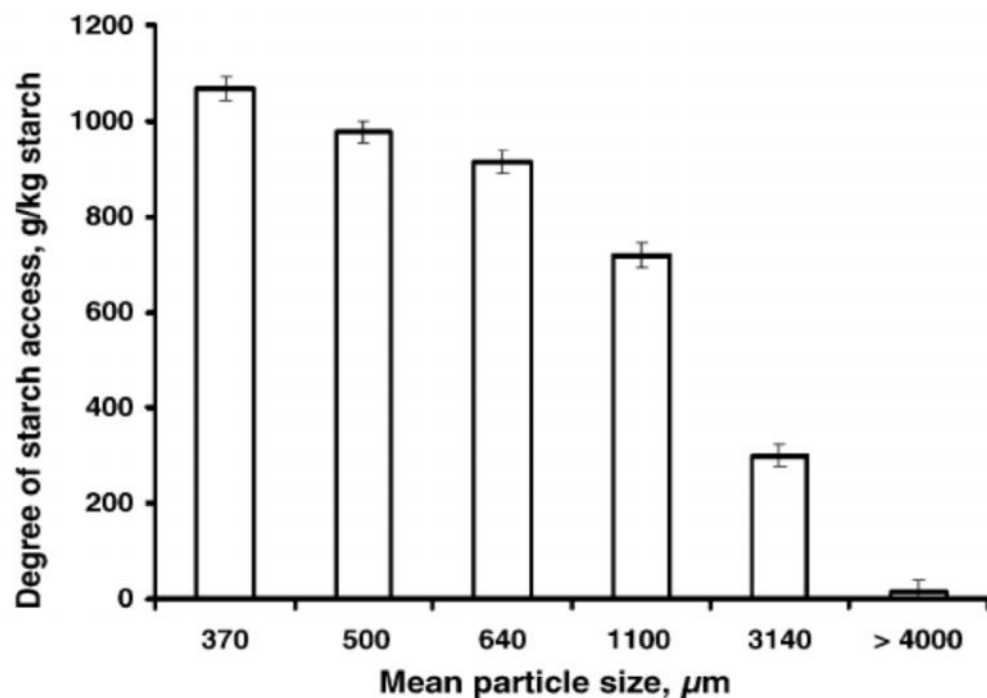
Determinação de Amido: recomendações

- Realizar hidrólise com amilase em pH 5,0
- Desenvolver o protocolo completo do começo ao fim
- Avaliar sucrose e outras possíveis interferências
- Incluir branco, glicose e amido como amostras controle em cada rodada
- Usar glicose como padrão no protocolo
- Remover / considerar substâncias interferentes
- Usar análise de determinação específico para glicose
- Considerar glicose livre
- Não ajustar para recuperação

Digestibilidade do Amido



- Digestibilidade/degradabilidade do amido
 - Métodos enzimáticos e de fermentação
- Medidas afetadas por tamanho de partícula



Cada aumento de 100 µm no tamanho de partícula reduz o “grau de acesso ao amido” em 26,8 g/kg amido.

Blasel et al., 2005.

Consumido \neq Digerido



Silagem de milho mal procesada: grãos presentes nas fezes secas e lavadas



Milho moído grosso em fezes frescas

Henry, 1911

Teste de amido: Partículas nas fezes



Se houver desenvolvimento de cor azul/preta com adição de iodo, o amido está presente.

M. B. Hall, USDFRC, USDA-ARS, 2007

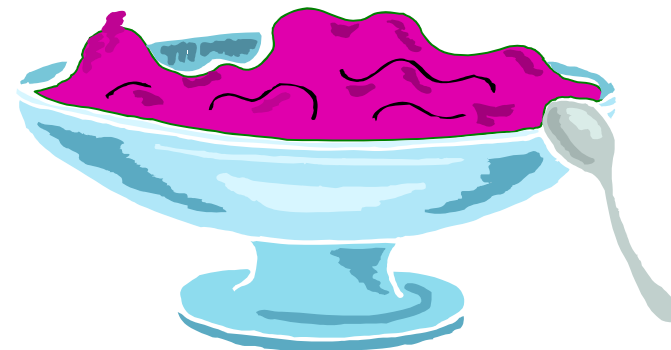
Fibra dietética

Polissacarídeos não-amiláceos, carboidratos não digeridos por enzimas mamíferas.

