

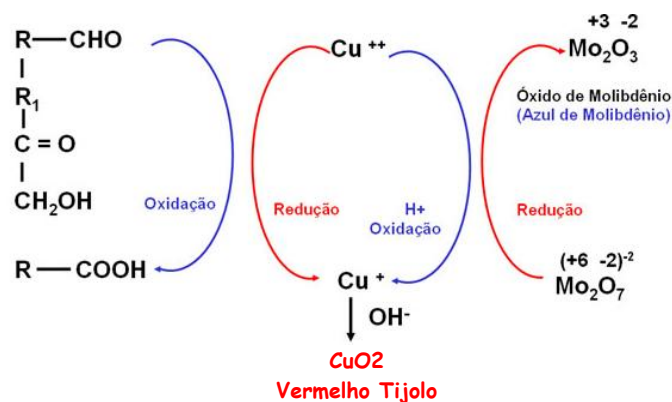
AULA PRÁTICA Nº - 08
05 / Maio / 2016
Profª Solange Brazaca

DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

FUNDAMENTO:

Este método baseia-se na propriedade que alguns açúcares apresentam em reduzir o Cu^{+2} (Íon Cúprico) em Cu^{+1} (Íon Cuproso) e também na reação de Molibdatos, sob certas condições, com arseniatos, silicatos, entre outros, para formar complexos heteropolares que após redução controlada fornece o composto "azul de molibdênio" que poderá ser mensurado colorimetricamente em espectrofotômetros.

Os açúcares redutores da amostra em questão, aquecidos em meio alcalino, transformam-se em Enodióis que reduzem o Íon Cúprico presente no reativo de Somogyi, a Íon Cuproso. O Óxido Cuproso (Cu_2O), assim formado, reduz o composto Arsênio-Molibídico para Óxido de Molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes na amostra.



ESCOPO:

Somogyi&Nelson é um método amplamente empregado para quantificação do teor de açúcares redutores em diversas amostras fornecendo resultados confiáveis e precisos.



EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:

- ◆ Balança Analítica
- ◆ Banho-maria de 50° C e 100°C
- ◆ Espectrofotômetro
- ◆ Estufa de circulação a 50°C e 105°C

VIDRARIAS UTILIZADOS:

- ◆ Balão Volumétrico de 100, 200 e 500 mL
- ◆ Becker de 200 e 250 mL
- ◆ Funil
- ◆ Pipetas Volumétricas de 1, 2,5 e 10 mL
- ◆ Proveta Graduada de 25 mL
- ◆ Tubos de Ensaio de 25 mL

SOLUÇÕES UTILIZADAS:

- ◆ Reagente de Somogyi
- ◆ Reagente de Néelson
- ◆ Solução de Glicose
- ◆ Solução de ácido Clorídrico 6,34N
- ◆ Solução de hidróxido de Sódio 20%
- ◆ Papel de Filtro
- ◆ Papel de Tornassol

I PROCEDIMENTO:

PREPARO DA AMOSTRA E HIDRÓLISE:

- ◆ Pesar, em balança analítica 0,5g a 0,6g de amostra em bécher de 200mL;
- ◆ Adicionar 20mL de água destilada e 20mL de solução de ácido clorídrico 6,34N;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Levar aquecer em banho-maria à 60 - 65°C por tempo suficiente para conversão dos carboidratos em açúcares redutores;
- ◆ Decorrido este tempo, resfriar o becker, em água corrente, até atingir a



temperatura ambiente;

- ◆ Neutralizar a solução obtida com uma solução de hidróxido de Sódio 20% com o auxílio do papel de Tornassol (Rosa para Azul);
- ◆ Transferir quantitativamente a solução obtida acima para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade;
- ◆ Completar o volume do balão com água destilada e homogeneizar bem;
- ◆ Filtrar, e fazer diluições, se necessário;
- ◆ Realizar a determinação dos Açúcares Redutores Totais pela Técnica de Somogyi & Nelson.

II PROCEDIMENTO:

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS:

- ◆ Em tubo de ensaio, transferir com pipeta volumétrica 1 mL da amostra a ser analisada;
- ◆ Adicionar a cada tubo com o auxílio de uma pipeta 1 mL do reagente de Somogyi;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Colocar os tubos em banho-maria em ebulição por 10 minutos;
- ◆ Após este tempo, resfriar os tubos em água corrente até temperatura ambiente;
- ◆ Adicionar a cada tubo com o auxílio de pipeta volumétrica 1 mL do Reagente de Nelson;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ **Completar o volume dos tubos para 12,5 mL adicionando a cada tubo 9,5 mL de água destilada;**
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Realizar a leitura das amostras em Espectrofotômetro em $\lambda = 535\text{nm}$.

CÁLCULO:

- ◆ Fazer o cálculo considerando a equação da reta.
- ◆ Considerar as diluições, caso tenha sido necessário.



RESÍDUOS:

O resíduo desta análise deverá ser estocado em bombona apropriada e identificada de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 003 e armazenada no entreposto do LAN para posterior encaminhamento para incineração de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 004.

