

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR
ENTALPIMETRIA DE INJEÇÃO DIRETA

Arnaldo Antonio Rodella

Impl. 15.10.92

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR
ENTALPIMETRIA DE INJEÇÃO DIRETA

ARNALDO ANTONIO RODELLA *AR*
Engenheiro Agrônomo

DR. WALACE ALVES DE OLIVEIRA *WA*
-Orientador-

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de Mestre em Química Análítica.

CAMPINAS
Junho, 1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais.

DEDICO

A G R A D E Ç O

- Ao professor *Dr. Wallace Alves de Oliveira* pelo apoio, confiança e orientação dispensada na realização deste trabalho

- Ao PLANALSUCAR (*Programa Nacional de Melhoramento da Cana de-Açúcar*), nas pessoas do *Dr. José Alberto Gentil Costa e Sousa* e do eng^o agr^o *Alonso Keese Dodson*, pela oportunidade.

- Ao professor *Dr. Nadir Almeida da Glória*, atual Superintendente Geral do PLANALSUCAR, pelo incentivo ao meu curso de pós-graduação em Química Analítica e pelo apoio desde os tempos de minha iniciação científica.

- A UNICAMP (*Universidade Estadual de Campinas*), nas pessoas de seus diretores, professores e funcionários, pelas facilidades concedidas. Aos colegas do curso de pós-graduação, pelo convívio diário.

- A srta. *Aparecida Rita Brambilla*, da Coordenadoria Regional Sul do PLANALSUCAR, pelo trabalho datilográfico.

- Aqueles que no *Centro de Análises da Coordenadoria Regional Sul do PLANALSUCAR* se desdobraram em sua dedicação, - permitindo que me dedicasse exclusivamente ao curso de pós-graduação e na realização do presente trabalho.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais e importância dos açúcares...	02
1.2. Métodos de determinação quantitativa de monosacarídeos.....	05
1.2.1. Métodos baseados na oxidação pelo íon cúprico.....	08
1.2.2. Métodos baseados na oxidação pelo íon periodato.....	09
1.3. A reação do íon periodato com carboidratos...	10
1.3.1. Efeito das condições experimentais....	12
1.3.2. Mecanismo da reação de oxidação pelo periodato.....	13
1.4. Métodos entalpimétricos de análise.....	17
1.4.1. Princípios fundamentais.....	17
1.4.2. Termistores e o circuito de medida de variação de temperatura.....	18
1.4.3. Fatores que afetam as análises entalpimétricas.....	21
1.5. Métodos empregados na determinação de açúcares em produtos do processamento industrial - da cana-de-açúcar.....	25
1.6. Objetivos do trabalho.....	30
2. PARTE EXPERIMENTAL	31
2.1. Instrumentação.....	31
2.1.1. Sistema de análise entalpimétrica.....	32
2.1.2. Sistema calorimétrico LKB - 8700	33
2.2. Reagentes.....	35

3. ESTUDO ENTALPIMÉTRICO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE PELO ION PERIODATO EM DIVERSOS VALORES DE pH.....	37
3.1. Aspectos teóricos.....	38
3.2. Procedimento.....	41
3.3. Resultados obtidos.....	42
4. DETERMINAÇÃO ENTALPIMÉTRICA DE MONOSSACARÍDEOS....	51
4.1. Efeito da diferença de temperatura iniciais - das soluções regentes.....	52
4.2. Efeito da entalpia de diluição.....	54
4.3. Desenvolvimento da marcha analítica para determinação de açúcares isolados.....	56
4.3.1. Obtenção das curvas de calibração.....	56
4.3.2. Resultados obtidos.....	57
4.4. Determinação simultânea de glicose e frutose.	65
4.4.1. Aspectos teóricos.....	65
4.4.2. Procedimento.....	68
4.4.3. Resultados obtidos.....	68
4.5. Discussão.....	70
5. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM PRODUTOS DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	73
5.1. Determinações entalpimétricas.....	74
5.1.1. Curva de calibração.....	74
5.1.2. Análise de açúcares totais em caldo de cana.....	74
5.1.3. Análise do melaço.....	75
5.2. Análise de açúcares totais pelo método volumétrico de Lane-Eynon.....	75
5.3. Resultados obtidos.....	76
5.3.1. Curvas de calibração.....	76
5.3.2. Análise do melaço.....	78

	Página
5.3.3. Análise de caldo de cana.....	79
5.4. Considerações gerais.....	81
6. RESUMO.....	83
7. SUMMARY.....	85
8. LITERATURA CITADA.....	87
9. APÊNDICE.....	93

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA - 1.1.	28
TABELA - 1.2.	29
TABELA - 3.1.	43
TABELA - 3.2.	44
TABELA - 4.1.	59
TABELA - 4.2.	59
TABELA - 4.3.	69
TABELA - 4.4.	70
TABELA - 5.1.	78
TABELA - 5.2.	79
TABELA - 5.3.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA - 2.1.	32
FIGURA - 2.2.	34
FIGURA - 3.1.	45
FIGURA - 3.2.	46
FIGURA - 3.3.	47
FIGURA - 3.4.	48
FIGURA - 3.5.	49
FIGURA - 3.6.	50
FIGURA - 4.1.	53
FIGURA - 4.2.	55
FIGURA - 4.3.	58
FIGURA - 4.4.	60
FIGURA - 4.5.	61
FIGURA - 4.6.	62
FIGURA - 4.7.	63
FIGURA - 4.8.	64
FIGURA - 5.1.	77
FIGURA - 5.2.	80

1. INTRODUÇÃO

A avaliação e resolução de muitos problemas técnicos e científicos dependem frequentemente dos meios disponíveis para se identificar e medir. Em Ciência, mesmo hipóteses complexas e elaboradas aguardam pelo momento de serem comprovadas através de uma medida experimental.

Em vários ramos da ciência e também em processos industriais, para se recomendar, controlar e resolver é indispensável, em geral, dispor de dados e informações que podem ser obtidos através de métodos analíticos, empregando desde a comparação visual de soluções coloridas até a espectrometria de massa.

O tema do presente trabalho é a determinação -

quantitativa de açúcares, aplicando uma técnica analítica raramente utilizada para essa finalidade. Nesta primeira parte são apresentados aspectos gerais, conceitos e informações básicas, objetivando dar uma visão abrangente do assunto, destacando sua importância em vários itens que abordam: a substância a se determinar, os principais métodos analíticos existentes, a reação química escolhida e detalhes da técnica analítica e instrumentação propostas.

1.1. Aspectos gerais e importância dos açúcares

Os açúcares são biologicamente muito importantes e considerados dentre os compostos orgânicos mais antigos conhecidos pelo homem. Apresentam-se como substâncias de sabor doce, cristalinas e solúveis em água. A massa molar é conhecida exatamente e é invariável para uma dada substância. Essa última característica os diferencia dos polissacarídeos - que são polímeros naturais, também de extraordinária importância para o ser humano.

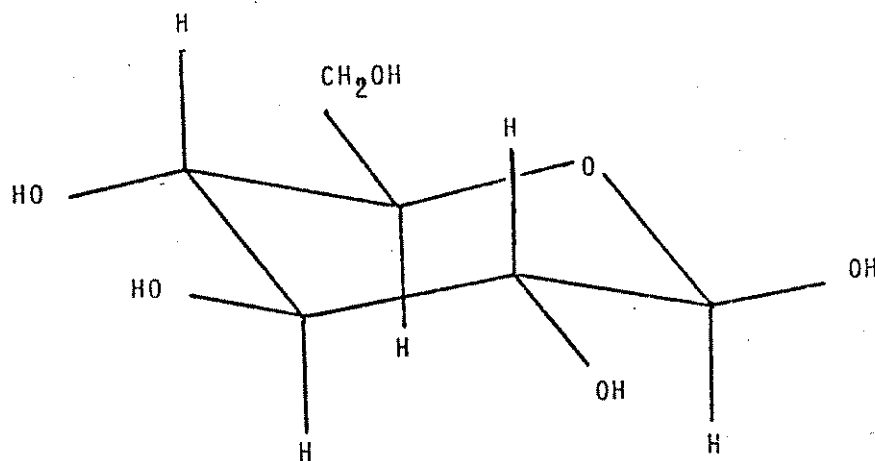
Açúcares e polissacarídeos são genericamente denominados hidratos de carbono ou carboidratos (1). Estas designações basearam-se na hipótese de que os átomos de carbono nessas substâncias se encontravam ligados a um igual número de moléculas de água. Essa relação, entretanto, ocorre em outros compostos que pouco ou nada têm a ver com os carboidratos como o aldeído fórmico e o ácido acético.

Atualmente o termo hidrato de carbono ou carboidrato é usado para designar aldeídos ou cetonas poli-hidroxi-lados ou compostos que por hidrólise podem ser transformados nestes (2).

Por monossacarídeos denominam-se os açúcares - que não produzem outros mais simples por hidrólise; quimicamente são aldeídos ou cetonas poli-hidroxi-lados com pelo menos - três átomos de carbono em cadeia alifática. Os carboidratos que se hidrolisam em duas moléculas de monossacarídeo são chamados de dissacarídeos, dentre os quais o mais importante é a sacarose (3).

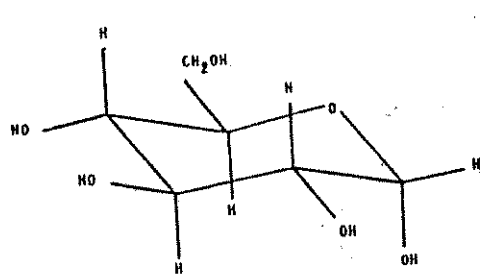
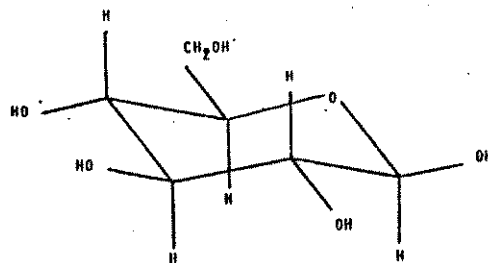
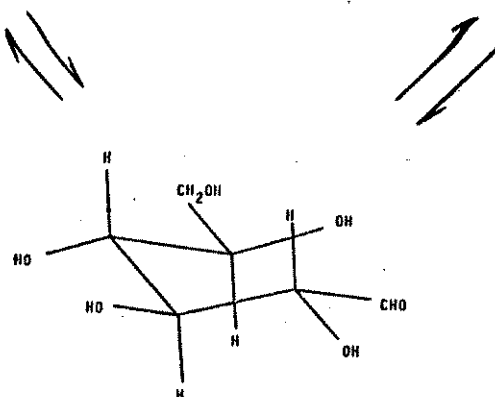
Os monossacarídeos são classificados como trioses, tetroses, pentoses, hexoses e assim por diante, conforme o número de átomos de carbono em suas moléculas. Acrescenta-se ainda o prefixo aldo ou ceto para indicar a presença de um grupamento aldeídico ou cetônico. A maior parte dos monossacarídeos existentes na natureza são pentoses e hexoses.

O monossacarídeo típico é a glicose-D (+). É o mais abundante, constituindo a unidade estrutural de produtos como amido, celulose e glicogênio. Essa abundância pode ser provalvemente explicada analisando-se a estrutura de sua molécula (4). De todas as aldo-hexoses-D, o anômero beta - da glicose-D (+) é o único que apresenta uma conformação on de todos os grupos volumosos se posicionam equatorialmente, o que confere maior estabilidade à sua molécula devido a fatores estéricos. Essa conformação é :



A medida que se esclarecia a configuração dos isômeros das aldo-hexoses no século passado, com base nos estudos efetuados com a glicose, acumulavam-se evidências de que algumas propriedades químicas dos açúcares não poderiam ser totalmente explicadas, atribuindo-lhes uma estrutura linear. O fenômeno da mutarrotação foi um dos fatores que levaram à caracterização da estrutura cíclica da glicose e demais monosacarídeos (5).

A mutarrotação consiste em um equilíbrio entre duas formas isômeras cíclicas denominadas anômeros alfa e beta, passando através de uma forma em cadeia aberta. No caso da glicose tem-se:

anômero α anômero β 

Forma de cadeia aberta

A forma acíclica explicaria as reações típicas dos aldeídos apresentadas pela glicose-D (+), como a redução dos reagentes de Tollens e de Fehling. Estes últimos consumiriam o açúcar na forma acíclica numa reação irreversível, a qual seria rapidamente reposta através dos equilíbrios mostrados anteriormente.

Os açúcares oxidáveis pelos reagentes de Tollens e de Fehling são denominados de "açúcares redutores". Todos os monossacarídeos são açúcares redutores (3), bem como a maioria dos dissacarídeos; a sacarose constitui uma exceção entre estes últimos.

A função principal dos monossacarídeos é produzir energia no interior dos organismos vivos por combustão.

Além disso, através de processos enzimáticos, podem ser convertidos em importantes produtos industriais como etanol, butanol, ácido cítrico entre outros. Para tanto, parte-se de matéria-prima em geral mais complexa, cujos carboidratos devem sofrer hidrólise prévia.

A glicose-D (+) se encontra combinada com a frutose-D (-) formando a sacarose (+). A sacarose é obtida industrialmente da cana-de-açúcar ou da beterraba. É o composto orgânico que se obtém em maior quantidade na forma altamente pura. Por hidrólise ácida ou enzimática a sacarose produz quantidades iguais dos monossacarídeos que a constituem. A hidrólise é acompanhada de mudança do sinal de rotação óptica, de um valor positivo para negativo, sendo por isso a reação chamada de inversão da sacarose; à mistura levogira obtida dá-se o nome de açúcares invertidos.

1.2. Métodos de determinação quantitativa de monossacarídeos

Os principais métodos de determinação quantitativa de monossacarídeos envolvem muitas das reações também usadas na identificação qualitativa dos mesmos. São reações baseadas por exemplo no poder redutor do grupo carbonilo, quebra de ligações entre grupos glicólicos vicinais e reações coloridas de produtos de degradação dos açúcares por ácidos minerais fortes. A classificação a seguir reúne os principais métodos e foi retirada de *Staneck e colaboradores* (2).

A- Métodos que se baseiam na oxidação de açúcares por reagentes químicos.

Várias substâncias podem reagir com os açúcares, oxidando-os. Os métodos que utilizam o íon cúprico e o íon periodato serão discutidos mais detalhadamente nos itens 1.2.1 e 1.2.2. São descritos a seguir outros reagentes e as características principais dos métodos neles baseados.

Os halogênios oxidam os açúcares em meio alcalino. Sob condições especiais as aldoses podem ser quantitativa-

vamente oxidadas até ácidos aldônicos (6). Emprega-se em geral o iodo com oxidante, cujo excesso é determinado pelo íon tiossulfato ou por colorimetria (7).

O íon ferricianeto é reduzido pelos monossacarídeos a íon ferrocianeto, sendo a reação empregada como base de vários métodos analíticos. Utiliza-se tanto a titulação direta da solução de açúcar com a solução de ferricianeto, como a medida colorimétrica de ferrocianeto produzido. Um dos procedimentos mais simples consiste em medir o decréscimo da coloração da solução alcalina do íon ferricianeto, que é amarela, devido à formação de ferrocianeto, que é incolor (8).

A determinação de açúcares com sais de cério pode ser conduzida com o sulfato de cério em meio alcalino e sob ebulição, titulando-se o excesso de íon cério não reduzido com o íon ferroso (9). Por outro lado, pode-se estimar o consumo de perclorato de cério pela titulação com ácido oxálico ou íon arsenito (10).

Diversas reações coloridas são empregadas em métodos colorimétricos de análises de açúcares. Os sais de tetrazólio são convertidos em formazanas insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos (11). Por outro lado, compostos nitro-aromáticos também são usados, tais como ácido pícrico (12), que em meio alcalino e a quente produz coloração vermelha intensa, 2,4-nitrofenol e ácido 3,5 dinitro-salicílico (13).

B- Métodos baseados nas reações coloridas de furfural e seus derivados

A desidratação de açúcares em meio fortemente ácido produz furfural. Os procedimentos analíticos baseados neste princípio utilizam o espectro da região do ultravioleta dos produtos de reação (14), ou determinam os mesmos colorimetricamente (15).

A antrona foi inicialmente utilizada na identificação qualitativa de açúcares e encontrou larga aplicação como base de métodos quantitativos (16). É bastante empregada nas análises de material biológico.

O fenol em solução de ácido sulfúrico produz com os açúcares e compostos similares uma coloração amarelada que é apropriada para determinações colorimétricas. Um dos métodos de análise de carboidratos que utilizam o fenol é bastante usado associado à separação dos mesmos por cromatografia de papel (17). Outros compostos fenólicos também são empregados como o alfa-naftol, resorcinol, timol e orcinol , entre outros.

Outras determinações colorimétricas empregam compostos amino-aromáticos como anilina para aldoses, p-bromo-anilina para pentoses, bezidina e outros. Compostos sulfurados como a cistina e o ácido tioglicólico são recomendados para a determinação de ceto-pentoses na presença da aldo-pentoses.

C- Métodos baseados em reações diversas

A reação de Kiliani consiste na adição de cianeto ao grupo carbonilo dos açúcares e é empregada em métodos analíticos, efetuando-se a hidrólise alcalina das cianidrinias formadas, seguindo-se a titulação da amônia liberada (18).

O boro-hidreto de sódio por sua vez reduz o grupo carbonilo dos açúcares; após a reação, determina-se a fração do reagente que não foi consumida, medindo-se o volume de hidrogênio produzido pela reação de boro-hidreto de sódio com ácido (19).

D- Métodos físico-químicos

Podem basear-se na rotação do plano de luz polarizada, no índice de refração, na viscosidade e na pressão osmótica.

E- Métodos enzimáticos

A característica principal destes métodos é a seletividade. O seu emprego em determinações de glicose tem sido bastante extenso. Além desta, outros açúcares como frutose, sacarose e rafinose podem ser analisados (20-21).

1.2.1. Métodos baseados na oxidação pelo íon cúprico

Esses métodos merecem destaque especial visto serem bastante empregados.

Açúcares contendo grupo aldeídico ou cetônico reduzem, em solução alcalina íons de cobre, prata, bismuto e mercúrio para estados mais baixos de valência ou mesmo até o estado metálico. O íon cúprico é o mais empregado como base de procedimento analítico, utilizando com inúmeras modificações (2).

Os reagentes utilizados nesses métodos baseiam-se na formação de complexos de cobre divalente com sais de ácidos orgânicos, principalmente tartárico e cítrico. O mais conhecido deles é a solução de Fehling, constituída por duas soluções, uma de sulfato de cobre e outra de tartarato duplo de sódio e potássio mais hidróxido de sódio, que são mantidas separadas e misturadas no momento de uso.

A reação do complexo de cobre com o açúcar não é estequiométrica (5) ou seja, a quantidade de óxido cuproso produzida pela redução do complexo de cobre divalente não é diretamente proporcional à quantidade de açúcar presente.

Em geral, métodos não estequiométricos são empíricos e portanto exigem que as condições experimentais permaneçam constantes. No presente caso, para que a reação possa ser empregada num método analítico de determinação de açúcar, vários fatores devem ser severamente controlados, como : tempo de reação, controle de pH, concentração dos reagentes, tipo de açúcar e tipo de complexo empregado (22).

O curso de reação é complexo e as transformações intermediárias sofridas pela molécula de açúcar não são bem compreendidas. Como ocorre degradação da cadeia de átomo de carbono da molécula de açúcar, a presença de grupos substituintes pode afetar o poder redutor do açúcar, quando comparado com um açúcar padrão como a glicose. Sabe-se, por exemplo, que glicose, galactose e manose reduzem diferentes quantidades de íons cúpricos. A frutose e as cetoses em geral são oxida-

das mais rapidamente que as aldoses análogas (2).

A reação é em geral conduzida sob ebulição visando do minimizar os efeitos que a variação de temperatura têm sobre a velocidade de reação e dificultar a re-oxidação do óxido cuproso formado pelo contacto com o oxigênio do ar atmosférico.

Os procedimentos que utilizam a reação em questão são inúmeros. Mais comumente pode-se medir o volume de solução de açúcar, cuja concentração é desconhecida, necessário para reduzir totalmente um determinado volume de solução de complexo de cobre divalente. Determina-se previamente a quantidade de um açúcar padrão como a glicose, necessária para também reduzir o mesmo volume de solução de Fehling usado na análise da amostra. O ponto final da reação pode ser indicado por um composto apropriado como o azul de metileno. Essa é, em linhas gerais, a base do método volumétrico de Lane e Eynon (23), amplamente empregado nas análises da indústria de fabricação de açúcar.

Alternativamente pode-se empregar um excesso de solução de cobre na reação com o açúcar e separar o óxido cuproso formado. O precipitado é então pesado e relacionado à quantidade de açúcar presente, como no método gravimétrico de *Munson-Walker* (24). Dissolvendo-se o óxido em soluções ou solventes apropriados, pode-se determinar o cobre colorimetricamente; dissolvendo-se em ácido nítrico, determina-se o cobre por eletro-deposição.

Certos métodos prescindem da separação do precipitado formado. Pode-se, por exemplo, dissolver o óxido cuproso num excesso de solução de fosfomolibdato medindo a intensa cor azul formada, como no método de *Somogyi* (25).

1.2.2. Métodos baseados na oxidação pelo íon periodato

A reação do íon periodato com os carboidratos é mais frequentemente empregada na investigação de problemas estruturais do que com finalidades analíticas. Apesar da rea-

ção ser relativamente lenta, são encontrados alguns trabalhos (26-30) nos quais ela aparece como base de um método analítico de determinação de açúcares.

Hirst e Jones (26) titularam o ácido fórmico proveniente da oxidação da glicose na microdeterminação da mesma, enquanto que *Quick* (27) determinou vários açúcares, oxidando-os com o íon periodato após a separação dos mesmos por cromatografia de papel, efetuando a reação à temperatura de ebulição a fim de acelerá-la.