Fibra insolúvel
Celulose
Hemicelulose



Fibra solúvel
Pectinas
 β -Glucanas
Fructanas
Gomas
Oligosaccharides*



Análise de fibra: empírico



- Fibra bruta
- Solúvel / Insolúvel / Fibra Total
- Fibra em detergente neutro
- Fibra em detergente ácido
- Fibra solúvel em detergente neutro
- Análise de monomeros



Fibra dietética

- Extração da gordura (se necessário)
- Gelatinização com adição de α -amilase termo-estável
- Digestão com protease e amiloglucosidase
- Fibra solúvel precipitada com etanol
- Mensuração gravimétrica do resíduo orgânico
- Ajuste para conteúdo em proteína como $N \times 6,25$

Fibra dietética total = FD solúvel + FD Insolúvel

Fibra Solúvel

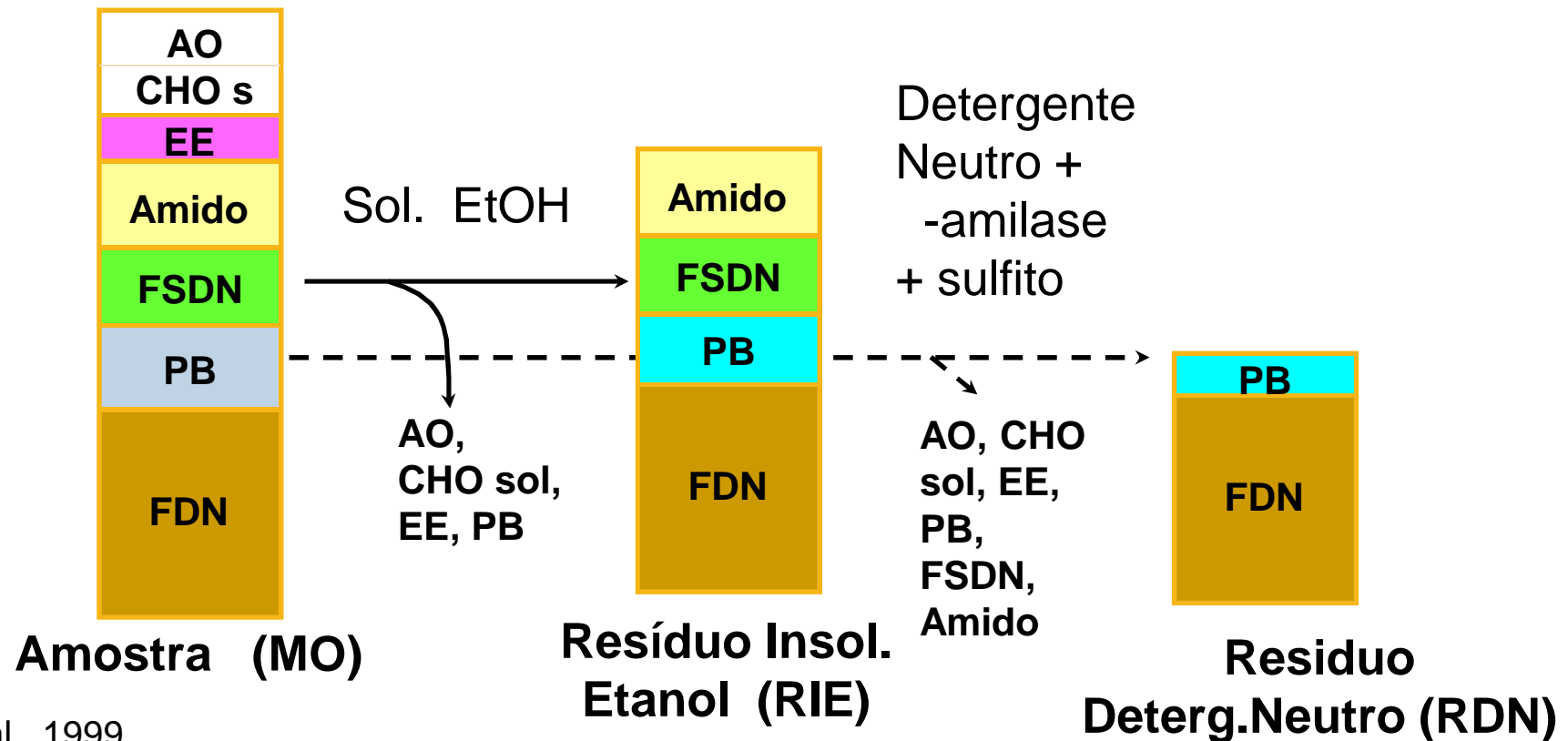


- Fração com composição diversa de protocolos empíricos
- Solubilizada em tampão fosfato
- Analisada gravimetricamente por precipitação em etanol (Prosky et al., 1988)
- Analisada pela diferença entre EtOH 80% e Resíduos extraídos de detergente neutro (Hall et al., 1999)
- Cada protocolo tem erros potenciais

Fibra solúvel em detergente neutro



- Extração de gordura (se necessário)
- Determinar amido e proteína bruta
- Calcular fibra solúvel por diferença



Estimativa de FSDN por diferença



$$\text{FSDN} = (\text{RIEMO} - \text{RIEPB}) - (\text{RDNMO} - \text{RDNPB}) - \text{amido}$$

- Vários protocolos: individuais simples e de alta repetibilidade
- $\text{PB} = \text{N} \times 6,25?$
- Pool de erros potenciais
- Relativamente barato
- Não certificado AOAC

Fracionamento de carboidratos