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DO RESÍDUO: R 034 - Reativo de Somogyi & Néelson.

BIBLIOGRAFIA:

BACILA, M. **Curso de fisiologia de microrganismo**. Curitiba: Instituto de Bioquímica/UFPr. 1960. 209p.

FALCONE, M. & MARQUES, A. B.; Estudo sobre as condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**. São Paulo: 1965. v.4, p.24 - 29.



OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE AÇÚCARES REDUTORES PELA TÉCNICA DE SOMOGYI&NÉLSON

FUNDAMENTO:

Através de uma série de diluições de uma solução padrão de concentração conhecida, é possível estabelecer uma curva de calibração para métodos colorimétricos, que relacione a concentração de açúcares redutores com valores de Absorbância.

Como a concentração de açúcares redutores é expressa em termos de concentração de Glicose, parte-se de uma solução padrão de Glicose, realizando-se uma série de diluições, de forma a produzir novas soluções cujos valores de suas concentrações estejam compreendidos em uma faixa previamente determinada.

A determinação da faixa de concentração na qual o método aplica-se é feita segundo dois critérios:

1 - Deve existir uma correlação linear entre a concentração e o logaritmo da transmitância, e;

2 - Os valores das transmitâncias obtidas devem estar situados na região de maior sensibilidade do Espectrofotômetro utilizado.

OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO:

Apartir da concentração da solução padrão a 1mg/mL de glicose, realizar as diluições com conjuntos de pipetas e balões volumétricos adequados, segundo a Tabela I.

0,5g de Glicose anidra _____ 250mL H₂O destilada

↓

10 mL da solução Glicose _____ 100 mL H₂O destilada

↓

Obtenção da Curva Padrão



TABELA I - Construção da Curva de Calibração

TUBO Nº	mLda Solução Padrão	mL Água Destilada	Concentração de Glicose ($\mu\text{g/mL}$)
Branco	0,0	1,00	0
1	0,10	0,90	20
2	0,20	0,80	40
3	0,30	0,70	60
4	0,40	0,60	80
5	0,50	0,50	100

PROCEDIMENTO:

- ◆ Em tubo de ensaio, transferir os volumes da solução padrão e de água destilada indicados na tabela I;
- ◆ Adicionar a cada tubo 1 ml do Reagente de Somogyi;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Colocar os tubos em banho-maria em ebulição por 10 minutos;
- ◆ Após este tempo, resfriar os tubos em água corrente até temperatura ambiente;
- ◆ Adicionar a cada tubo com o auxílio de pipeta volumétrica 1 mL do Reagente de Néelson;
- ◆ Homogeneizar bem
- ◆ **Completar o volume dos tubos para 12,5 mL adicionando a cada tubo 9,5mL de água destilada;**
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Realizar a leitura das amostras em Espectrofotômetro em $\lambda = 535\text{nm}$.

RESÍDUOS:

O resíduo desta análise deverá ser estocado em bombona apropriada e identificada de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 003 e armazenada no entreposto do LAN para posterior encaminhamento para incineração de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 004.

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DO RESÍDUO: R 034 - Reativo de Somogyi & Néelson.



PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE AÇÚCARES REDUTORES PELA TÉCNICA DE SOMOGYI & NÉLSON

REAGENTE DE SOMOGYI - CUPRO-ALCALINO

Composição Química:

- ◆ Fosfato Dibásico de Sódio Anidro - Na_2HPO_4 - CAS [7558-79-4]
 - ◆ Tartarato Duplo de Sódio e Potássio - $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - CAS [6381-59-5]
 - ◆ Hidróxido de Sódio - NaOH - CAS [1310-72-2]
 - ◆ Sulfato de Cobre Pentahidratado - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - CAS [7758-99-8]
 - ◆ Sulfato de Sódio Anidro - Na_2SO_4 - CAS [7757-82-6]
 - ◆ Água Destilada
-
- ◆ Pesar, em balança analítica, 14g de fosfato dibásico de Sódio anidro;
 - ◆ Pesar, em balança analítica, 20g de tartarato duplo de Sódio e Potássio, e;
 - ◆ Transferir, quantitativamente os dois reagentes para um becker de 1000 mL de capacidade, e dissolver em cerca de 200 ml de água destilada;
 - ◆ Adicionar à solução do becker, 50 mL de uma solução de hidróxido de Sódio Normal;
 - ◆ Adicionar, sob agitação constante, 40 mL de uma solução de Sulfato de Cobre 10%;
 - ◆ Pesar, em balança analítica, 90g de sulfato de Sódio anidro e, transferir quantitativamente para o becker já contendo as outras soluções;
 - ◆ Solubilizar bem;
 - ◆ Transferir, quantitativamente a solução do becker para um balão volumétrico de 500 mL de capacidade, lavando o becker com pequena porção de água destilada;
 - ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
 - ◆ Homogeneizar bem;
 - ◆ Deixar em repouso por 48 horas ao abrigo do vento;
 - ◆ Após este período, filtrar a solução em papel de filtro;
 - ◆ Armazenar esta solução em frasco escuro, com tampa rosqueável.