Nisli e Townshend (28) propuzeram um método espectrofotométrico para determinação de diois vicinais; o iodato formado na reação do composto com o íon periodato reage com iodeto para formar tri-iodeto, sendo o excesso de periodato mascarado com molibdato.

Uma aplicação de titulação termométrica na determinação de carboidratos foi estudada por *Bark e Prachuapaibul* (29), empregando o íon periodato como agente oxidante. Adicionaram um excesso de solução de metaperiodato de sódio à solução da amostra e após um período de até 30 minutos para que a reação se completasse, titularam termométricamente o excesso de periodato com manitol.

Recentemente *Krause, Todt e Mauch* (30) analisaram açúcares invertidos em melaço e caldo de cana-de-açúcar, determinando o consumo de periodato eletroquimicamente. É interessante destacar que neste trabalho são considerados apenas os estágios iniciais da reação, correlacionando-se o sinal obtido até 3 minutos após o início da mesma com a concentração de açúcar invertido presente na amostra.

1.3 A reação do íon periodato com carboidratos

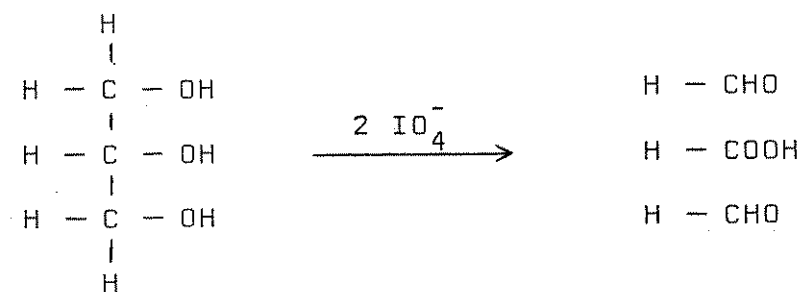
A ácido periódico e seus sais quebram a ligação entre átomos de carbono de α glicóis, α hidroxialdeídos, α hidroxicetonas, α dicetonas, α aminoalcoois e α diiminas. A reação é empregada com finalidades analíticas, preparativas e principalmente na investigação de problemas estruturais.

Através da oxidação de glicosídeos com ácido periódico as estruturas cíclicas e as formulas de Haworth dos açúcares foram confirmadas.

A ampla aplicação dessa reação ao estudo dos carboidratos se deve a inúmeros fatores, entre os quais destacam-se os seguintes:

- a)- os carboidratos são compostos poli-hidroxi-
lados;
- b)- a reação é estequiométrica e os produtos
formados bem definidos;
- c)- a reação é fácil de ser conduzida, altamen-
te específica e se efetua sob condições sua-
ves;
- d)- o curso da reação pode ser seguido analiti-
camente, pois as determinações quantitativas
dos produtos e reagentes são rápidas.

Malaprade (31) foi quem observou que a oxidação de um mol de poli-álcool do tipo $\text{CH}_2\text{OH} - (\text{CHOH})_n - \text{CH}_2\text{OH}$, com "n" variando de zero até quatro, reduzia (n+1) moles de HIO_4 até HIO_3 com a formação de 2 moles de aldeído fórmico e "n" moles de ácido fórmico. Cada mol de ligações C-C requer um mol de íon periodato que é reduzido a íon iodato. Exemplificando:



O ácido fórmico é produzido a partir dos grupos alcoólicos secundários enquanto que o aldeído fórmico se origina dos grupos alcoólicos primários.

Fleury e Lange (32) confirmaram os resultados

de Malaprade, estudando poli-álcoois, glucose, ácido tartárico, ácido glucônico e frutose. Observaram que o íon periodato não age sobre álcoois simples e ácidos glicólico, málico e cítrico. Admitiram que a reação seria específica para glicóis e salientaram sua possível utilidade nos estudos da estrutura desses compostos.

Logo após os estudos iniciais, inúmeros trabalhos foram publicados. *Karrer e Pfaehler* (33) propuzeram que parte das moléculas de glucose participariam sob a forma de cadeia aberta em sua reação com o periodato.

Segundo *Christensen* (34) nos trabalhos publicados muitas vezes os autores discordam entre si sobre pontos fundamentais das reações de carboidratos com íon periodato e salientam que muitos dos resultados apresentados poderiam ser invalidados devido às anomalias apresentadas pela reação.

1.3.1. Efeitos das condições experimentais

Um dos efeitos mais importantes é o do pH. Estudando a glucose, *Hughes e Nevell* (35) observaram que o consumo de periodato é mais rápido em meio tamponado ácido ou neutro que em meio tamponado alcalino.

Speck e Forist (36) determinaram que a oxidação de glucose se processa mais rápida em solução tampão de bicarbonato que em tampão ácido. *Fleury, Courtois e Bieder* (37) concluíram que as aldo-hexoses são mais rapidamente oxidadas em meio tamponado de fosfato pH 6,5; para álcoois poli-hidroxiados encontrou-se um efeito oposto.

Bell, Palmer e Johns (38) estudaram a oxidação de alguns carboidratos a pH 7,5 com tampões de fosfato, bicarbonato e malato. Os compostos estudados foram glucose e frutose parcialmente metiladas. Para explicar o consumo mais rápido de periodato no tampão de fosfato, os autores sugeriram a formação de complexo entre o fosfato e o periodato. *Greville e Northcote* (39) também observaram aumento da velocidade de reação na presença de fosfato.

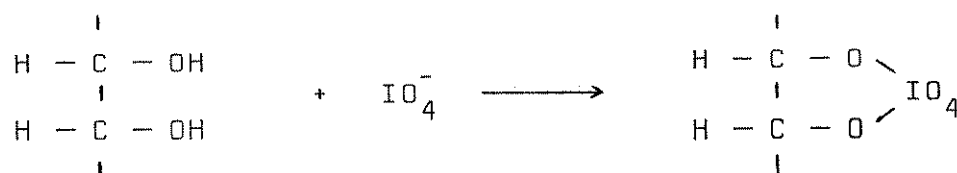
A reação é acelerada pelo aumento de temperatura, mas tem sua seletividade diminuída. *Kerr e Cleveland* (40) recomendam que a reação seja efetuada a baixas temperaturas. *Bark e Prachuabpaibul* (29) comentam que não existe diferença apreciável na velocidade de reação entre 20°C e 30°C, em nenhum valor de pH. Entretanto, foi proposto por *Quick* (27) um método de determinação de açúcares pelo periodato à temperatura de ebulição.

Recomenda-se em geral que a reação seja efetuada ao abrigo da luz. *Head e Standing* (41) observaram que sob suficiente exposição à luz, soluções de periodato se reduzem produzindo íons iodato. *Head e Hughes* (42) determinaram que muitos compostos orgânicos como aldeídos fórmico e acético, ácidos fórmico, glicólico e oxálico e alcoóis metílico e etílico podem sofrer oxidação catalizada pela luz ambiente.

Taylor, Soldano e Hall (43) indicaram que a velocidade de oxidação de glicóis aumenta proporcionalmente com a concentração de sais neutros de metais alcalinos. Por outro lado, pequenas quantidades de nitrato de cobalto II e sulfato de cobre II dificultam a reação. *Buist e Bunton* (44) determinaram constantes de velocidade dependentes da força iônica e da acidez, enquanto que *Huebner, Ames e Bubl* (45) estudaram o efeito causado por diferentes soluções tampão de mesmo pH.

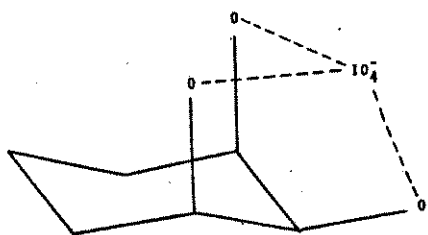
1.3.2. Mecanismo da reação de oxidação pelo periodato

Estudando a reação de oxidação de glicóis 1,2, *Price e Knell* (46) determinaram que a reação é de segunda ordem e encontraram uma dependência linear entre as constantes de velocidade obtidas e o pH na faixa de 7 a 12. Para explicar a maior velocidade na oxidação de cis-glicóis, admitem a formação de um intermediário cíclico. Essa interpretação, segundo *Stanek e colaboradores* (2), é a mais aceita.



As influências do arranjo estérico dos grupos hidroxila da molécula de açúcar na velocidade de reação foram estudadas por *Pratt e colaboradores* (47), *Fleury, Courtois e Bieder* (37), entre outros. A maior reatividade dos anômeros alfa em relação aos anômeros beta foi explicada com base nesses argumentos por *Honeyman e Shaw* (48).

Barker e Shaw (49) concluíram que ribose, talose e alose são oxidadas lentamente devido à maior estabilidade do intermediário cíclico entre os açúcares e o íon IO_4^- proporcionada pelo arranjo dos grupos hidroxila axial-equatorial-axial, ou seja :



Warsi e Whelan (50) determinaram que quatro estágios são observados na reação de oxidação de hexoses à temperatura de 0 °C :

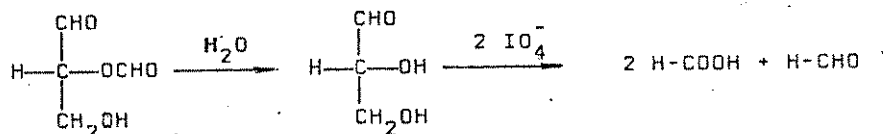
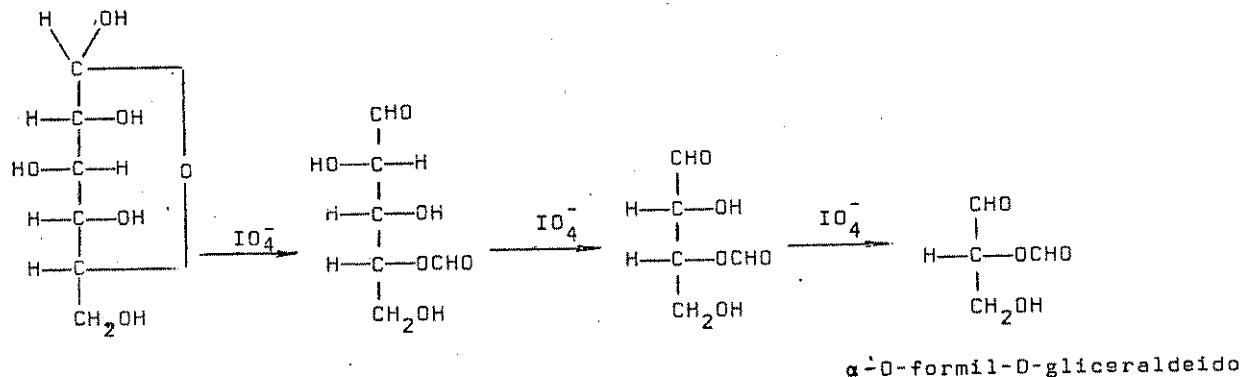
- a)- consumo de dois moles de periodato entre cinco e dez minutos;
- b)- consumo de um terceiro mol do oxidante entre trinta e setenta minutos;
- c)- redução do quarto mol de periodato em sete horas;
- d)- consumo incompleto do quinto mol após uma semana.

Ao final da reação cinco moles de periodato haviam sido consumidos por mol de glicose. Concluíram que o ataque se inicia pelo grupo hemi-acetálico, rompendo a ligação entre os átomos de carbono 1 e 2; no primeiro passo o átomo de carbono 1 passa a fazer parte do grupo éster na 4-O-formil-arabinose. A baixa velocidade dos dois últimos estágios foi atribuída ao acúmulo de formil-ésteres de gliceraldeído com falta de grupo α glicólicos; a hidrólise desse éster para compostos oxidáveis determina a velocidade global de reação. Prova-se a

ocorrência desses ésteres isolando-os após fazer a glicose reagir com três e quatro moles de periodato.

Head (51) confirmou as conclusões do trabalho citado anteriormente, estudando a reação de glicose com o íon periodato à temperatura de 20°C. Verificou que nos primeiros quinze minutos mais de 3 moles de periodato haviam sido consumidos, produzindo mais de dois moles de ácido fórmico. Para que a reação se completasse foram necessários sete dias, com um consumo de cinco moles de periodato por mol de glicose. A produção de aldeído fórmico mostrou-se pequena nos estágios iniciais, sendo 75 % do total detectado, produzidos durante o consumo do último mol de periodato. A produção total de aldeído foi de um mol por mol de glicose. A ocorrência de aldeído fórmico ao final da reação já havia sido observada por *Karrer e Pfaehler* (33).

Os passos da reação de oxidação da glicose podem ser descritos pelas reações a seguir:

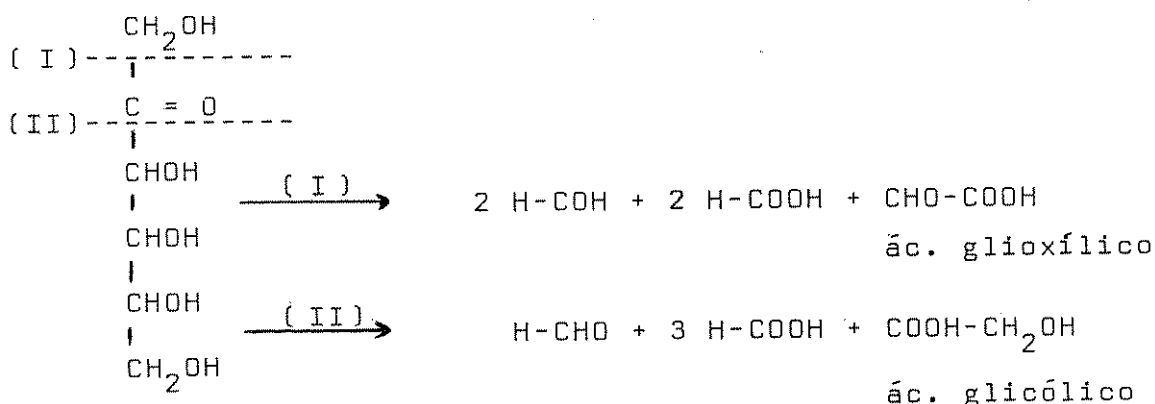


A velocidade de hidrólise do éster é portanto a velocidade global da reação de oxidação depende da estabilidade desse composto. De acordo com *Hough e colaboradores* (52), condições fortemente alcalinas ou ácidas causam hidrólise rápida do formil-éster, o qual é relativamente estável na faixa de pH de 3 a 5. Espera-se assim que em valores de pH ao redor de

4 a oxidação de carboidratos seja lenta.

Angyal e Klavins (53) confirmaram as evidências de que as aldoses são oxidadas predominantemente na forma piranósica e concluíram que aldoses produzidas durante a oxidação de compostos, como o manitol por exemplo, são oxidadas antes de sofrer ciclização. Estudos efetuados por *Hough e colaboradores* (52) concluem que na oxidação da glicose cerca de 15% das moléculas reagem possivelmente na forma furanósica ou acíclica, conforme indica a rápida produção de cerca de 0,15 moles de aldeído fórmico, logo no início da reação.

O mecanismo da frutose é mais complexo. *Fleury e Lange* (32), *Khouvine e Aragon* (54) propuzeram que a molécula pode ser atacada por dois caminhos diferentes:



A reação (I), dita glioxílica, é a principal. O ácido glioxílico se origina do grupo carbonilo e dos grupos alcoólicos secundários vizinhos. O ácido glicólico é formado através da reação (II), a partir dos dois primeiros carbonos da forma hemi-acetálica. O consumo de quatro moles de IO_4^- é rápido; o quinto e último mol do oxidante é consumido mais lentamente.

Hough e colaboradores (52) sugerem da mesma forma que para as aldoses, existe um intermediário na oxidação das cetoses que é éster glioxílico de glicol-aldeído, susceptível a hidrólise e posterior oxidação.

O mecanismo relativamente simples para oxidação dos monossacarídeos torna-se mais complicado para outros tipos de carboidratos.

1.4. Métodos Entalpimétricos de análises

Várias técnicas são adotadas com a finalidade - de se determinar a concentração de substâncias empregando o efeito térmico que acompanha as reações químicas. Diferentemente dos métodos potenciométricos e condutométricos, que se baseiam na variação de energia livre do sistema durante a reação química, os métodos termométricos utilizam a variação da entalpia do sistema, ou de alguma outra função diretamente relacionada a ela, como base de marchas analíticas.

Recentemente *Jordan e colaboradores* (55) estabeleceram critérios para a denominação correta dos diferentes métodos entalpimétricos e descreveram seus princípios fundamentais. Assim, as análises entalpimétricas podem ser classificadas em dois tipos fundamentais: Entalpimetria de Injeção Direta (DIE) e Titulações Termométricas, cuja diferenciação é feita conforme a maneira de se juntar as soluções reagentes.

Na " Entalpimetria de Injeção Direta " se adiciona um volume conveniente de solução a outro de uma só vez, enquanto que na " Titulação Termométrica " a adição é efetuada através de um fluxo de velocidade constante. A quantidade total de calor desprendida (se a reação for exotérmica) ou absorvida (se a reação é endotérmica), é acompanhada automaticamente e de modo contínuo pelo registro gráfico do potencial de desbalanceamento do circuito de uma ponte de Wheatstone. Um dos braços dessa ponte é constituído por um sensor de temperatura, que mais comumente é um termistor.

1.4.1. Princípios fundamentais

Os princípios envolvidos baseiam-se na equação

$$Q = - n_p \Delta H \quad (1.1)$$

onde Q = quantidade de calor desprendido (ou - absorvido).

ΔH = entalpia molar de reação

n_p = número de moles de produto formado

A variação de temperatura observada na solução final contida num vaso idealmente adiabático será:

$$\Delta T = \frac{Q}{K} \quad (1.2)$$

onde K representa a capacidade calorífica do sistema.

Das equações 1.1 e 1.2 resulta que :

$$\Delta T = - \frac{\Delta H n_p}{K} \quad (1.3)$$

Supondo que o valor de K seja uma constante a variação de temperatura dependerá somente de n_p . Assim,

$$\Delta T = \text{constante} \times n_p \quad (1.4)$$

1.4.2. Termistores e o circuito de medida de variação de temperatura

Os termistores são resistores construídos de material semi-condutor, de pequena capacidade calorífica e de coeficiente de temperatura ao redor de 4% por grau. A aplicação de termistores na instrumentação química, assim como o seu uso na entalpimetria foi revisto recentemente (56) A resistência dos mesmos varia exponencialmente com a temperatura, podendo ser considerada função linear da temperatura para pequenos intervalos. O termistor incorporado num circuito, como um dos braços de uma ponte de Wheatstone, permite a medida contínua de pequenas variações de temperatura. Na figura 1.1 esta representado o circuito usualmente empregado.

A alimentação do circuito pode ser efetuada por uma fonte de voltagem " E ", como uma bateria de mercúrio ; "R_A" e "R_B" representam resistências fixas; "R₁" é uma resis

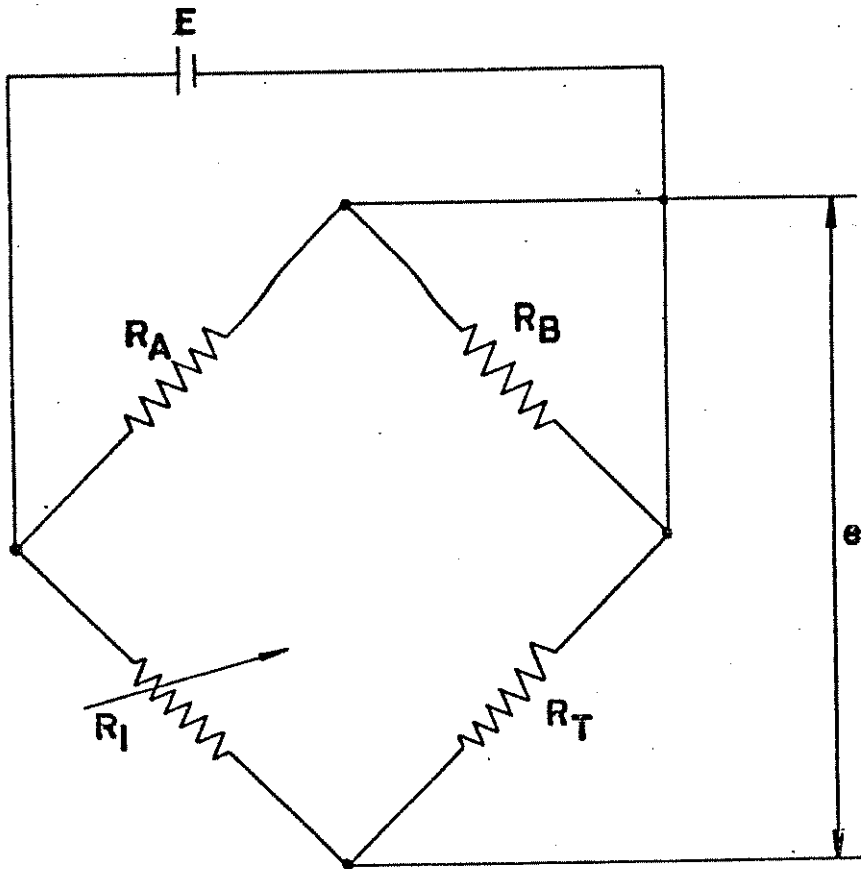


Figura 1.1 - Ponte de Wheatstone

tência variável; " R_T " é a resistência do termistor, sendo a voltagem de desbalanceamento da ponte representada por "e".

Usando-se a lei de Kirchhoff (57) e admitindo-se que "e" é medida com um instrumento de impedância infinita, - deduz-se que:

$$e = E \left[\frac{R_B}{(R_A + R_B)} - \frac{R_T}{(R_1 + R_T)} \right] \quad (1.5)$$

Quando for obedecida a relação

$$R_A \cdot R_T = R_B \cdot R_1$$

a voltagem de desbalanceamento "e" apresenta valor nulo e se diz que a ponte esta balanceada.

Diferenciando a equação 1.5, tem-se:

$$\frac{d e}{d R_T} = - \frac{E R_1}{(R_1 + R_T)^2} \quad (1.6)$$

A sensibilidade do termistor "S" é dada pela equação:

$$S = \frac{d e}{d T} \quad (1.7)$$

Substituindo a equação 1.6 na equação 1.7

$$S = - \frac{E R_1}{(R_1 + R_T)^2} \cdot \frac{d R_T}{d T} \quad (1.8)$$

O coeficiente de temperatura, α , do termistor é definido pela equação abaixo :

$$\alpha = \frac{1}{R_T} \cdot \frac{d R_T}{d T} \quad (1.9)$$

Rearranjando a equação 1.9 e substituindo na equação 1.8 obtém-se:

$$S = - \frac{E R_1 R_T}{(R_1 + R_T)^2} \cdot \alpha \quad (1.10)$$

Se os valores das resistências fixas forem iguais e se a ponte estiver balanceada, pode-se substituir " R₁" por " R_T" concluindo-se que :

$$S = - \frac{E \alpha}{4} \quad (1.11)$$

A sensibilidade do termistor indica a magnitude do sinal registrado pelo circuito, por grau de variação de temperatura produzida pela reação química em estudo. A sensibilidade é dada em volts por grau de temperatura. As medidas da variação de temperatura, com base na equação 1.11 apresentam boa precisão (58).

1.4.3. Fatores que afetam as análises entalpimétricas

Durante a análise entalpimétrica procura-se medir o efeito térmico resultante de uma reação química, através de um sinal apropriado. A variação de temperatura observada no sistema, entretanto, é o resultado da soma de vários efeitos, além daquele. O êxito alcançado numa análise entalpimétrica depende da avaliação desses efeitos adicionais e da eliminação ou controle dos mesmos. A seguir serão considerados alguns fatores que afetam os resultados experimentais.

A- Diferença entre as temperaturas iniciais das soluções reagentes.

Quando são misturadas quantidades de água em diferentes temperaturas atingir-se-á uma temperatura final de -

equilíbrio que pode ser calculada pelos princípios básicos da Calorimetria (59). O mesmo ocorre quando se trata de soluções que reagem entre si; neste caso, o efeito resultante das trocas de calor entre soluções em diferentes temperaturas se adiciona ao efeito térmico referente à reação química. O tratamento descrito a seguir, adaptado de *Priestley e colaboradores* (60) equaciona o problema em termos matemáticos, possibilitando uma avaliação de sua importância.

Suponha-se que um volume de solução de amostra seja adicionado de uma única vez a outro volume de solução - reagente contido num recipiente perfeitamente adiabático. Seja :

K- capacidade calorífica das soluções de amostra, reagente e da mistura final. É admissível - supor que soluções aquosas de concentração - inferior à 1 M apresentem capacidades caloríficas similares.

M_S - concentração da solução de amostra

V_S - volume da solução de amostra

V_R - volume da solução reagente

$R = \frac{V_R}{V_S}$

ΔH - variação da entalpia de reação

T_S, T_R, T_p - temperatura das soluções de amostra, solução reagente e solução final, respectivamente.

A quantidade de calor Q_A contida no vaso ao final da reação será :

$$Q_A = K T_p (V_R + V_S)$$

A quantidade de calor Q_B produzida no sistema é o resultado da soma do calor obtido durante a reação química, Q_1 , com o conteúdo de calor da solução de amostra, Q_2 , e mais o

conteúdo de calor da solução reagente, Q_3 . Portanto :

$$Q_B = Q_1 + Q_2 + Q_3$$

ou

$$Q_B = \Delta H V_S M_S + V_S K T_S + V_R K T_R$$

Igualando-se Q_A e Q_B tem-se :

$$K T_P (V_R + V_S) = \Delta H V_S M_S + V_S K T_S + V_R K T_R$$

Donde :

$$M_S = \frac{K}{\Delta H} \left[T_P (R + 1) - T_S - R T_R \right]$$

Se T_R for igual à T_S obtém-se:

$$M_S = \frac{K}{\Delta H} (R + 1) \cdot (T_P - T_R)$$

Analisando-se as duas últimas equações anteriores, observa-se que sempre que T_S difere de T_R essa diferença vai proporcionar resultados errôneos, se não levada em conta.

Na prática, entretanto, aceitam-se pequenas diferenças entre as temperaturas iniciais das soluções reagentes. Assim, *Jeffreys e Fresco* (61), analisando α -dioxis por entalpimetria de injeção direta, num sistema simples, admitem diferenças de temperatura de até 0,2°C. Por outro lado, *Snelson e colaboradores* (62) não fazem referência ao problema em seu estudo sobre análise entalpimétrica de fenóis. *Wasilewski e colaboradores* (63) toleraram discrepâncias de até 3°C em estudos sobre reações ácido-base e complexação de chumbo e magnésio com EDTA.

B- Trocas de calor entre o vaso de reação e o ambiente.

As análises entalpimétricas envolvem medidas de pequenas variações de temperatura; assim, efeitos térmicos estranhos à reação química devem ser minimizados, quando não - evitados. Com referência às transferências de calor entre a célula de reação e o ambiente, *Jordan e colaboradores* (55) - indicaram que frascos Dewar de paredes delgadas, especialmente desenhados, podem apresentar coeficiente de troca de calor da ordem de 10^{-3} min^{-1} . Ressaltam ainda que sistemas improvisados, usando frascos isolados com espuma de borracha que mantém condições pseudo-adiabáticas durante pequenos intervalos de tempo, podem ser empregados com finalidade analíticas.

C- Calor de diluição

Ao se misturarem soluções reagentes, pode ocorrer uma significativa variação de temperatura devida unicamente à diluição de uma solução em outra. Nas determinações por análise entalpimétrica esse problema, bem como outros, poderia ser contornado com sistemas geminados ou ainda usando-se uma diferença considerável entre os volumes das soluções a serem misturadas. O fator a ser ponderado é, obviamente, a magnitude do calor de diluição.

Trabalhando-se em condições experimentais constaⁿtes, seria possível descontar o calor de diluição, conhecido previamente em cada determinação. Ocorre que a obrigatoriedade de se manter constante o volume de solução reagente - adicionada, para se ter sempre o mesmo efeito térmico de diluição, pode tornar a análise mais complexa.

Em resumo, é lícito afirmar que os problemas - causados pelo calor de diluição devem ser minimizados, dependendo das condições experimentais de cada sistema, principalmente se ele for responsável por grande parte da magnitude do sinal obtido.

D- Outros efeitos

Além dos efeitos térmicos estranhos à reação química já citados nos itens anteriores, outros podem ser detectados. São em geral de pequena magnitude, como calor de agitação e efeito Joule de termistor. Este último se origina pela passagem da corrente elétrica pelo termistor que, embora pequena, provoca dissipação de energia térmica.

1.5. Métodos empregados na determinação de açúcares em produtos do processamento industrial da cana-de-açúcar.

Os métodos de análise de açúcares na indústria açucareira podem ser subdivididos em químicos e físicos. Como método físico mais importante destaca-se a polarimetria, baseada na propriedade que apresentam as substâncias opticamente ativas, entre as quais os açúcares, de alterar a inclinação do plano de vibração de uma luz polarizada. Dentre os métodos químicos, os mais empregados são aqueles fundamentados na reação dos açúcares redutores com soluções de complexo do íon cúprico. A caracterização geral destes últimos já foi descrita no item 1.2.1.

É interessante comentar resumidamente as etapas dos processos de fabricação de açúcar e de álcool, visto que serão feitas referências às análises de alguns dos produtos obtidos durante as mesmas. Inicialmente são esmagados os colmos produzindo-se o caldo e o bagaço. O caldo de cana, após sofrer tratamentos visando eliminar a maior parte do material coloidal, sofre concentração até próximo do ponto de cristalização da sacarose, mas sem atingi-lo, obtendo-se o produto denominado xarope. O xarope, sofrendo uma concentração adicional, é submetido a alguma das diversas técnicas de cristalização, produzindo o que se denomina "massa cozida"; nesta, os cristais de sacarose estão envolvidos por uma solução contendo impurezas orgânicas e minerais, além de glicose, frutose e sacarose, dissolvidas. Submetendo-se a "massa cozida" à centri-

fugação, são separados os cristais de sacarose e o resíduo de nominado mel; o mel retorna ao processo de cristalização e quando não contiver mais sacarose que possa ser extraída economicamente, recebe o nome de mel final ou melaço.

O melaço, bem como qualquer dos produtos de concentração do caldo, após diluição conveniente, pode ser submetido à fermentação para produção de etanol. Alternativamente pode-se fermentar diretamente o caldo de cana extraído, desvinculando-se assim a produção de álcool da fabricação do açúcar.

Tanto a matéria-prima, cana-de-açúcar, como os produtos de sua industrialização para a fabricação do açúcar devem ser analisados quanto ao seu teor de sacarose para controle do processo. A polarimetria é bastante empregada para essa finalidade devido a sua simplicidade e rapidez, embora a sacarose nos materiais citados ocorra em presença de outras substâncias opticamente ativas, principalmente a glicose e a frutose. O erro que a presença das substâncias interferentes acarreta é minimizado por dois fatores: normalmente essas substâncias ocorrem em proporção mais baixa que a sacarose, dependendo do produto considerado, além disso, a glicose e a frutose apresentam poder rotatório específico de sinais opostos o que, dependendo da proporção entre suas concentrações, pode contribuir para a diminuição do erro na determinação de sacarose.

Até recentemente era dada prioridade à produção de açúcar, produzindo-se álcool a partir do melaço. Com a necessidade de se produzir álcool etílico para suprir, em parte, as exigências energéticas brasileiras, passou-se a dar maior importância à produção industrial do etanol a partir da cana, procurando um melhor controle das etapas do processo. Assim sendo, atualmente torna-se necessária a aplicação de métodos de análises de açúcares totais, visto que tanto sacarose como glicose e frutose são consumidas pelas leveduras durante a fermentação. A determinação de açúcares totais se resume na determinação conjunta de glicose e frutose, após hidrólise da sacarose.

Segundo *Janshekar e Mor* (64), vários fatores contribuem como fonte de erro na determinação de açúcares por métodos químicos em produtos industriais. Os mais importantes são os seguintes:

a)- as reações de açúcares com vários reagentes não são simples nem estequiométricas. Devido à influência de diversos fatores como pH, concentração, temperatura e outros, os métodos são empíricos e exigem a estrita observação das condições experimentais pré-fixadas.

b)- produtos como melaço contêm materiais coloridos e colóides eletricamente carregados além dos açúcares. Compostos tipo caramelo e compostos nitrogenados tipo melanoidina são produzidos pela decomposição térmica da sacarose apresentando coloração amarelada ou marrom, dificultando a aplicação de métodos colorimétricos de análise. Além disso, materiais corantes do melaço apresentam características reductoras que interferem nos métodos baseados nas propriedades reductoras dos monossacarídeos.

c)- a glicose pode produzir por degradação de sua molécula produtos como ácidos, aldeídos, ésteres e álcoois, que podem afetar a determinação de açúcares redutores.

A composição do caldo de cana é variável e depende de diversos fatores, como tipo de solo, clima e variedade de cana, entre outros. A tabela 1.1, elaborada por *Meade* (65), fornece uma idéia da composição provável do caldo indicando a diversidade de seus componentes. Os resultados estão expressos em porcentagens dos vários compostos em relação ao total de matéria sólida solúvel.

TABELA 1.1 - Composição provável do caldo de cana-de-açúcar

Componente	Faixa de concentração (%)
sacarose	78 - 88
glicose	2 - 4
frutose	2 - 4
sais de ácidos orgânicos	1 - 3
sais de ácidos inorgânicos	1,5 - 4,5
ácidos carboxílicos	0,1 - 0,5
aminoácidos	0,5 - 2,0
proteínas	0,5 - 0,6
ceras, graxas e fosfatídeos	0,05 - 0,15
"não-açúcares" não identificados	3,0 - 5,0

A composição do melaço, além de depender da composição da cana da qual se originou, é influenciada pelo processamento industrial a que o caldo de cana foi submetido, on muitos dos componentes originais são eliminados ou se degradam e outros são adicionados. Os dados da tabela 1.2, igualmente retirados de *Meade* (65), indicam as faixas de concentração dos componentes mais importantes do melaço de cana-de-açúcar.

Os dados apresentados nas tabelas 1.1 e 1.2 evidenciam que tanto o caldo de cana como o melaço são materiais de composição complexa. A determinação de açúcares nesses produtos, dependendo do método adotado, pode exigir a remoção de vários constituintes interferentes.

Os métodos polarimétricos por exemplo requerem a adição de uma substância que clarifique o material, tornando-o transparente, para que se possa efetuar as leituras dos des

vios óticos no polarímetro e que não afete a concentração dos açúcares presentes.

O uso de tratamento prévio de amostras para análises químicas de açúcares utilizando o íon cúprico, não está ainda bem definido. Os métodos de análise recomendados pela AOAC (66) preconizam somente filtração da solução da amostra empregando-se um auxiliar de filtração como o kieselgur. *Meade* (65) comenta que não se pode determinar com certeza quais substâncias interferentes e em que proporção serão eliminadas pelo agente clarificante e que os vários estudos efetuados - apresentavam tanto argumentos favoráveis como contrários à clarificação.

TABELA 1.2 - Composição aproximada de melaço de cana-de-açúcar

Componente	Faixa de concentração (%)
água	17 - 25
sacarose	30 - 40
glicose	4 - 9
frutose	5 - 12
outras substâncias redutoras	1 - 4
cinzas (como carbonatos)	7 - 15
proteína bruta	2,5 - 4,5
aminoácidos	0,3 - 0,5
ácidos não nitrogenados	2 - 7
ceras, esteróis e fosfatídeos	0,1 - 1,0

Quando se efetua a determinação de açúcares, usando a solução do complexo de cobre divalente, o chumbo pre-

sente na amostra proveniente do agente clarificante deve ser eliminado, empregando-se para tanto soluções de íons fosfato. O íon cálcio também interfere no citado método e exige sua - eliminação, que pode ser feita com oxalato ou EDTA. A solução de Cook-Mc Allep, descrita no item 2.2.14, se presta tanto para eliminar o chumbo como o cálcio das amostras a analisar. A ICUMSA- *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis* (67) recomenda o emprego tentativo do EDTA como agente descalcificante em amostras de melaço.

1.6 Objetivos do trabalho

O presente trabalho foi iniciado com a convicção de que seria útil o desenvolvimento de um método analítico para determinação de açúcares, o qual, além de atender às exigências de precisão e exatidão, fosse simples, rápido e pudesse ser aplicado na análise de produtos do processamento industrial da cana-de-açúcar. Duas razões fundamentaram esse propósito, ou seja, a inexistência de um procedimento analítico plenamente satisfatório e a crescente demanda de análises de açúcares totais, resultante do desenvolvimento da tecnologia de produção de álcool no país, em virtude de sua vinculação com a crise energética.

Uma consideração da potencialidade da aplicação dos métodos entalpimétricos conduziu à impressão favorável, - especialmente considerando que a variação de entalpia produzida por reações de oxidação-redução possui, em geral, magnitude apreciável.

Pretendeu-se então neste estudo aplicar a análise entalpimétrica na determinação quantitativa de monossacarídeos, principalmente glicose e frutose. Procurar-se-ia inicialmente escolher uma reação que atendesse às exigências do tipo de análise adotado e que uma vez escolhida seria estudada visando o desenvolvimento do método analítico.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentação

As análises entalpimétricas podem ser conduzidas com instrumentação extremamente simples. Uma célula de reação constituída por um copo de isopor termicamente isolado num bloco de mesmo material possibilita a obtenção de resultados analíticos e cinéticos com razoável precisão (61). Em contraste, são descritos na literatura sistemas mais elaborados que permitem a automatização das análises entalpimétricas. *Guillot* (68) descreve um sistema que permite a tomada de amostras diretamente das linhas de produção industrial. *Lean e Penketh* (69) incluíram no sistema entalpimétrico que estudaram um amostrador automático e bomba peristáltica; descrevem ainda u

-ma célula de reação na qual os próprios fluxos de solução de amostra e de reagente promovem o contacto necessário à reação.

No presente trabalho procurou-se empregar nas determinações analíticas uma instrumentação bastante simples. Entretanto, no estudo exploratório da reação do íon periodato com glicose e frutose, onde se exigia um melhor controle das variáveis que o afetam, foi usado um sistema calorimétrico de precisão. São descritas a seguir as características dos dois tipos de sistemas empregados.

2.1.1. Sistema de análise entalpimétrica

O sistema empregado está representado em diagrama de blocos na figura 2.1 :

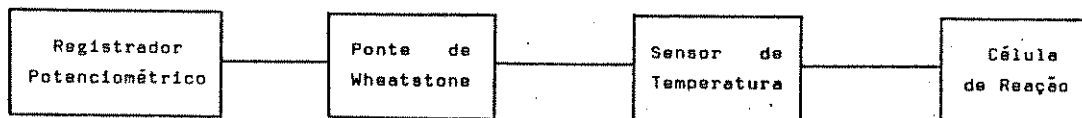


FIGURA 2.1.- Diagrama em blocos do sistema entalpimétrico para as determinações analíticas.

A célula de reação é um frasco Dewar especialmente construído, de volume total igual a 100 ml. Uma tampa de vidro, com as mesmas características isolantes do frasco, permite a vedação do mesmo e apresenta dois orifícios : um para o termistor e outro para a passagem da solução reagente. Um dispositivo para promover o rápido equilíbrio térmico entre as soluções de amostra e de reagente é incluído no sistema; consiste de uma espiral de polietileno de 1,2 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, enrolada de modo a caber no interior do frasco Dewar e mantida fixa por meio de uma fita plástica quimicamente inerte. O volume da mesma é suficiente

para conter 2 ml de solução reagente. Detalhes da célula de reação e seus acessórios podem ser observados na figura 2.2.

A homogeneização do conteúdo do frasco de Dewar antes e durante a reação é proporcionada por um agitador magnético Corning PC 351. O sensor de temperatura é um termistor Ibrape E 205 CE/ P2K2 de resistência nominal de 2200 ohms a 25°C. O termistor é acondicionado num tubo de vidro de 4 mm de diâmetro interno, imerso em parafina líquida.

A ponte de Wheatstone usada é fabricada por Leeds & Northrup, modelo nº 4760; é alimentada por uma bateria de mercúrio de 1,35 volts. O sinal detectado pelo termistor é registrado graficamente num registrador Servogor modelo RE 511.

2.1.2 Sistema calorimétrico LKB-8700

O calorímetro LKB-8700 é do tipo isoperibólico. A célula de reação é um frasco de vidro de borossilicato de 100 ml que contém um termistor e um resistor de 50 ohms para calibração elétrica. O conjunto é acoplado à tampa de um recipiente de bronze cromado o qual por sua vez é mergulhado num banho termostatizado, cuja temperatura pode ser controlada com precisão elevada.

O agitador revestido a ouro proporciona a agitação do conteúdo da célula e segura uma ampola de vidro de 1 ml de volume, que contém um dos reagentes. A ampola selada é quebrada no momento conveniente, pressionando-a por meio de um cursor externo contra uma ponta de safira colocada no fundo da célula.

O termistor (resistência de $2,0 \cdot 10^3$ ohms a 25°C) constitui um dos braços de uma ponte de Wheatstone. O sinal é detectado graficamente por meio de um registrador potenciométrico.

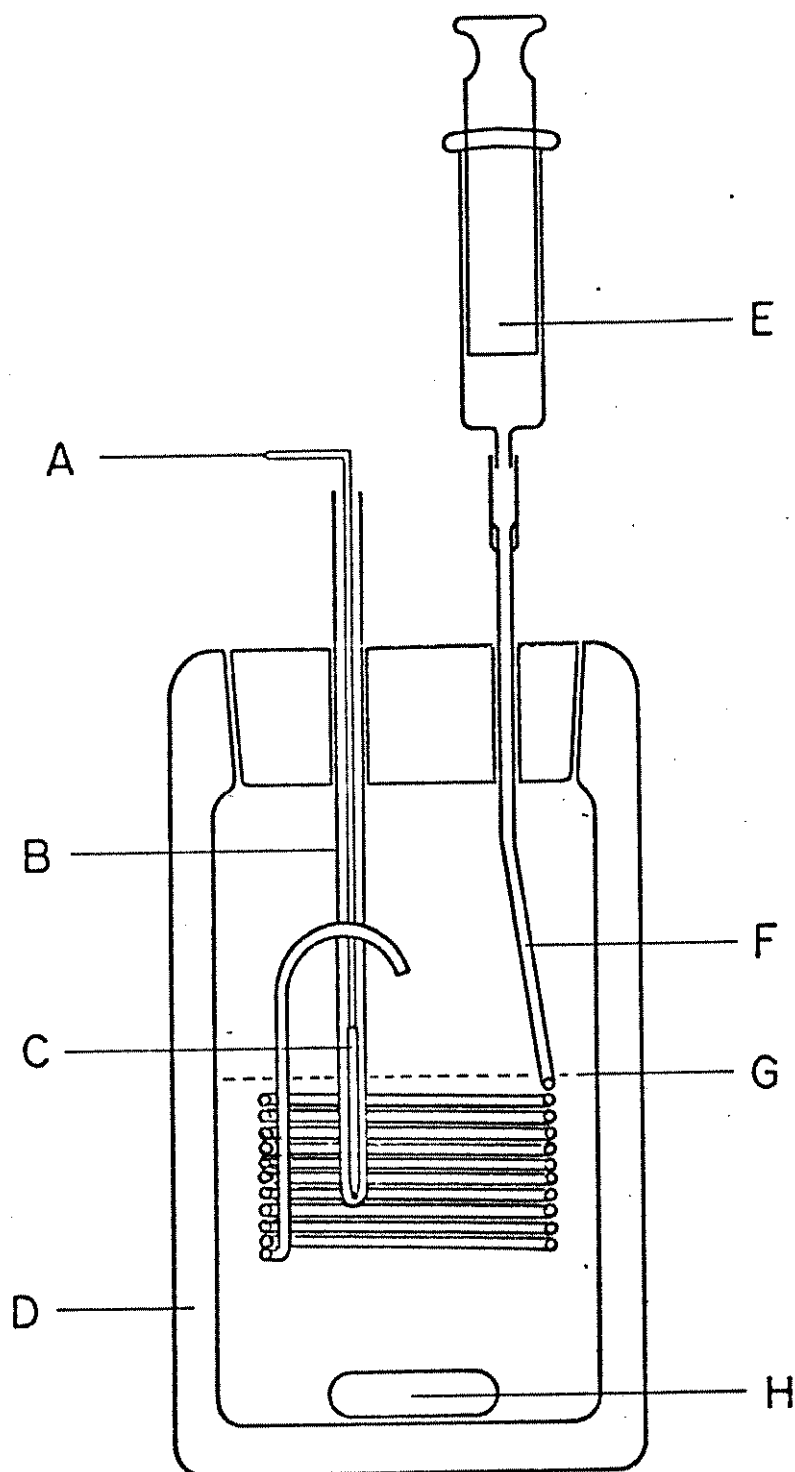


Figura 2.2 - Cella de reação e acessórios empregados na determinação entalpimétrica de açúcares.