Solução de Hidróxido de Sódio 1N

Composição Química:

- ◆ Hidróxido de Sódio -NaOH - CAS [1310-73-2]
- ◆ Água Destilada

- ◆ Pesar, em balança analítica, 4g de hidróxido de Sódio, em becker de 200 mL de capacidade;
- ◆ Levar o becker para banho e água fria, em capela;
- ◆ Adicionar lenta e cuidadosamente, 50 mL de água destilada recentemente fervida e resfriada;
- ◆ Solubilizar bem;
- ◆ Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL de capacidade, lavando o becker com pequena porção de água destilada;
- ◆ Deixar esfriar;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem.

Solução de Sulfato de Cobre a 10%

Composição Química:

- ◆ Sulfato de Cobrepentahidratado - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - CAS [7758-99-8]
- ◆ Água Destilada

- ◆ Pesar, em balança analítica, 10g de Sulfato de Cobre;
- ◆ Transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar cerca de 50 mL de água destilada, e;
- ◆ Solubilizar bem;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem.



REAGENTE DE NÉLSON - ARSENO MOLIBDATO

Composição Química:

- ◆ Molibdato de Amônio 4-Hidrato - $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - CAS [12054-85-2]
 - ◆ Ácido Sulfúrico concentrado - H_2SO_4 - CAS [7664-93-9]
 - ◆ Arseniato de Sódio 7-Hidrato - $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - CAS [10048-95-0]
 - ◆ Água Destilada
-
- ◆ Pesar, em balança analítica, 25g de Molibdato de Amônio;
 - ◆ Transferir para um becker de 1000 mL de capacidade, e dissolver em **exatamente** 450 mL de água destilada;
 - ◆ Adicionar à solução, sob constante agitação, 21 mL de ácido Sulfúrico concentrado, com o auxílio de uma bureta;
 - ◆ Pesar, em balança analítica, 3g de Arseniato de Sódio;
 - ◆ Transferir para um becker, e dissolver em **exatamente** 25 mL de água destilada;
 - ◆ Transferir a solução obtida para o mesmo becker;
 - ◆ Homogeneizar bem;
 - ◆ Incubar esta solução em estufa a 37°C pôr 48 horas;
 - ◆ Após este período, filtrar a solução em papel de filtro;
 - ◆ Armazenar esta solução em frasco escuro, com tampa rosqueável.

Observação:

Esta solução não se completa volume, pôr esta razão, os volumes indicados de água destilada devem ser o mais **exato** possível.



SOLUÇÃO PADRÃO DE GLICOSE - 200µg/mL

Composição Química:

- ◆ Glicose p.a. Anidra - $C_6H_{12}O_6$ - CAS [50-99-7]
- ◆ Água Destilada

- ◆ Pesar, em balança analítica 0,5g de Glicose p.a. Anidra;
- ◆ Transferir, quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar cerca de 50 mL de água destilada, e;
- ◆ Solubilizar bem;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Transferir, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da solução obtida acima para balão volumétrico de 100 mL de capacidade;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Usar esta solução para a obtenção da Curva de Calibração para Determinação Colorimétrica de Açúcares Redutores pela Técnica de Somogyi&Nelson, segundo a Tabela I.

Observação:

Esta solução deverá ser preparada momentos antes do uso

SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 6,34 N

Composição Química

- ◆ Ácido Clorídrico - HCl - CAS 7647-01-0
- ◆ Água Destilada

- ◆ Transferir cuidadosamente em capela e com o auxílio de uma proveta, 530mL de ácido Clorídrico p.a. (pureza 37%) para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, já contendo cerca de 200 mL de água destilada;



- ◆ Agitar vagarosamente com movimentos rotatórios;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco ambar.

SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 20%

Composição Química

- ◆ Hidróxido de Sódio - NaOH - CAS 1310-73-2
- ◆ Água Destilada

- ◆ Pesar, em balança digital o mais rápido possível, 200g de hidróxido de Sódio em lentilhas, em becker de 1000 mL de capacidade;
- ◆ Dissolver com cerca de 300 mL de água destilada agitando com um bastonete de vidro e mantendo o becker em banho de água fria;
- ◆ Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, lavando o becker com pequenas porções de água destilada;
- ◆ Elevar o volume até próximo à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Deixar em repouso até esfriar;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco de polietileno.



TABELA DE RESULTADOS:

CURVA PADRÃO:

PONTOS DA CURVA	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE ($\mu\text{g/mL}$)	LEITURA 1 $\lambda = 535\text{nm}$	LEITURA 2 $\lambda = 535\text{nm}$	LEITURA 3 $\lambda = 535\text{nm}$
Branco	0			
1	20			
2	40			
3	60			
4	80			
5	100			

AMOSTRA:

AMOSTRA	LEITURA 1 $\lambda = 535\text{nm}$	LEITURA 2 $\lambda = 535\text{nm}$	LEITURA 3 $\lambda = 535\text{nm}$	MÉDIA LEITURA ABSORBÂNCIA $\lambda = 535\text{nm}$