(A)-conexão do termistor ao circuito de medida; (B)-tubo de vidro de proteção; (C)-termistor; (D)-frasco de Dewar (E)-seringa hipodérmica; (F)- serpentina de polietileno; (G)-nível da solução contida no frasco de Dewar; (H)-barra de agitação magnética

2.2 Reagentes

Os reagentes empregados foram de grau p.a. sem purificação prévia. Os açúcares foram dessecados em linha de vácuo devido à maior sensibilidade ao aquecimento. Foram preparadas soluções de periodato de sódio tamponadas em diversos valores de pH procurando manter a força iônica das soluções ao redor de 0,5 M. Assim, transferiu-se a para balão volumétrico de 250 ml : 0,9358 g de NaIO_4 , metaperiodato de sódio Carlo Erba, e mais as seguintes substâncias:

- 2.2.1 Solução pH 4,6 - 1,4 ml de ácido acético glacial e 2,05 g de acetato de sódio.
- 2.2.2 Solução pH 5,2 - 1,6 ml de ácido acético glacial e 7,98 g de acetato de sódio.
- 2.2.3 Solução pH 6,0 - 6,90 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 2,64 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 2.2.4 Solução pH 6,6 - 2,87 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 3,30 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 2.2.5 Solução pH 6,9 - 1,43 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 4,96 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 2.2.6 Solução pH 7,2 - 0,86 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 5,61 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 2.2.7 Solução pH 7,7 - 4,63 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 40 ml de solução N de NaOH
- 2.2.8 Solução pH 9,6 - 3,45 g de K_2CO_3 e 2,50 g de KHCO_3
- 2.2.9 Solução pH 1,8 - ácido clorídrico concentrado suficiente para atingir pH 1,8 medido ao potenciômetro.

Além das anteriores as seguintes soluções foram igualmente utilizadas:

- 2.2.10 Solução tampão pH 7,2 sem periodato - Foram diluídos em balão volumétrico de 1000 ml, - 4,00 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 17,57 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, completando-se o volume.

2.2.11 Solução de metaperiodato de sódio - Transferiu-se para o balão de 50 ml, 7,353 g de $\text{HIO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ e juntou-se 22,5 ml de solução 0,96N de NaOH, completando-se o volume.

2.2.12 Solução padrão estoque de açúcares invertidos - Foram diluídos 9,5 g de sacarose p.a. em 100 ml de água destilada e juntou-se 5 ml de ácido clorídrico concentrado. Deixou-se em repouso por 3 dias e completou-se o volume a 1000 ml.

2.2.13 Solução padrão de açúcares invertidos a 0,5 % - Transferiu-se 50 ml da solução estoque de invertidos para balão de 100 ml, neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio a 20 % usando fenolf-taleína e completou-se o volume.

2.2.14 Solução de Fehling modificada por Soxhlet - Esta solução é preparada pela mistura de volumes iguais de duas outras no momento de uso:

Solução A:- Dissolveu-se 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 50 g de NaOH e diluiu-se a 500 ml com água destilada. Após dois dias de repouso filtrou-se.

Solução B:- Dissolveu-se 34,639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água destilada e diluiu-se a 500 ml.

2.2.15 Solução de Cook-Mc Allep - Transferiu-se 7 g de Na_2HPO_4 e 3 g de oxalato de sódio para um balão de 100ml, dissolveu-se e completou-se o volume.

3. ESTUDO ENTALPIMÉTRICO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE PELO ION PERIODATO EM DIVERSOS VALORES DE pH.

Dentre as inúmeras substâncias que reagem com os açúcares e passíveis de serem empregadas num método entalpimétrico de análise, escolheu-se o íon periodato. Tal preferência se deve não só às razões já mencionadas no item 1.3, mas também por um fator especialmente importante: a magnitude do efeito térmico que resulta da reação.

Ensaio preliminar efetuado com glicose, que empregavam um sistema improvisado de medida de variação de temperatura, já evidenciavam que a reação com o íon periodato era exotérmica, com um elevado valor de variação de entalpia, cerca de 800 kJ por mol. Esta característica é bastante desejável em análises entalpimétricas. Outros compostos como o sulfato

de cério foram testados mas não atenderam às finalidades desejadas.

Uma vez escolhida a reação era necessário conhecer quais seriam as condições experimentais mais convenientes para obtenção de um sinal de magnitude apropriada e verificar o efeito dessas mesmas condições na velocidade de reação. Embora a cinética da oxidação já tenha sido estudada, não havia na literatura indicação sobre a variação da entalpia durante o transcorrer da mesma. Desta forma elaborou-se o presente estudo, tendo em vista finalidades analíticas e exploratórias. Embora a reação se apresente como um campo bastante atrativo para estudos cinéticos mais aprofundados, tal enfoque fugiria dos objetivos inicialmente estabelecidos.

3.1. Aspectos teóricos

Seja a reação de pseudo-primeira ordem abaixo:



Onde R representa o reagente em excesso adicionado à substância A e k representa a constante de velocidade da reação.

Aplicando-se a equação diferencial da lei de velocidade de primeira ordem tem-se que :

$$-\frac{d(A)}{dt} = k(A) \quad (3.1)$$

ou :

$$\frac{d(A)}{(A)} = -k dt \quad (3.2)$$

Integrando a equação 3.2 obtém-se:

$$\int_{(A)_0}^{(A)} \frac{d(A)}{(A)} = \int_0^t -k dt$$

ou :

$$\ln(A) - \ln(A)_0 = -k t$$

e finalmente

$$(A) = (A)_0 e^{-k t} \quad (3.3)$$

onde $(A)_0$ representa a concentração inicial da substância A e (A) a concentração da mesma existente no tempo t. A quantidade de "A" que foi consumida no intervalo de tempo "t" é :

$$(A)_r = (A)_0 - (A) \quad (3.4)$$

Substituindo a equação 3.4 na equação 3.3 obtém-se :

$$(A)_r = (A)_0 (1 - e^{-k t}) \quad (3.5)$$

A cinética de uma reação pode ser estudada verificando-se a variação de temperatura produzida pela mesma. É possível ainda, dividir o efeito térmico total observado após

um tempo "t" de reação, ΔT , em duas partes: uma correspondente à uma variação de temperatura verificada no tempo zero, ΔT_1 , e outra referente à variação adicional de temperatura, ΔT_2 , obtida quando a reação se completa.

Admitindo-se que a variação de temperatura seja proporcional à concentração de reagente consumido pode-se escrever as equações abaixo:

$$[A]_T = k' (\Delta T - \Delta T_1) \quad (3.6)$$

$$[A]_0 = k' (\Delta T_2) \quad (3.7)$$

nas quais k' representa uma constante de proporcionalidade

Substituindo-se as equações 3.6 e 3.7 na equação 3.5 e rearranjando obtém-se:

$$\Delta T = k \Delta T_2 (1 - e^{-k t}) + \Delta T_1 \quad (3.8)$$

A dedução descrita anteriormente não inclui o efeito das trocas de calor que ocorrem entre a cela de reação e seus arredores. No calorímetro LKB 8700 as trocas de calor com o ambiente seguem a lei de Newton do resfriamento (70). Levando-se em conta este processo (71) obtém-se:

$$\Delta T = \frac{k \Delta T_2}{E - k} (e^{-k t} - e^{-E t}) + \Delta T_1 e^{-E t} \quad (3.9)$$

onde:

ΔT = variação de temperatura detectada no tempo t

k = constante de velocidade da reação

E = constante newtoniana de troca de calor

ΔT_1 = variação instantânea de temperatura

ΔT_2 = variação de temperatura, adicional a ΔT_1 , corrigida para troca de calor, medida em tempo infinito.

Conforme citado, em 1.3.2, a reação de carboidratos com o íon periodato é de segunda ordem mas empregando-se um excesso de oxidante pode-se considerar a reação como sendo de pseudo-primeira ordem. No presente trabalho procurou-se empregar um excesso de periodato a fim de que a velocidade de reação dependesse apenas da concentração do açúcar.

3.2 Procedimento

Optou-se pelo emprego do sistema calorimétrico LKB-8700 para o estudo entalpimétrico oxidação com íon periodato devido aos recursos e facilidades que ele apresenta. A reação foi conduzida a 298,16 K nos seguintes valores de pH: 1,8 ; 4,6 ; 5,2 ; 6,0 ; 6,6 ; 6,9 ; 7,2 ; 7,7 ; 9,6. Foram empregadas para essa finalidade as soluções tamponadas cujo preparo foi descrito no item 2.2.

Adicionou-se uma quantidade exatamente pesada de solução de açúcar contendo 1 mg por mililitro, através de seringa hipodérmica, em ampola de vidro apropriada. As ampolas foram em seguida resfriadas em nitrogênio líquido e seladas a fogo, empregando-se os acessórios do sistema calorimétrico destinados para essa finalidade.

Transferiu-se para a célula de reação do calorímetro 90 ml de solução tamponada de periodato. A ampola previamente preparada foi acoplada ao agitador e o conjunto imerso na solução reagente contida na célula do calorímetro. Efetuou-se em seguida o conjunto de operações destinadas a colocar o sistema em funcionamento.

A massa de açúcar empregada foi ao redor de 25 mg para a glicose e 15 mg para a frutose. Essa diferença se deve à menor quantidade de solução de frutose colocada na ampola, tendo em vista a menor estabilidade desse açúcar ao

aquecimento produzido durante o fechamento da mesma.

Quando o sistema calorimétrico atingiu o equilíbrio, registrou-se a linha de base durante no mínimo por dez minutos, quebrou-se a ampola promovendo-se o contacto das soluções de açúcar e de periodato. Registrou-se então o efeito térmico resultante e foram obtidas curvas de variação de temperatura em função do tempo, empregando-se um fundo de escala no registrador de 2 V e velocidade de papel de 1 cm/min. Mediu-se diretamente sobre o papel do registrador, com régua graduada em milímetros, a distância entre os pontos do prolongamento da linha básica e os pontos da curva em intervalos de tempo de 30 segundos. Os dados experimentais foram ajustados à equação 3.9, empregando-se um programa multiparamétrico - de ajuste de curvas em linguagem BASIC (72), usando-se um computador PDP-10.

3.3 Resultados obtidos

Nas figuras 3.1 a 3.6 são apresentadas algumas das curvas obtidas no presente estudo que ilustram o comportamento do sinal entalpimétrico na faixa de pH em investigação. O desvio padrão absoluto para o ajuste dos resultados experimentais foi cerca de 0,03 mm tanto para a glicose como para a frutose. Isso indica que as constantes de velocidade obtidas podem ser empregadas para as finalidades pretendidas com um grau de confiabilidade bastante razoável. A tabela 3.1 mostra uma das tabulações desses dados fornecidas pelo computador. Os parâmetros $V(1)$, $V(2)$, $V(3)$ e $V(4)$ se referem respectivamente aos parâmetros k , ΔT_1 , ΔT_2 e E . As demais tabulações são apresentadas no apêndice .

Os resultados de maior interesse obtidos deste estudo podem ser apreciados observando-se a tabela 3.2, onde ΔT_5 representa a variação de temperatura observada 5 minutos após o início da reação.

TABELA 3.1 - Dados típicos do ajuste dos resultados experimentais da oxidação da glicose em pH 6,0. Massa de açúcar empregada igual a 26,37 mg.

V(1)= 7.65935E-3

V(2)= 0.516126

V(3)= 12.8013

V(4)=-5.89664E-5

X	Y, NEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD.DEV.
90	6.87	6.91401	-4.40145E-2	-1.25568
120	8.3	8.24648	5.35161E-2	1.52675
150	9.32	9.31028	9.71997E-3	0.277298
180	10.19	10.1606	2.94315E-2	0.839641
210	10.84	10.8412	-1.18899E-3	-3.39204E-2
240	11.39	11.387	3.01826E-3	0.086107
270	11.81	11.8256	-1.56348E-2	-0.44604
300	12.12	12.1792	-5.91514E-2	-1.68751
330	12.44	12.465	-2.50183E-2	-0.71374
360	12.68	12.6971	-1.71319E-2	-0.488751
390	12.88	12.8865	-6.53636E-3	-0.186474
420	13.02	13.042	-2.20082E-2	-0.627865
450	13.2	13.1705	2.94781E-2	0.840971
480	13.31	13.2776	3.23789E-2	0.923728
510	13.4	13.3677	3.22894E-2	0.921174
540	13.49	13.4443	4.57090E-2	1.30402
660	13.65	13.6633	-1.32779E-2	-0.378801
720	13.71	13.7418	-3.18350E-2	-0.90821

SUM(DEV.)**2= 1.72014E-2 , STD.DEV.= 3.50524E-2

CHI**2= 1.47059

Verifica-se pelos dados apresentados na tabela 3.2 que na faixa de pH ao redor da neutralidade se obtêm condições mais apropriadas quanto à magnitude do sinal para a - glicose e frutose; em relação à velocidade de reação a região favorece a glicose. Para a frutose as constantes obtidas em pH próximo a 7 são similares às da glicose, embora inferiores à verificada em pH 5,2.

Em consequência do exposto, conclui-se que o - pH mais favorável para a reação de glicose e frutose serem aplicadas num método entalpimétrico esta entre 6,9 e 7,2.

TABELA 3.2 - Efeito do pH sobre a constante de velocidade e variação de temperatura da reação de frutose e glicose com o íon periodato.

pH	GLICOSE		FRUTOSE	
	ΔT_5 (cm/milimol)	$k \cdot 10^2$ (s-1)	ΔT_5 (cm/milimol)	$k \cdot 10^2$ (s-1)
1,80	20,00	0,757	48,25	2,518
4,60	27,50	0,260	57,56	3,000
5,20	40,11	0,288	64,89	3,940
6,00	82,80	0,766	62,67	2,707
6,60	88,21	0,916	75,54	1,177
6,90	85,72	1,223	74,81	1,250
7,20	82,79	1,364	74,44	1,436
7,70	76,27	0,933	69,64	1,652
9,60	32,18	0,124	33,54	0,286

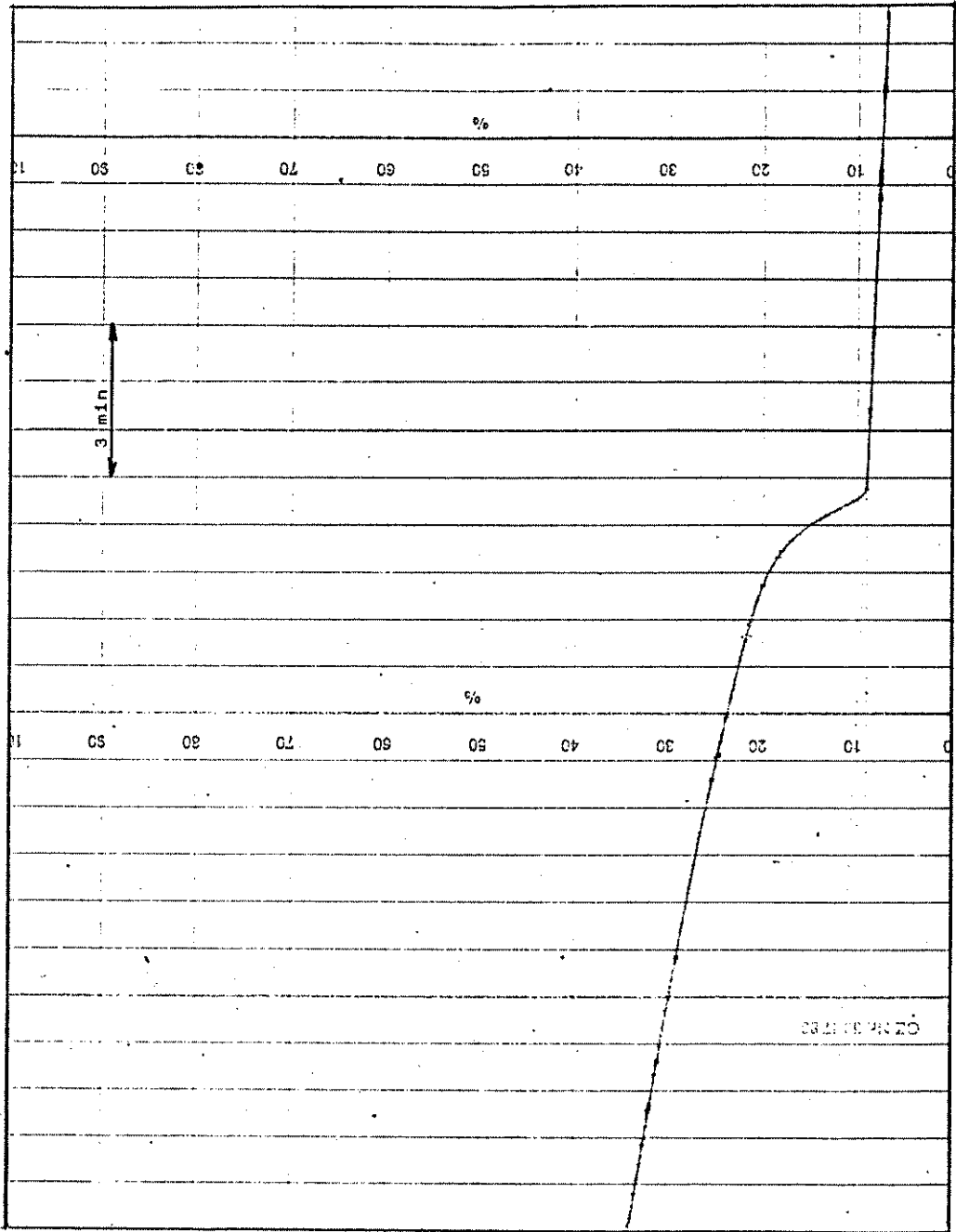


Figura 3.1. - Entalograma obtido na oxidação de glicose com íon periodato em pH 1,8

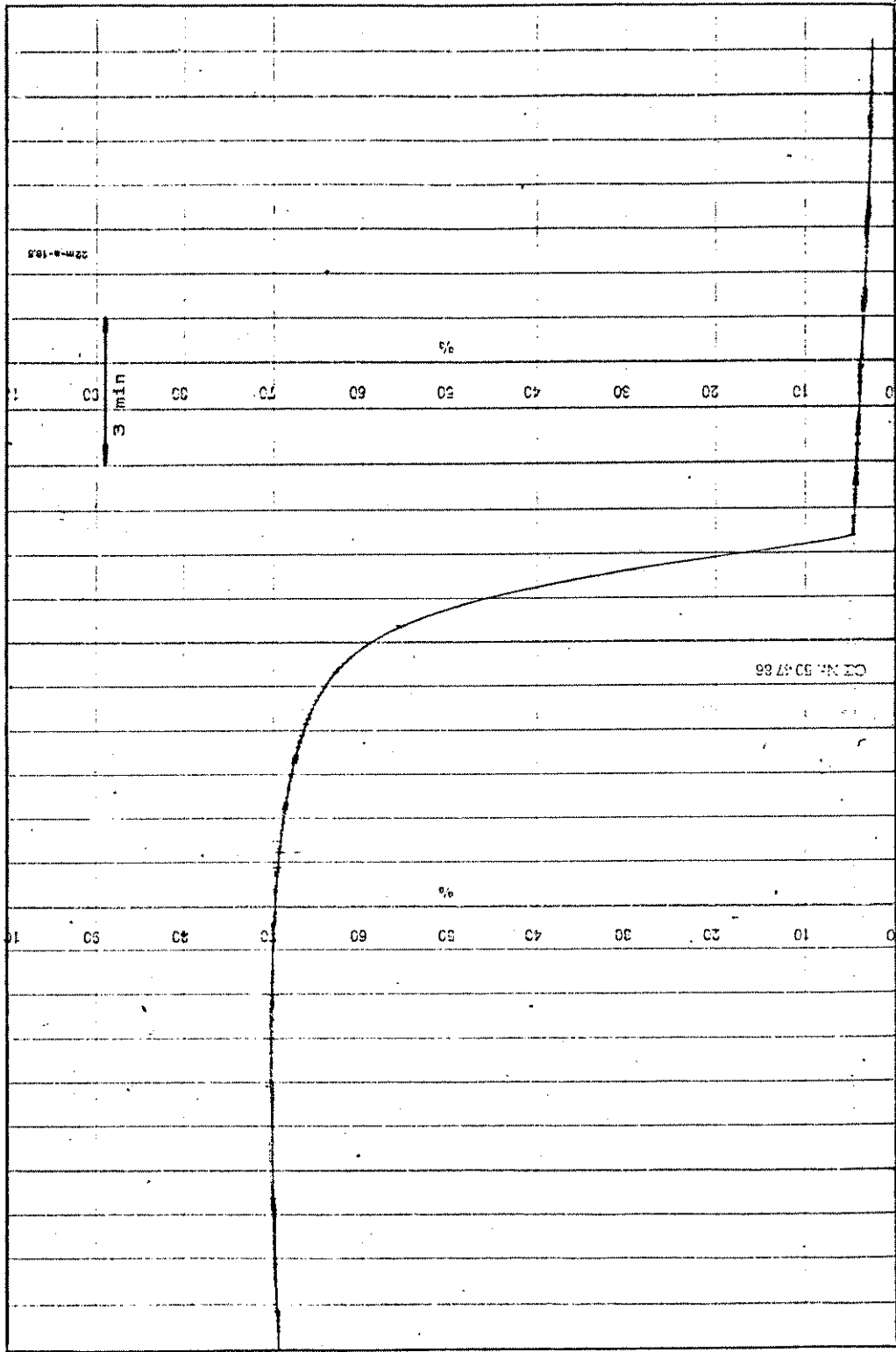


Figura 3.2. - Entalpiograma obtido na oxidação de glicose com íon periodato em pH 6,9

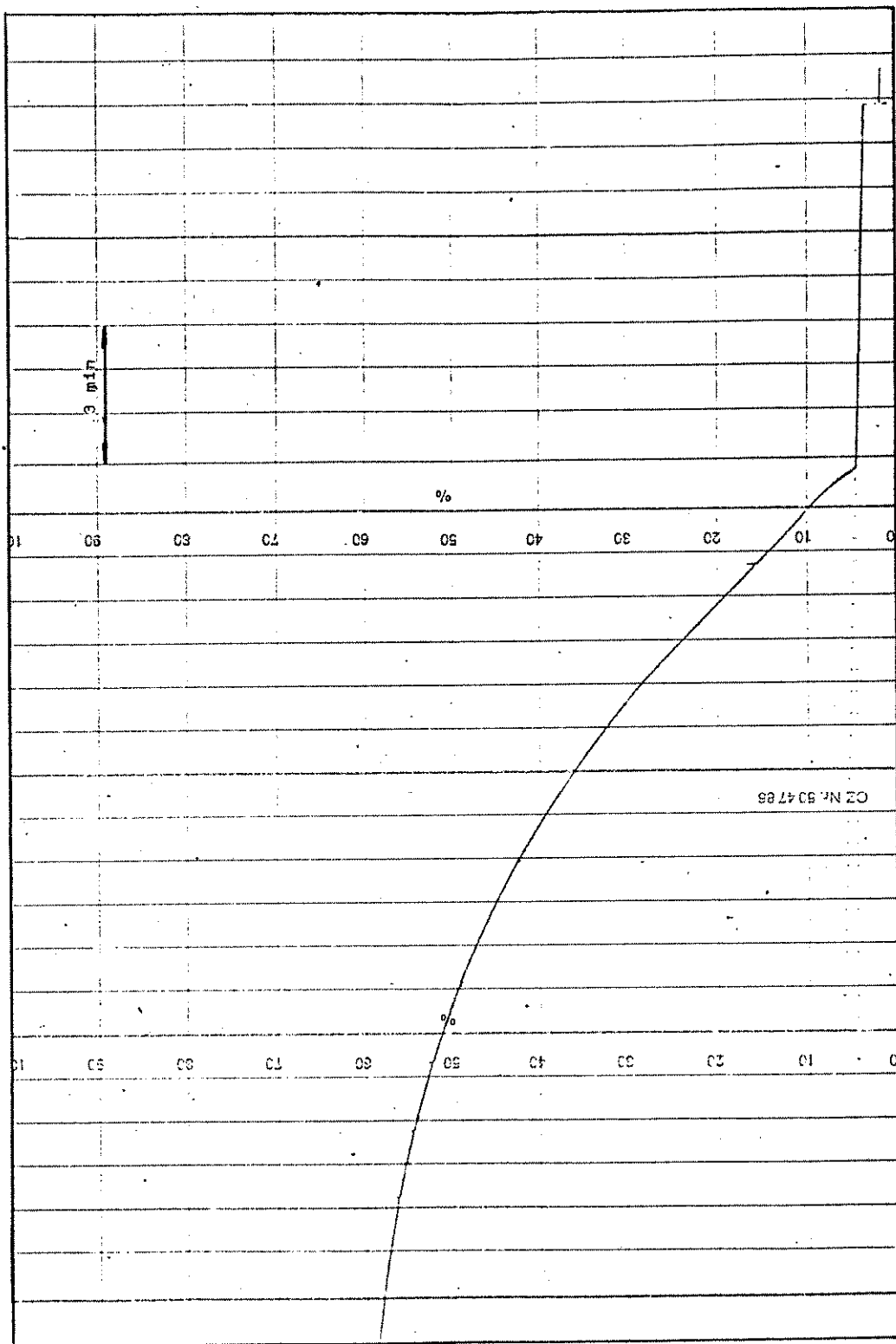


Figura 3.3. - Entalpiograma obtido na oxidação de glicose com íon periodato em pH 9,6

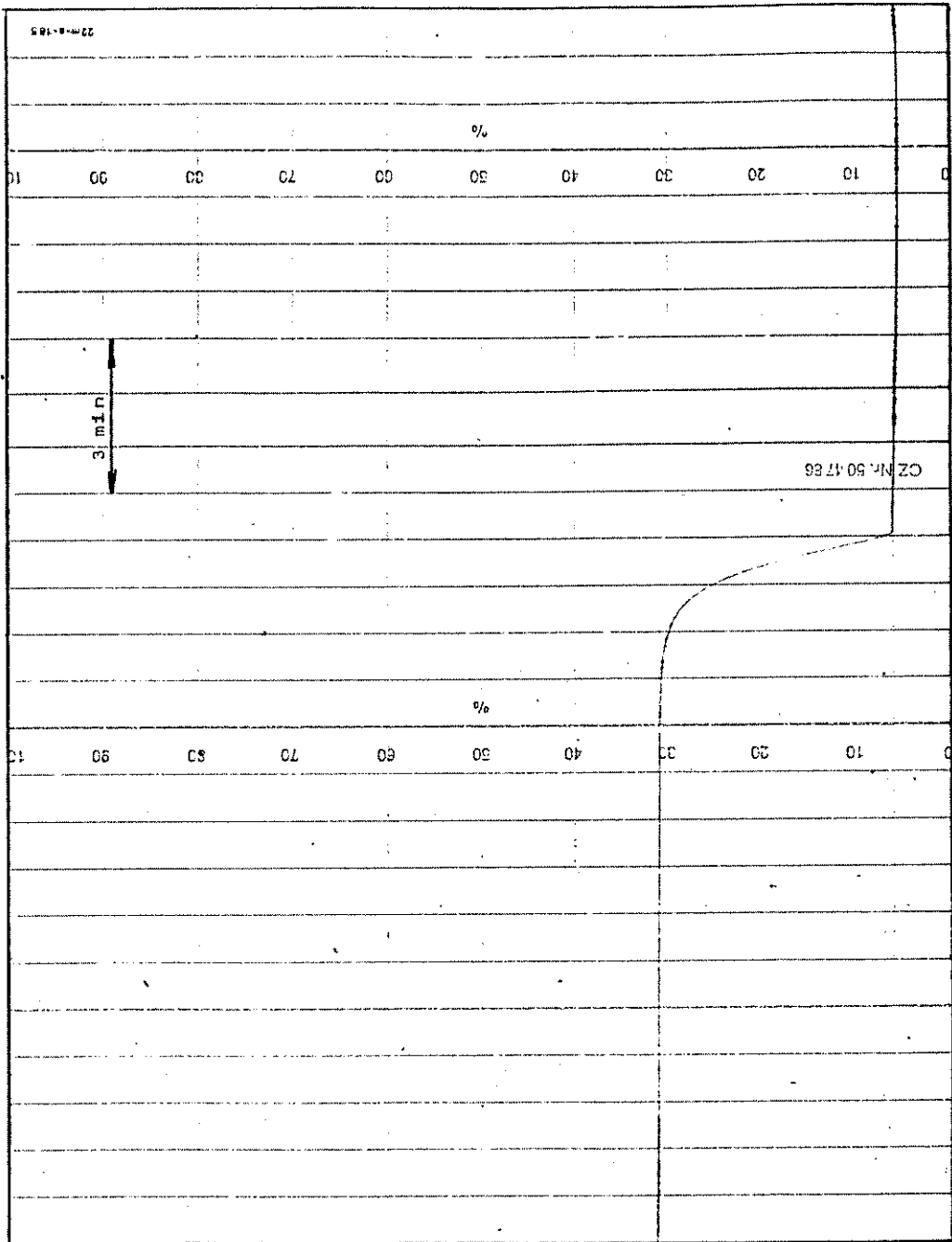


Figure 3.4. - Entalpiograma obtido na oxidação de frutose com fon periodeto em pH 1,8

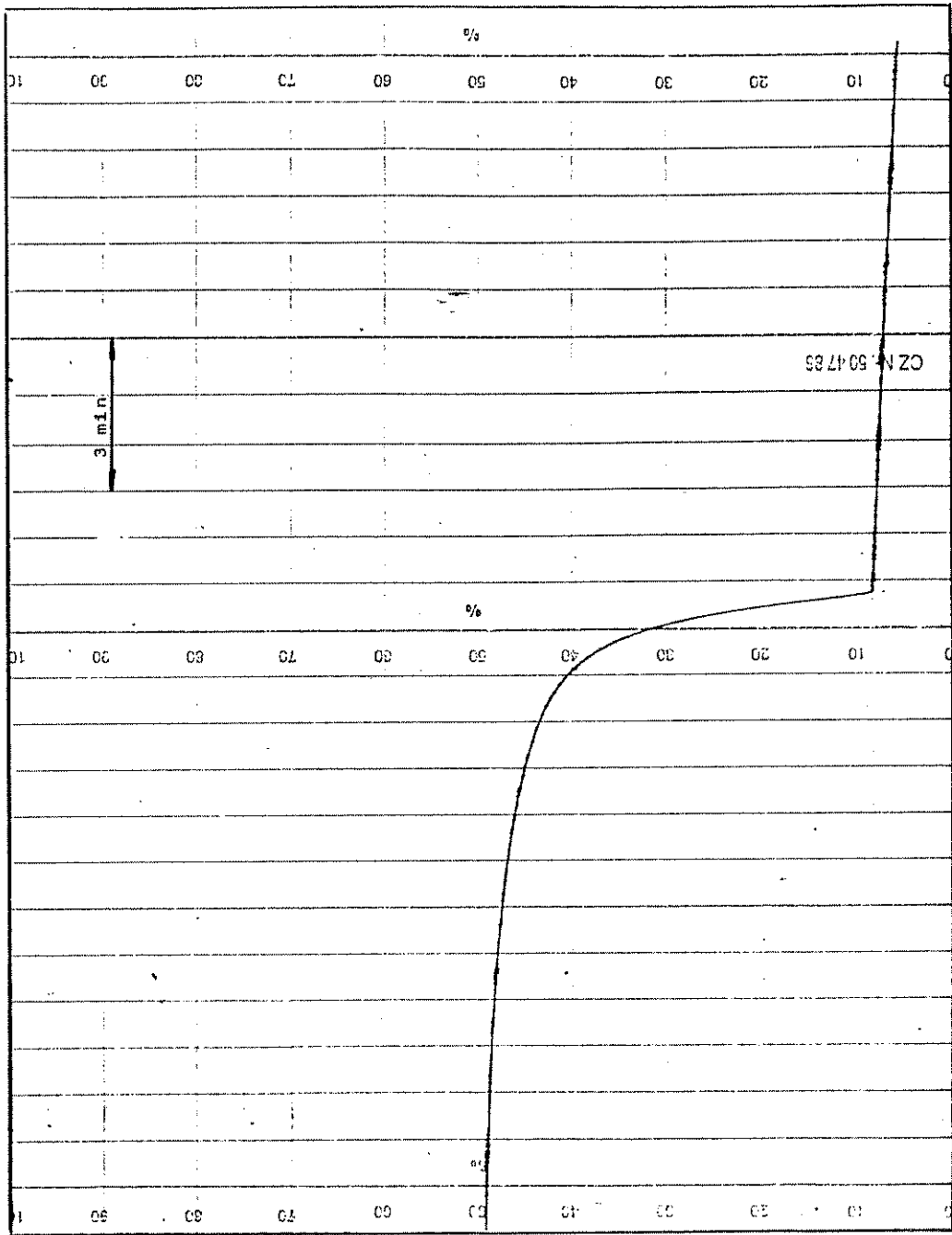


Figure 3.5. - Entalpiograma obtido na oxidação de frutose com íon periodato em pH 6,9

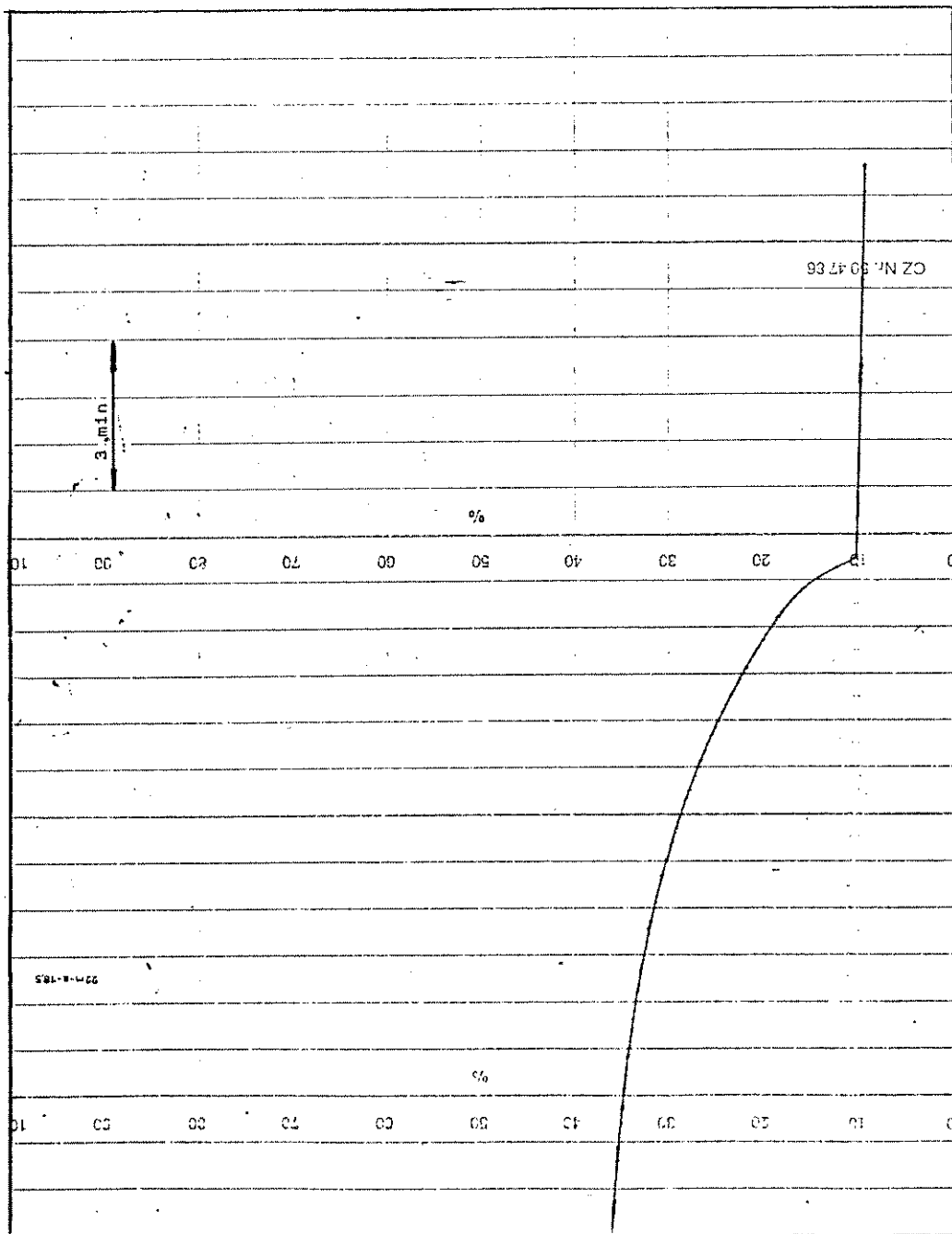


Figura 3.6. - Entalograma obtido na oxidação de frutose com ion periodato em pH 9,6

4. DETERMINAÇÃO ENTALPIMÉTRICA DE MONOSSACARÍDEOS

Com base nos estudos precedentes, optou-se pelo emprego da solução tampão de fosfato pH 7,2 para controle das condições da reação de oxidação de açúcares pelo íon periodato. As determinações passaram a ser efetuadas no sistema entalpimétrico descrito no ítem 2.1.1, visando estabelecer uma metodologia analítica simples e de baixo custo, baseada no efeito térmico originado pela reação. Foram estudados os seguintes açúcares: glicose, frutose, arabinose, xilose e ribose, verificando-se a dependência entre o sinal originado pela variação de entalpia da oxidação e a concentração.

4.1. Efeito da diferença entre as temperaturas iniciais das soluções reagentes.

Um sério problema nas análises entalpimétricas é a troca de calor que ocorre na mistura das soluções reagentes à diferentes temperaturas. Origina-se assim, um sinal adicional ao registro da variação de temperatura devido à reação.

Poder-se-ia utilizar um sistema geminado no qual o efeito térmico da mistura fosse compensado; isso entretanto, exigiria a manipulação de dois sistemas idênticos, o uso de termistores "casados" e a espera de um tempo considerável para que todos os componentes do sistema estivessem nas mesmas condições experimentais. Outra possibilidade seria esperar que as soluções atingissem a mesma temperatura e depois manipulá-las com o cuidado necessário para manter essa condição. Entretanto, o presente trabalho objetiva a elaboração de uma metodologia simplificada para a determinação de açúcares e que possa ser aplicada em análises de rotina. Essas duas condições eliminam as possibilidades citadas para contornar o problema em questão.

Procurou-se um meio mais prático de se eliminar o problema, construindo-se uma serpentina de polietileno descrita no item 2.1.1, na qual se colocava um dos reagentes. Imergindo a serpentina no conteúdo do frasco Dewar, sua extensa superfície de contacto, cerca de 30 cm², possibilita o rápido equilíbrio térmico entre as duas soluções antes que a reação ocorra. O teste descrito a seguir, demonstra a eficiência desse procedimento.

Transferiu-se para o frasco adiabático, que faz parte do sistema entalpimétrico descrito no item 2.1.1, 50 ml de água destilada à 22 °C. Fechou-se o mesmo com a tampa apropriada, fazendo com que o termistor mergulhasse na água e acionou-se o agitador magnético. Iniciou-se então o registro da linha de base, que corresponde ao trecho AB da figura 4.1. Durante esse intervalo, adicionou-se 2 ml de água destilada à 33°C a serpentina, introduzindo-a rapidamente no frasco Dewar.

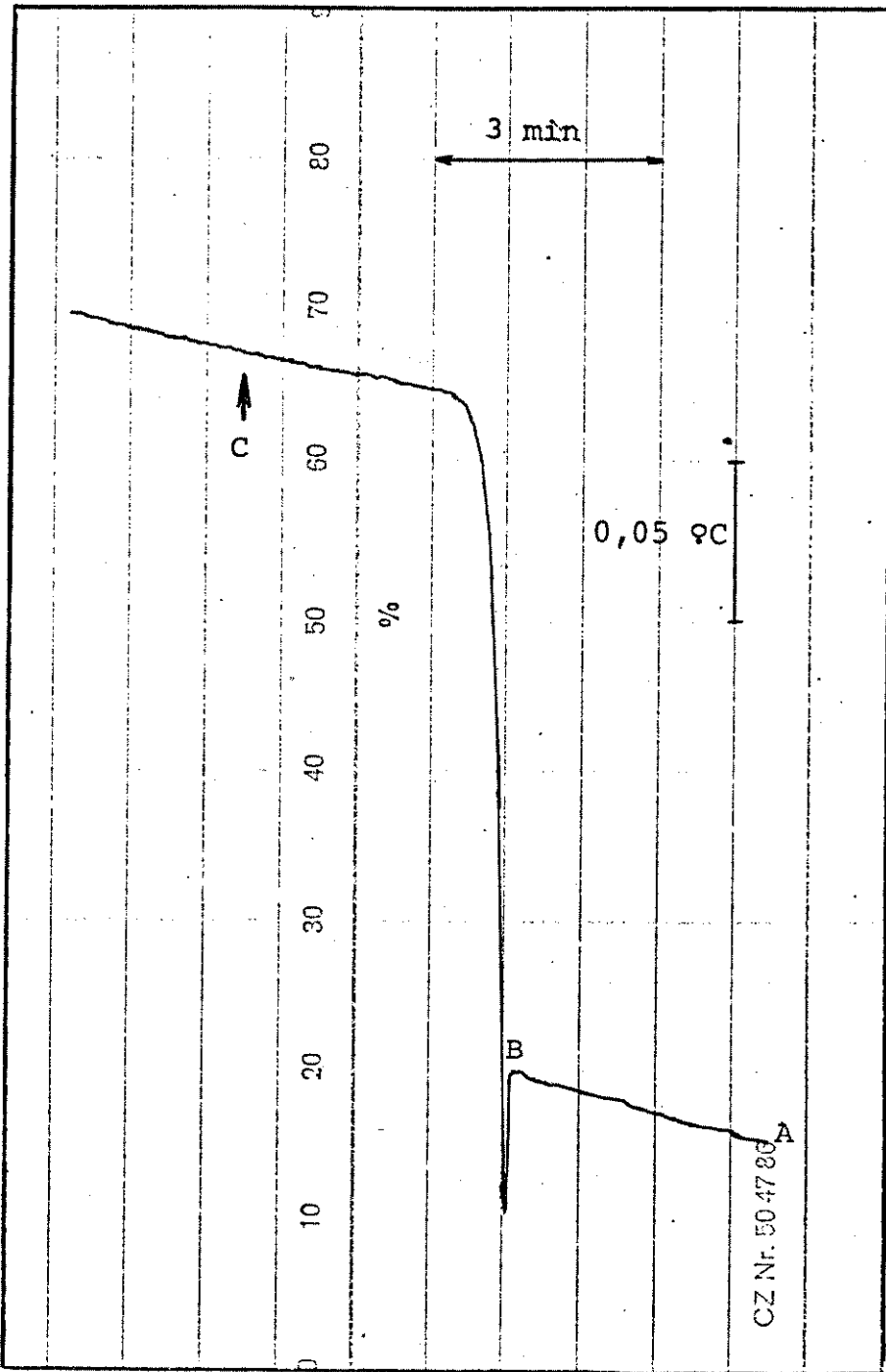


Figura 4.1. - Equilíbrio térmico da água contida na serpentina de polietileno à 33°C com água à 22°C contida no frasco de Dewar.

Observou-se então, uma rápida deflexão da pena do registrador e a retomada do equilíbrio. Quando a água contida na espiral é expulsa, ponto C da figura 4.1, não se detectou efeito térmico algum. Outros testes efetuados com água à diferentes temperaturas produziram resultados similares.

Na prática as soluções reagentes não estarão à temperaturas tão diferentes quanto as provocadas nesses testes o que sugere que o equilíbrio térmico ocorrerá então instantaneamente.

4.2. Efeito da entalpia de diluição

No estabelecimento da marcha analítica da determinação entalpimétrica de açúcares estabeleceu-se que seriam adicionados inicialmente ao frasco Dewar a solução tampão de fosfato e a solução de açúcar, enquanto que a solução de periodato seria adicionada através da serpentina. A razão para assim se proceder é que como a solução de periodato é adicionada em excesso não haveria preocupação com uma eventual retenção de algumas gotas da mesma na espiral, quando fosse deslocada para dar início à reação.

A questão que se apresentou a seguir foi a forma em que seria adicionado o íon periodato: se através do ácido periodico ou do meta-periodato de sódio. O ácido, por ser mais solúvel, permite o preparo de soluções mais concentradas enquanto que o sal apresenta menor solubilidade. A escolha - entretanto, dependeria de um fator mais importante: a entalpia de diluição da solução de periodato na solução tampão de fosfato. Se a entalpia de diluição representa uma fração muito apreciável do efeito térmico total medido, aumenta-se a imprecisão na medida da variação de temperatura correspondente à reação em estudo.

Foi então observado que um volume de solução de periodato de sódio à 10% ao ser diluído na solução tampão de fósforo provocava um efeito exotérmico, enquanto que o mesmo volume de uma solução à 10% de ácido periodico provocava um

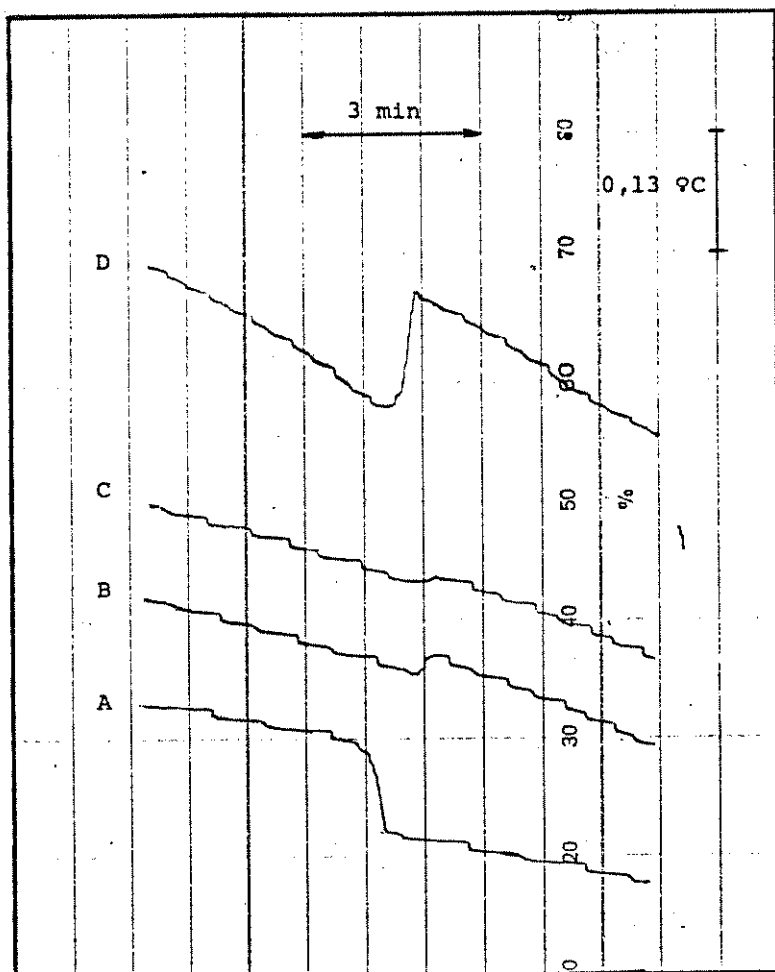


Figura 4.2. -Efeitos térmicos referentes a diluição das soluções abaixo em tampão de fosfato pH 7,2.

A -1ml de solução à 10% de metaperiodato de sódio

B -1ml de solução à 5% em metaperiodato de sódio e 5% em ácido periódico

C -1ml de solução à 5,4% em metaperiodato de sódio e 4,5% em ácido periódico

D -1ml de solução à 10% em ácido periódico.

efeito de magnitude similar mas endotérmico. Ficou indicado então, que uma mistura de ambos poderia fornecer uma solução de íons periodato com uma entalpia de diluição desprezível. Foi efetivamente o que se constatou, conforme pode ser observado na figura 4.2. Posteriormente passou-se a preparar a solução de periodato pela neutralização parcial de uma solução de ácido periódico com solução de hidróxido de sódio, obtendo-se os mesmos resultados. O preparo desta solução é descrito no item 2.2.

4.3. Desenvolvimento da marcha analítica para a determinação de açúcares isolados

Como resultado dos estudos anteriormente descritos foi estabelecida uma metodologia analítica para a determinação entalpimétrica de açúcares usando o sistema entalpimétrico já descrito.

4.3.1. Obtenção das curvas de calibração

Foram preparadas soluções de glicose, frutose, arabinose, galactose, xilose e ribose contendo 5 mg/ml. Adicionou-se ao frasco Dewar, 50ml de solução tampão de fosfato - pH 7,2, mais um volume de solução padrão de açúcar de até 4 ml e água destilada para perfazer um volume total de 55 ml.

Transferiu-se para a serpentina de polietileno, 2 ml de solução de periodato, conectando-se a ponta de uma pipeta a um segmento de plástico flexível colocado na extremidade da serpentina. A solução preencheu a espiral sem extravasar; logo após, a serpentina foi mergulhada na solução contida no frasco de Dewar. Fechou-se este último fazendo com que o termistor ficasse mergulhado na solução reagente e que uma das extremidades da serpentina permanecesse do lado de fora do frasco adiabático. Ligou-se o agitador magnético e após dois minutos de espera registrou-se a linha de base durante cinco minu-

tos. Conectou-se em seguida a extremidade de uma seringa hipodérmica de 10 ml à extremidade externa da espiral, através do mesmo adaptador usado anteriormente para a pipeta e injetou-se vagarosamente 10 ml de ar, promovendo o deslocamento da solução de periodato e dando assim início à reação. Registrou-se o sinal referente à variação de temperatura durante pelo menos seis minutos. A velocidade do papel empregada foi de 1 cm por minuto, com um fundo de escala no registrador de 5 mV.

A medida do sinal entalpimétrico obtido foi efetuada com uma régua comum, graduada em milímetros, medindo-se a distância vertical, após cinco minutos de reação, entre o prolongamento da linha de base e a curva obtida. A figura 4.3 ilustra o procedimento descrito.

4.3.2 Resultados obtidos

Entalpogramas típicos são mostrados nas figuras 4.4, 4.5 e 4.6, para os açúcares estudados. Nas figuras 4.7 e 4.8 são mostradas as curvas de calibração, evidenciando a correlação entre as quantidades de açúcar e os sinais correspondentes, medidos após cinco minutos de reação. A escolha desse intervalo de tempo para se medir o sinal foi feita levando-se em consideração as características da reação de todos os açúcares estudados; conforme o caso, pode ser escolhido um tempo menor sem prejuízo da precisão. A magnitude dos efeitos térmicos obtidos são mostrados na tabela 4.1, como média de três repetições, juntamente com o erro padrão da média correspondente.

Uma vez determinadas as equações de regressão linear, correspondentes às curvas de calibração de cada açúcar, determinou-se a concentração de soluções puras de açúcar. Os resultados são mostrados na tabela 4.2.

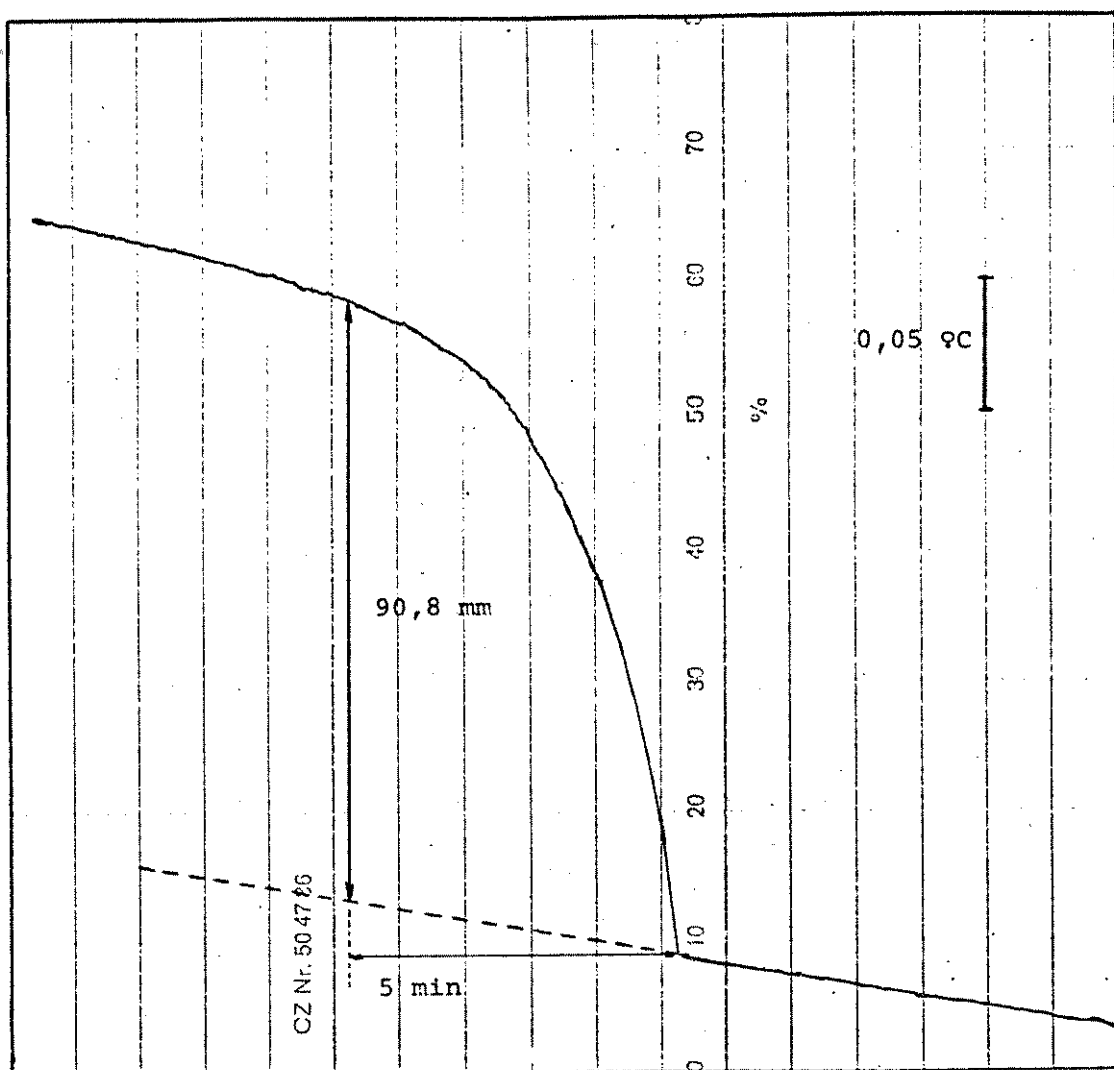


Figura 4.3. - Entalpograma típico mostrando o processo de medida da magnitude do sinal.

TABELA 4.1 - Variação de temperatura medida em milímetros após cinco minutos de reação de oxidação de vários açúcares.

Composto	Massa em miligramas			
	5	10	15	20
glicose	25,6 ± 0,4	49,3 ± 0,3	71,1 ± 0,6	93,8 ± 1,2
frutose	23,5 ± 0,3	44,3 ± 0,6	64,5 ± 0,8	83,2 ± 0,2
arabinose	28,4 ± 0,1	52,7 ± 0,3	76,7 ± 0,6	101,3 ± 0,7
xilose	28,3 ± 0,1	51,4 ± 0,2	74,8 ± 0,8	100,1 ± 0,8
galactose	21,1 ± 0,4	40,1 ± 0,5	57,0 ± 0,5	75,1 ± 0,7
ribose	8,6 ± 0,2	15,9 ± 0,4	21,8 ± 0,2	28,3 ± 0,3

TABELA 4.2 - Determinação de açúcares em soluções puras, empregando-se a metodologia proposta.

Composto	quantidade tomada (mg)	quantidade de terminada (mg)	erro relativo(%)
arabinose	12,50	12,66	+ 1,3
frutose	7,50	7,43	- 0,9
galactose	12,00	12,20	+ 1,7
glicose	2,50	2,49	- 0,4
ribose	17,50	17,56	+ 0,3
xilose	13,50	13,41	- 0,7

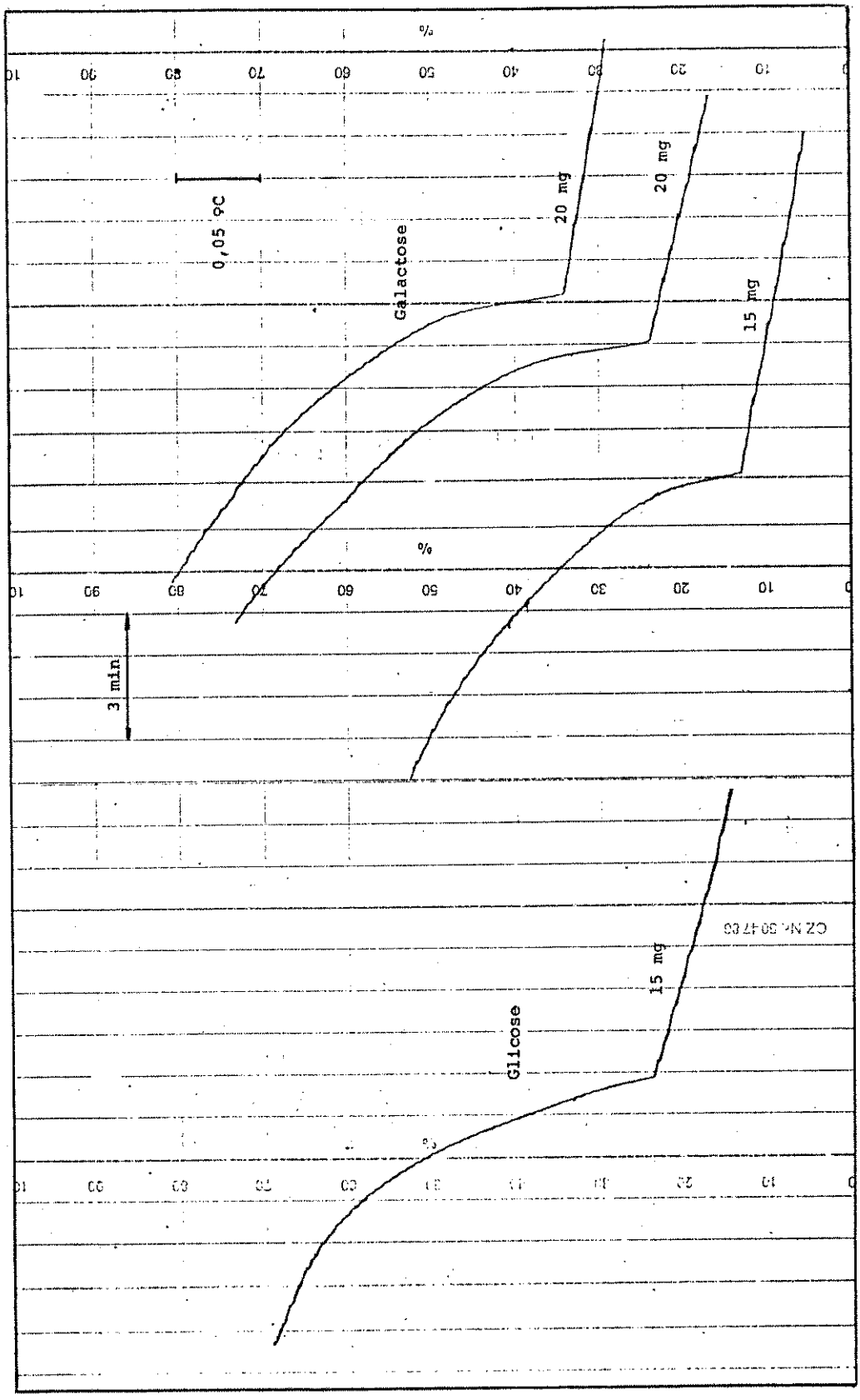


Figura 4.4. - Entalpiogramas obtidos na oxidação de diferentes quantidades de glicose e galactose.

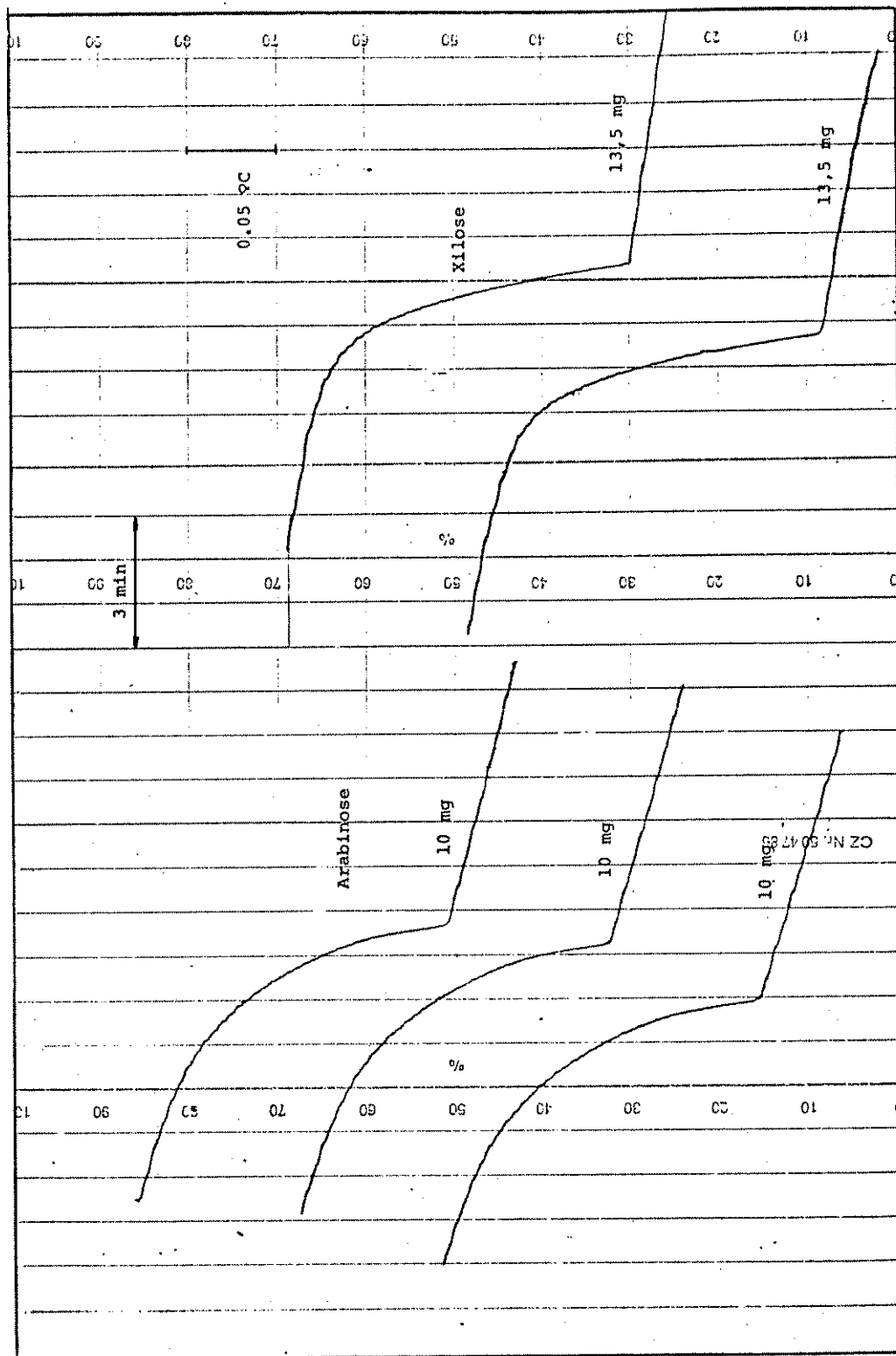


Figure 4.5. - Entalpogramas obtidos na oxidação de diferentes quantidades de arabinose e xilose.

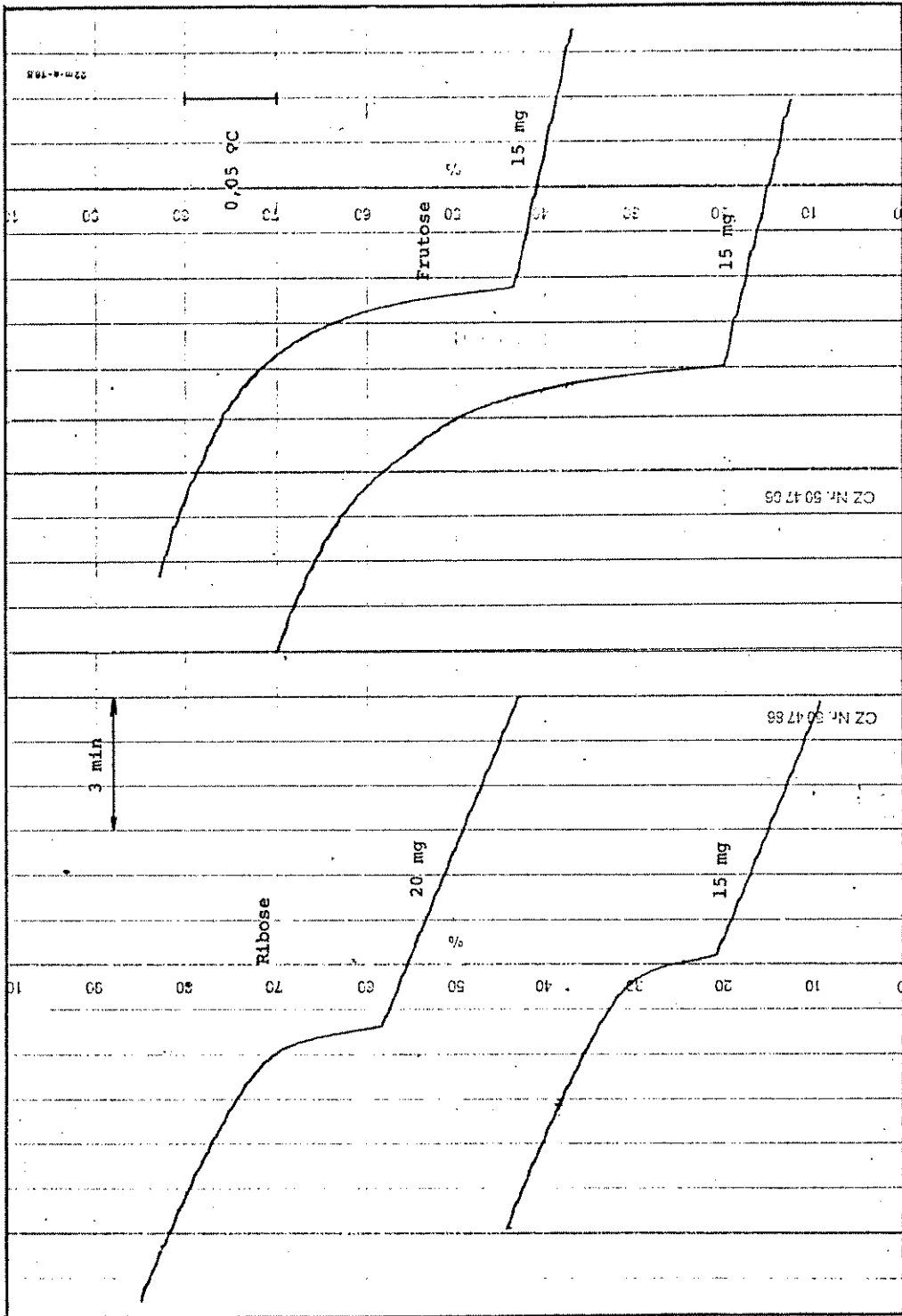


Figura 4.6. - Entalpiogramas obtidos na oxidação de diferentes quantidades de ribose e frutose.

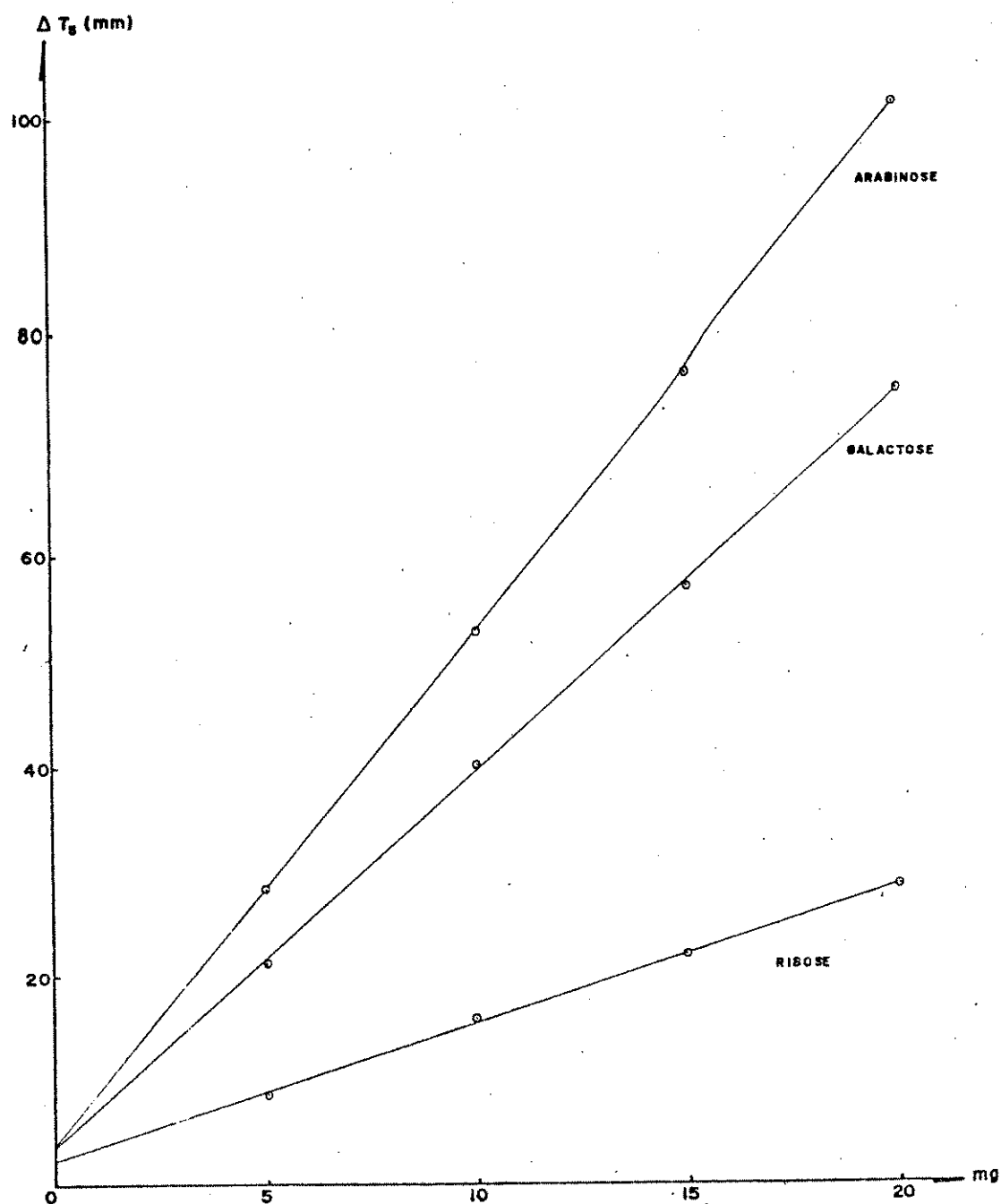


Figura 4.7 - Curvas de calibração de ribose, galactose e arabinose. O sinal entalpimétrico foi medido após 5 minutos de reação.

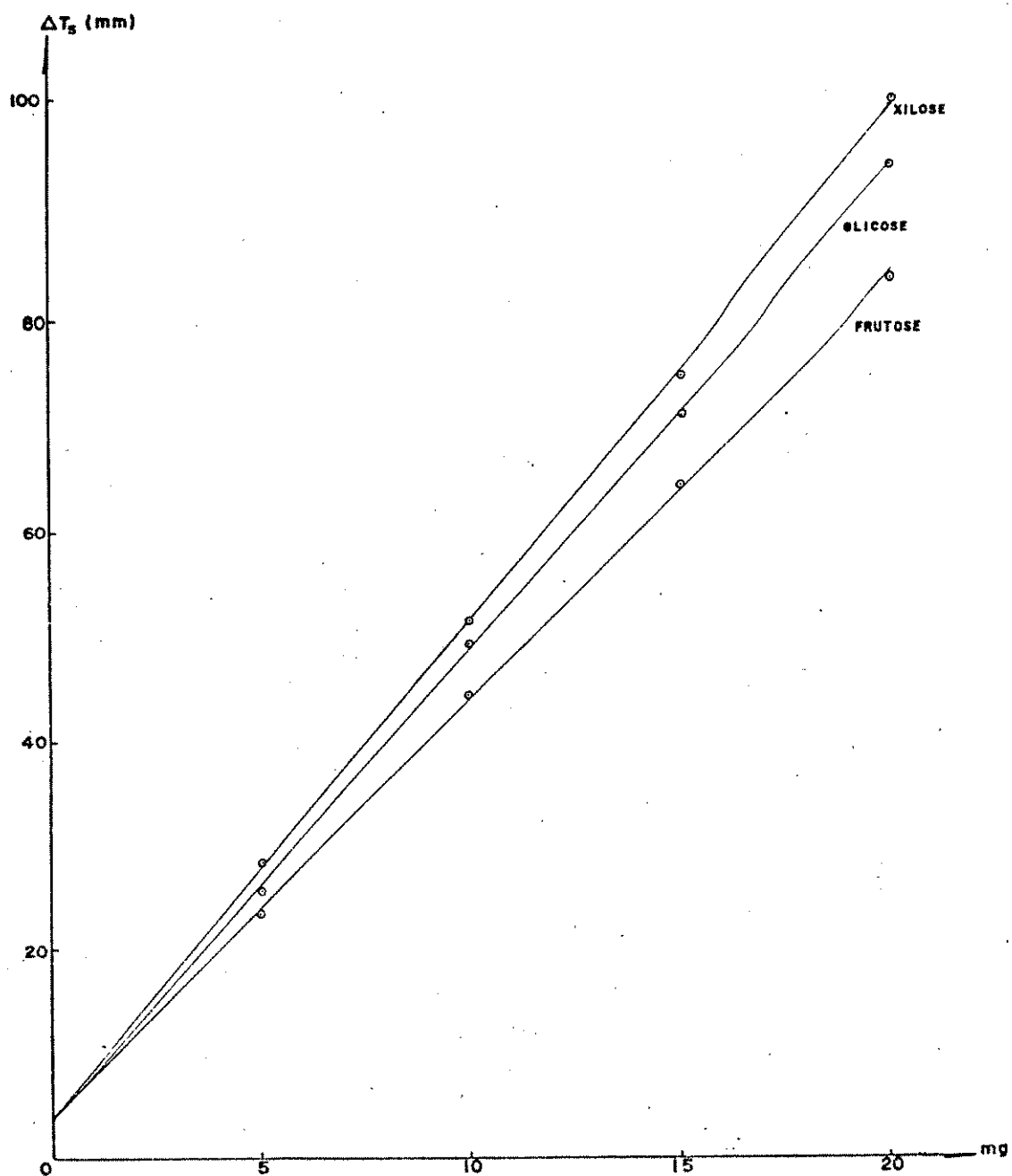


Figura 4.8 - Curvas de calibração de frutose, glicose e xilose. O sinal entalpimétrico foi medido após 5 minutos de reação.

4.4. Determinação simultânea de glicose e de frutose

A análise de misturas de glicose e frutose, visando a determinação de cada um dos açúcares individualmente, apresenta grande interesse por serem de ocorrência generalizada na natureza. Por outro lado, conforme será posteriormente discutido no capítulo 5, produtos industriais obtidos no processamento industrial da cana-de-açúcar são analisados quanto a seus teores de açúcares totais e podem eventualmente requerer a determinação de glicose e frutose distintamente.

Um dos meios de se efetuar a determinação simultânea desses açúcares é através da análise cinética (73). Os métodos cinéticos são afetados por diversos fatores como tempo de análise, composição da mistura e relação entre constantes de velocidade. Ambos os componentes da mistura a se analisar devem reagir com um mesmo composto à velocidades apreciavelmente diferentes (74) e sua aplicação ao presente estudo não dispensa esse requisito.

Examinando-se os dados apresentados na tabela 3.2. verifica-se que a maior diferença entre as constantes de velocidade da oxidação de glicose e de frutose pelo íon periodato ocorre em pH 5.2. Desta forma, procurou-se avaliar a potencialidade da aplicação da análise cinética às determinações de glicose e de frutose em determinações entalpimétricas por injeção direta.

Os cálculos foram efetuados por dois métodos (74): um deles usando a medida de variação de temperatura efetuada após um determinado tempo de reação (método de ponto único) e outro no qual são efetuadas duas medidas de variação de temperatura correspondentes a intervalos pré-fixados (método de dois pontos).

4.4.1. Aspectos teóricos

O tratamento descrito a seguir baseia-se nos trabalhos de *Garmon e Reilley* (75) e de *Lee e Kolthoff* (74).

Admita-se que na oxidação de uma mistura de glicose e frutose pelo íon periodato possa ser aplicada a equação 3.5 à reação de cada açúcar, adotando-se as mesmas convenções e justificativas apresentadas no item 3.1. Desta forma tem-se :

$$(G)_r = (G)_o (1 - e^{-k_G t}) \quad (4.1)$$

$$(F)_r = (F)_o (1 - e^{-k_F t}) \quad (4.2)$$

onde "G" e "F" representam glicose e frutose respectivamente.

Em termos de variação de temperatura as equações 4.1 e 4.2 podem ser expressas como as que se seguem:

$$\Delta T_G = k' (G)_o (1 - e^{-k_G t}) \quad (4.3)$$

$$\Delta T_F = k' (F)_o (1 - e^{-k_F t}) \quad (4.4)$$

nas quais k' representa uma constante de proporcionalidade.

O efeito térmico total " ΔT_t ", verificado num dado instante pode ser expresso pela soma dos efeitos térmicos verificados na oxidação de cada açúcar isto é, pela soma algébrica das equações 4.3 e 4.4. Portanto tem-se :

$$\Delta T_t = k' (G)_o (1 - e^{-k_G t}) + k' (F)_o (1 - e^{-k_F t}) \quad (4.5)$$

Conforme citado anteriormente, dois são os processos de cálculo e que a seguir serão considerados separadamente.

A - Método de ponto único

Neste caso, representando-se a concentração de açúcares totais, ou seja glicose mais frutose, por (S) e dividindo os membros da equação 4.5 por esse parâmetro obtém-se:

$$\frac{\Delta T_t}{(s)} = k' (1 - e^{-k_G t}) \frac{(G)_0}{(s)} + k' (1 - e^{-k_F t}) \frac{(F)_0}{(s)} \quad (4.6)$$

Indicando as frações molares de glicose e frutose por " X_G " e " X_F " respectivamente, substituindo na equação (4.6) os termos que lhes correspondem e rearranjando-a resulta que:

$$\frac{\Delta T_t}{(s)} = k' (1 - e^{-k_G t}) + \left[k' (1 - e^{-k_F t}) - k' (1 - e^{-k_G t}) \right] X_F \quad (4.7)$$

ou simplesmente :

$$\frac{\Delta T_t}{(s)} = A + B X_F \quad (4.8)$$

Conclue-se pelo exame da equação 4.8 que o efeito térmico obtido na oxidação de uma mistura de glicose e frutose, dividido pela concentração de açúcares totais da mesma pode ser expresso como função linear da fração molar de frutose. O efeito térmico total deve ser medido um intervalo de tempo "t" apropriado e que pode ser calculado pela equação abaixo de Lee e Kolthoff (74):

$$t = \frac{\ln k_G/k_F}{k_G - k_F} \quad (4.9)$$

B - Método de dois pontos

Retomando a equação 4.5 pode-se efetuar no entalpiograma obtido, medidas de variação de temperatura em

dois intervalos de tempo distintos, ambos contados a partir do início da reação. Designando esses intervalos por "m" e "n" e englobando os termos que permanecem invariáveis uma única constante "K" obtém-se o seguinte sistema de equações:

$$\Delta T_m = K_{Gm} (G)_o + K_{Fm} (F)_o \quad (4.10)$$

$$\Delta T_n = K_{Gn} (G)_o + K_{Fn} (F)_o \quad (4.11)$$

no qual, desde que se obtenha previamente as quatro constantes "K", as únicas incógnitas são as concentrações de glicose e frutose na mistura. As constantes "K" são obtidas medindo-se a variação de temperatura em entalpogramas de soluções puras de cada açúcar em intervalos de tempo "m" e "n". São empregadas para essa finalidade as equações 4.10 e 4.11.

4.4.2 Procedimento

A marcha analítica adotada nesse estudo é similar à descrita no item 4.3.1. Substituiu-se o tampão pH 7,2 pelo tampão pH 5,2 e empregou-se uma solução de periodato de sódio a 5% como oxidante, pois foi a que produziu menor efeito térmico de diluição. Foram analisadas soluções puras de glicose e frutose além de misturas destes açúcares, perfazendo sempre 15 mg de açúcares totais.

4.4.3 Resultados obtidos

A - Método de ponto único

Substituindo-se na equação 4.9 as constantes de velocidade de glicose e de frutose em pH 5,2, apresentadas na tabela 3.2, observa-se que o tempo ótimo para medida do sinal nos entalpogramas obtidos é de 70 segundos aproximadamente.

Por facilidade, foram efetuadas medidas após 1 minuto de reação; os valores de ΔT_1 , medidos em mm, tanto para as soluções puras como para as misturas são apresentadas na tabela 4.3 como média de três repetições.

Os valores de ΔT_1 para a solução de glicose ($X_F = 0$) e para solução de frutose ($X_F = 1$) possibilitaram o cálculo das constantes "A" e "B" da equação 4.8 e assim foi possível calcular as frações molares de frutose nas misturas dos açúcares, mostradas na tabela 4.3.

Desta forma, verifica-se que tendo conhecimento prévio do teor de açúcares totais numa mistura de glicose e frutose, pode-se determinar os teores de cada um dos açúcares. A determinação dos açúcares totais pode ser efetuada por um método analítico, entalpmétrico ou não, em separado.

Uma vez de posse do teor de açúcares totais e da fração molar de frutose na mistura torna-se imediato o cálculo da concentração de cada um dos açúcares.

TABELA 4.3 - Determinação simultânea de glicose e de frutose em misturas pelo método de ponto único.

Massa de açúcares na mistura (mg)		ΔT_1 (mm)	X_F	X_F calculado
Glicose	Frutose			
0	15	45,9	1,00	-
15	0	16,0	0,00	-
7,5	7,5	31,0	0,50	0,50
9,0	6,0	28,8	0,40	0,43
6,0	9,0	34,0	0,60	0,60

B - Método de dois pontos

Nos entalpogramas obtidos na oxidação de soluções puras de glicose e frutose, bem como nas misturas destas, foram efetuadas medidas após 3 e 5 minutos de reação. Com as equações 4.10 e 4.11 foram inicialmente obtidas as constantes "K"; em seguida calculou-se as concentrações de glicose e frutose, empregando as mesmas equações citadas.

Na tabela 4.4 são apresentados os valores de variação de temperatura e os teores calculados dos açúcares como média de três repetições.

TABELA 4.4. Determinação simultânea de glicose e de frutose em misturas pelo método de dois pontos.

Massas dos açúcares presentes na mistura (mg)		ΔT_3 (mm)	ΔT_5 (mm)	Massas calculadas dos açúcares (mg)	
Glicose	Frutose			Glicose	Frutose
0	15	53,3	53,3	-	-
15	0	25,7	32,4	-	-
7,5	7,5	39,4	42,2	6,2	8,1
9,0	6,0	36,3	39,3	7,3	6,7
6,0	9,0	41,0	42,8	4,0	9,6

4.5 Discussão

A técnica e o sistema de análise entalpimétrica propostos mostraram que é possível determinar-se monossacarídeos através de marcha analítica simples, rápida e precisa, baseada no efeito térmico da oxidação desses compostos pelo íon periodato. Deve ser ressaltada especialmente a simplicidade da instrumentação adotada que, exceção feita ao termistor, pode ser constituída por equipamentos acessíveis, de fabricação

nacional ou mesmo construídos pelo próprio analista, como a ponte de Wheatstone. De fato, uma ponte elaborada com componentes comumente encontráveis no comércio forneceu resultados idênticos àqueles obtidos com o aparelho descrito no item 2.1, usado neste trabalho.

O emprego da espiral de polietileno para igualar as temperaturas das soluções reagentes possibilitou contornar com sucesso uma das desvantagens da análise entalpimétrica, qual seja a necessidade de que essas soluções permaneçam algumas horas no mesmo ambiente para atingirem temperaturas semelhantes no momento da determinação. Análises de rotina tornam-se viáveis com o dispositivo preconizado no presente trabalho.

Conforme citado anteriormente não se utilizou a reação de oxidação em toda sua extensão; isso entretanto não constitui obstáculo nas determinações efetuadas. Pelo exame dos entalpogramas mostrados nas figuras 4.6 a 4.8 vê-se que para a maior parte dos açúcares a elevação de temperatura após alguns minutos de reação é lenta; a velocidade do papel do registrador empregada permitiu a obtenção de sinais similares aos que seriam obtidos numa reação rápida. Os entalpogramas da galactose foram os que mais se afastaram desse comportamento, bastante evidente para os demais açúcares estudados, principalmente na ribose.

A pequena magnitude dos sinais obtidos para a ribose parecem refletir o efeito de arranjo estérico dos grupos OH em sua molécula conforme foi discutido no item 1.3.2. Digna de menção é a semelhança de comportamento da arabinose e da xilose, que produziram sinais de magnitude praticamente idêntica.

Os dados das tabelas 4.1 e 4.2 evidenciam a boa precisão obtida no estudo com soluções puras, justificando a aplicação da marcha analítica proposta na análise de carboidratos. A reprodutibilidade das medidas apresentadas na tabela 4.1 é de 1,5 % e o erro relativo mostrado na tabela 4.2 é em média 0,9 %. A mesma precisão é relatada por *Bark e Prachabaipul* (29) para seu método termométrico de determinação de carboidratos isolados. Entretanto, a metodologia desenvolvida no presente trabalho é mais simples e mais rápida.

Com relação à determinação simultânea de glicose e frutose, quando se empregou o método de dois pontos as medidas foram efetuadas em diversos intervalos de tempo de reação, sendo que os resultados mais favoráveis foram aqueles referentes a 3 e 5 minutos. Entretanto, a exatidão obtida foi inferior àquela referente ao método de ponto único. Neste último, o procedimento analítico envolve a determinação conjunta do teor de açúcares totais; isso entretanto, não representa maior problema pois as opções para se efetuar a determinação de glicose e de frutose em misturas desses açúcares são morosas e complicadas.

Ressalte-se contudo, que a aplicação de métodos cinéticos em conjunto com a entalpiometria de injeção direta exige um maior número de resultados experimentais e sua abordagem no presente estudo constitui apenas uma verificação das possibilidades das análises entalpimétricas.

5. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM PRODUTOS DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR.

Um dos objetivos do presente trabalho foi estabelecer um método de determinação de açúcares totais em caldo de cana e produtos de sua concentração, principalmente quando tais materiais se destinam à fabricação de álcool etílico.

A determinação de açúcares totais é de especial interesse no controle da matéria prima para fabricação de álcool. Como os açúcares que predominam na cana são a sacarose, glicose e frutose, a análise de açúcares totais se resume portanto na determinação conjunta de glicose e frutose após a inversão da sacarose.

Desta forma, analisou-se o teor de açúcares to-

tais em caldo de cana e melaço por entalpimetria de injeção direta, segundo a marcha analítica elaborada a partir dos estudos descritos anteriormente, comparando os resultados com aqueles obtidos pelo método volumétrico de Lane-Eynon conforme o procedimento descrito pela AOAC (66).

5.1 Determinações entalpimétricas

5.1.1. Curva de calibração

A curva de calibração usada no cálculo das concentrações de açúcar pelo método entalpimétrico foi obtida com solução padrão de invertidos, isto é solução contendo quantidades equivalentes de glicose e frutose. O emprego dessa solução pode ser justificado pois após a inversão da sacarose as quantidades de glicose e frutose nos produtos a analisar são bastante próximas, principalmente em caldo de cana.

Assim sendo, foram transferidas para o frasco de Dewar, alíquotas variáveis de solução de açúcares invertidos contendo 5 mg/ml, cujo preparo foi descrito no item 2.2. até uma quantidade máxima de 20 mg de açúcares. Procedeu-se em seguida de maneira idêntica à descrita no item 4.3.1.

5.1.2. Análise de açúcares totais em caldo de cana.

Diluiu-se 10 ml de caldo de cana bruto, livre de impurezas grosseiras a 100 ml com água destilada, em balão volumétrico. Filtrou-se em seguida através de papel faixa azul obtendo-se uma solução límpida. Transferiu-se 25 ml do filtrado para balão de 100 ml, juntou-se 5 ml de ácido clorídrico aproximadamente 6 M e deixou-se em repouso por 24 horas para a inversão da sacarose, tempo considerado como suficiente se a temperatura ambiente estiver entre 20 e 25 °C (66). Após esse período, neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio a 20% no início e a 5% no final, usando fenolftaleína como in-

dicador.

Transferiu-se 2 ml de solução de amostra invertida para o frasco de Dewar, juntou-se 3 ml de água destilada e procedeu-se como no ítem 4.3.1. Mediu-se o sinal após 5 minutos de reação e calculou-se a percentagem de açúcares totais usando a curva de calibração obtida em 5.1.1.-

5.1.3. Análise do melaço

Foram pesados 8,00 g de melaço, diluídos e transferidos para balão de 250 ml. Juntou-se em seguida 3 ml de solução a 10 % de acetato de chumbo, agitou-se e após alguns minutos adicionou-se 2 ml de solução de Cook-Mc Allep. O volume foi completado e a solução filtrada em papel Whatman nº 1 ou equivalente, desprezando-se as primeiras porções do filtrado.

Tomou-se então 25 ml de solução clarificada e filtrada, transferindo-os para balão de 100 ml; juntou-se 5 ml de solução de HCl aproximadamente 6 M e procedeu-se conforme descrito no ítem 5.1.2.

5.2. Análise de açúcares totais pelo método volumétrico de Lane-Eynon.

O procedimento adotado foi o descrito pelo manual da AOAC (66), exceto que no caso do melaço efetuou-se a clarificação com solução de chumbo, tratamento este não previsto no referido procedimento.

Tanto o método entalpimétrico como o volumétrico foram padronizados com a mesma solução padrão de invertidos e as determinações foram efetuadas pelos dois métodos nas mesmas soluções de amostra.

5.3. Resultados obtidos

5.3.1. Curvas de calibração

Nos entalpogramas correspondentes às oxidações de diferentes quantidades de açúcares invertidos foram feitas medidas de sinal em diferentes intervalos de tempo. Conforme pode ser observado na tabela 5.1., boa precisão é conseguida em medidas efetuadas após 2 minutos de reação. Precisoões ligeiramente superiores foram obtidas medindo-se o sinal entalpimétrico após 5 minutos de reação; após esse intervalo de tempo a magnitude do sinal tende a permanecer constante.

Conclui-se que, embora medidas mais precisas sejam obtidas após 5 minutos de reação, resultados bastante satisfatórios são conseguidos num intervalo de tempo menor, o que deve ser levado em consideração se um grande número de determinações deve ser feito.

Quanto à linearidade nota-se que para intervalos de tempo inferiores a 5 minutos obtém-se uma perfeita relação linear com coeficiente de correlação maior que 99,8% , para teores de invertidos de até 20 mg; se a medida do sinal entalpimétrico é efetuada com tempo de reação superior a 5 minutos se observa um ligeiro desvio da linearidade para quantidades de açúcares invertidos superiores a 15 mg. A figura 5.1 ilustra esses efeitos.

Ressalte-se ainda que o coeficiente linear das equações de regressão, que representam matematicamente as curvas de calibração, embora de pequena magnitude podem ser obserdos, conforme se verifica na figura 5.1. Provavelmente são resultantes do efeito térmico de diluição da solução oxidante de periodato, que se manifesta devido a variações no preparo de dessa solução. Isso não prejudica as determinações pois as medidas são relacionadas sempre com uma curva de calibração , que deve ser refeita sempre que uma nova solução de periodato é preparada.

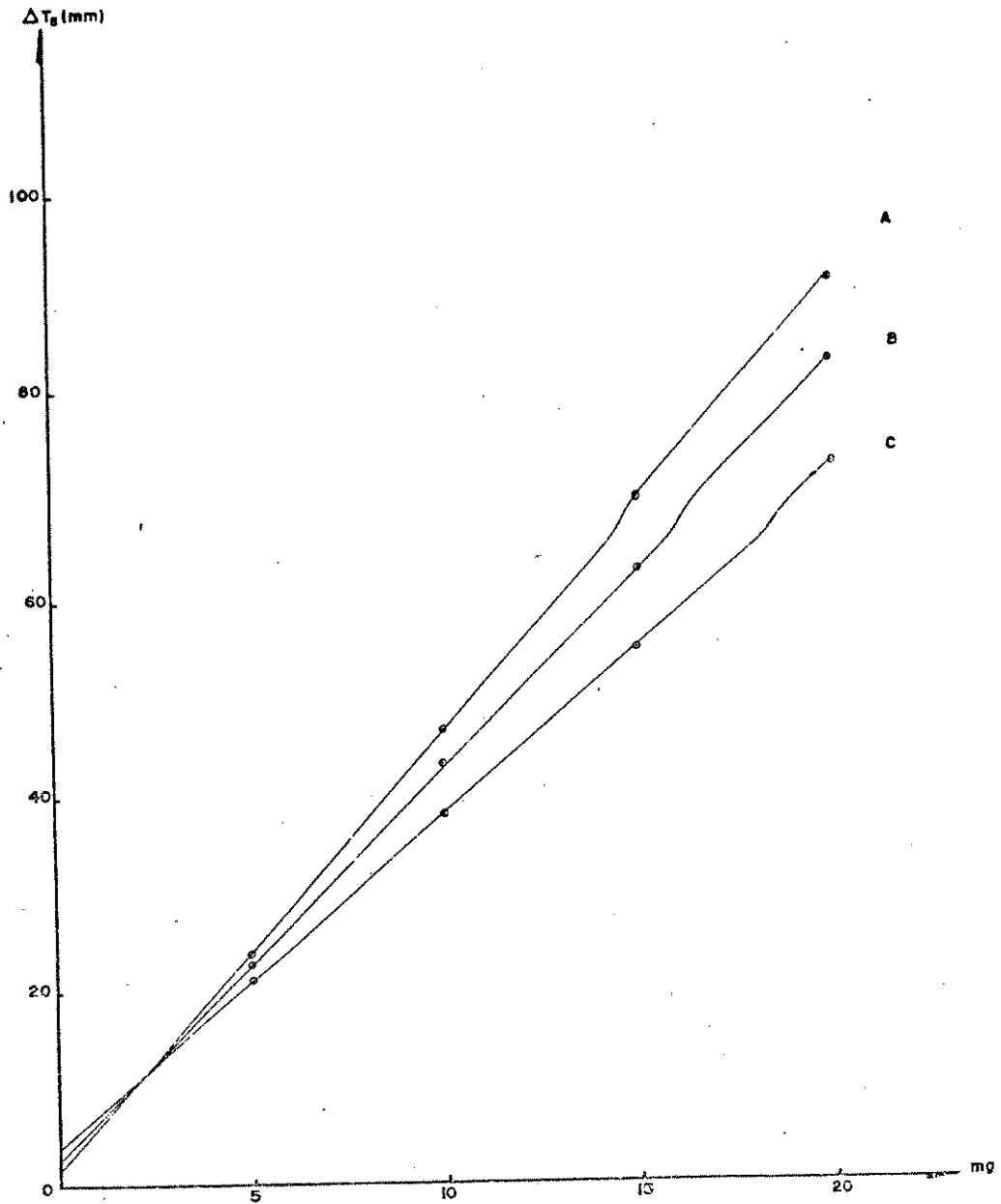


FIGURA 5.1 - Curvas de calibração para açúcares inver_utidos referentes a medidas do sinal ental_upimétrico após 5 minutos (A), 3 minutos (B) e 2 minutos (C) de reação.

TABELA 5.1. Variação de temperatura da reação de oxidação de açúcares invertidos após intervalos variáveis de tempo. Média de três repetições.

Tempo de reação (min)	Quantidades de açúcares invertidos (mg)			
	5	10	15	20
2	20,1 ± 0,3	38,0 ± 0,3	55,0 ± 0,6	72,4 ± 0,2
3	22,6 ± 0,2	43,1 ± 0,3	63,2 ± 0,3	82,9 ± 0,1
5	24,0 ± 0,0	46,6 ± 0,4	69,3 ± 0,2	90,8 ± 0,2
6	24,3 ± 0,1	47,0 ± 0,6	70,3 ± 0,4	92,2 ± 0,2

5.3.2. Análise de melaço

Observa-se pelos dados da tabela 5.2, que o método entalpimétrico, quando aplicado à determinação de açúcares totais em melaço, forneceu em média resultados 2% superiores aos obtidos pelo método de Lane-Eynon. Podem ser invocadas várias hipóteses para explicar tal discrepância. A mais provável é que como o melaço resulta de uma série de operações efetuadas sobre o caldo de cana como acidificação com SO_2 , alcalinização com leite de cal e aquecimento, a sacarose e demais substâncias se degradam produzindo inúmeras outras que podem reagir com o íon periodato mas não com o íon cúprico. A clarificação com acetato de chumbo removeria apenas parcialmente essas substâncias interferentes; de fato, quando se omitiu esse tratamento na análise de amostra I o erro constatado foi de + 8,3%. - Por outro lado os resultados obtidos para o caldo de cana parecem comprovar a hipótese levantada anteriormente. A figura 5.2 mostra um entalpograma típico obtido para uma amostra de melaço.

TABELA 5.2 - Teores de açúcares totais (AT) em melão de diferentes origens, determinados pelos métodos entalpimétrico e de Lane-Eynon.

amostra (origem)	"% A T" por entalpimetria*	"% A T" por Lane-Eynon*	Erro Relativo (%)
I -Usina Furlan, SP.	59,82 ± 0,20	58,46 ± 0,06	+ 2,3
II -Usina Tamoio, SP.	68,97 ± 0,60	68,51 ± 0,10	+ 0,6
III -Usina N.S. Aparecida, SP	67,73 ± 0,18	65,22 ± 0,09	+ 3,8
IV -Usina Da Barra, SP.	66,96 ± 0,21	66,47 ± 0,13	+ 0,7
V -Usina Tamoio, SP .	70,34 ± 0,28	68,68 ± 0,10	+ 2,4

* porcentagem expressa em gramas de açúcares por 100 g de melão.

5.3.3. Análise de caldo de cana

Foram analisados caldos provenientes de diversas variedades em diferentes estágios de maturação. Os resultados são mostrados na tabela 5.3. como média de quatro repetições. Um entalpograma típico obtido para uma amostra de caldo é apresentado na figura 5.2.

Para o caldo de cana não foi efetuada clarificação prévia pois os mesmos resultados eram obtidos por ambos os métodos quer ela fosse feita ou não.

A análise de açúcares totais em caldo de cana - por entalpimetria de injeção direta apresentou resultados bastante concordantes com o método de referência e com precisão excelente. Tal ocorre provavelmente porque no caldo os mesmos - constituintes reagem igualmente com íons periodato e íons cúpricos.

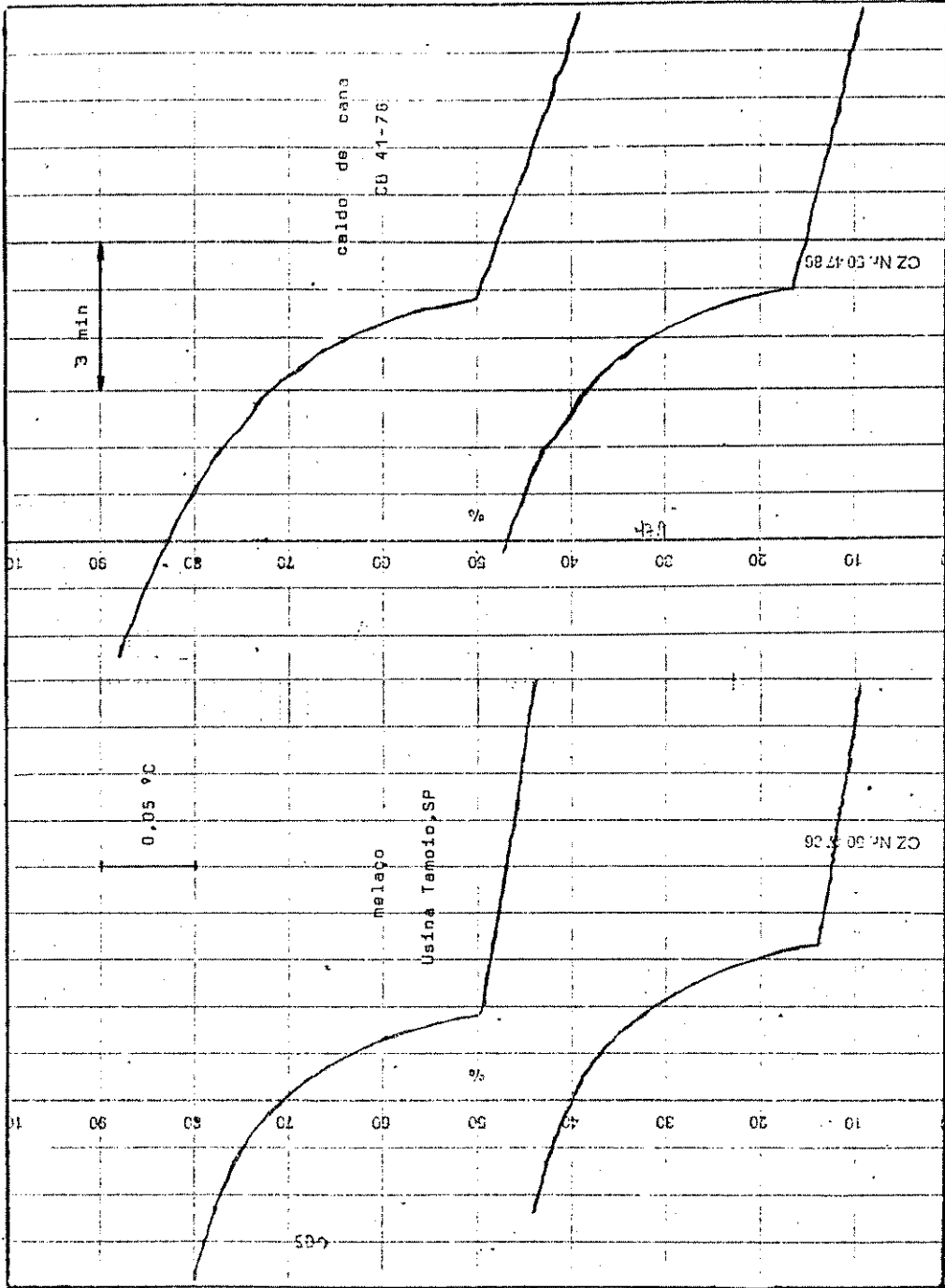


Figura 5.2. - Entalpiogramas típicos para amostras de caldo de cana e melago, em duas repetições.

TABELA 5.3 - Teores de açúcares totais (AT) em caldo de cana determinados pelos métodos entalpimétrico e de Lane-Eynon.

amostra (variedade)	"% A T " por entalpimetria*	"% A T " por Lane-Eynon *	Erro Relativo (%)
CB 47-355	21,16 ± 0,16	20,84 ± 0,03	+ 1,5
NA 56-79	22,18 ± 0,10	22,04 ± 0,03	+ 0,6
CB 41-76	20,60 ± 0,06	20,42 ± 0,04	+ 0,8
IAC 51-205	19,28 ± 0,05	19,43 ± 0,06	- 0,7
IAC 51-205	20,95 ± 0,10	20,95 ± 0,00	0,0

* porcentagem expressa em gramas de açúcares por 100 ml de caldo .

5.4 Considerações Gerais

Os dados experimentais apresentados nas tabelas 5.2 e 5.3 foram submetidos ao teste não paramétrico de *Wilcoxon* (76), o qual indicou não haver diferença significativa entre os resultados fornecidos pelos dois métodos de determinação de açúcares totais.

Desta forma, o método entalpimétrico proposto pode ser aplicado na análise de caldo de cana e de melaço, apresentando as seguintes vantagens:

- é eliminada a influência do operador, fonte de erro quando se emprega o método de Lane-Eynon pois a viragem pode ser difícil de ser detectada,

- o método é extremamente simples e não exige análise prévia de amostra para se conhecer o teor aproximado de açúcares totais,

- as determinações podem ser efetuadas rapida-

mente; estabelecendo-se o tempo de reação em 2 minutos, registra-se a linha básica por igual intervalo de tempo podendo-se assim completar uma determinação em menos de 5 minutos,

- a instrumentação empregada é simples; os componentes do sistema entalpimétrico são comumente encontrados na maioria dos laboratórios. A ponte de Wheatstone pode ser facilmente construída com componentes de baixo custo.

Pode ser sugerido o estudo da aplicação do método entalpimétrico na determinação de açúcares redutores, ou seja: glicose e frutose, na presença de sacarose. Embora esta última consuma uma pequena quantidade de íon periodato esse efeito pode ser eliminado preparando-se curvas de calibração em presença de teores de sacarose similares às das amostras a analisar.

6. RESUMO

Estudou-se no presente trabalho a aplicação da Entalpimetria de Injeção Direta na determinação de monossacarídeos em soluções puras e em produtos industriais obtidos a partir da cana-de-açúcar.

Dada a importância que atualmente se atribui à fabricação de etanol a partir de materiais açucarados por via fermentativa e às características favoráveis dos métodos entalpimétricos de análise, procurou-se estabelecer uma metodologia analítica rápida, precisa e simples para determinação de monossacarídeos.

A reação dos compostos em estudo com o íon periodato, agente oxidante escolhido, foi estudada do ponto de

vista cinético, visando escolher a faixa de pH que proporcionasse um sinal de magnitude conveniente e na qual a reação se processasse com maior velocidade. Verificou-se que em pH ao redor de 7,0 tais exigências eram melhor atendidas.

Elaborou-se um sistema de análise entalpimétrica, cuidando da adaptação de dispositivos e meios que proporcionassem uma marcha analítica mais rápida e simples.

Os resultados obtidos com soluções puras de diversos monossacarídeos-glicose, frutose, xilose, galactose, arabinose e ribose- evidenciaram que o método proposto e a instrumentação empregada forneceram precisão da ordem de 1,5%, empregando-se um sinal de variação de temperatura correspondente aos estágios iniciais da reação com o íon periodato. Relações lineares foram obtidas entre sinal entalpimétrico e concentração dos açúcares. A técnica entalpimétrica pode ser aplicada na determinação simultânea de glicose e frutose em misturas desses açúcares, empregando-se métodos cinéticos.

A aplicação da metodologia proposta na análise de materiais como caldo de cana e melaço se revelou viável, sendo feitas comparações com o método de Lane-Eynon. Os resultados referentes a determinação de açúcares totais em caldo de cana mostraram concordância entre o método entalpimétrico e o método de referência. Para as determinações em melaço, os resultados obtidos pelo método entalpimétrico foram superiores àqueles obtidos pelo método de Lane-Eynon, indicando provavelmente efeito de substâncias interferentes não removidas.

7. SUMMARY

The application of Direct Injection Entharpimetry was studied for the determination of monosaccharides in pure solutions and products of sugarcane processing.

Due to the major role of ethanol production from sweetened materials by fermentative method and because of the advantages of entahalpimetric determinations one searched a precise, rapid and simple analytical methodology.

The reaction of sugars with periodate, the reagent chosen, was subjected to kinetics studies in order to find the pH range where the magnitude of the entalpimetric signal - and rate of reaction were more favourable. It was stated that when the pH was about 7,0 those purposes were reached.

An enthalpimetric system of analysis was idealized aiming at the optimization of its performance. So a fast and simple analytical procedure could be set up.

Data obtained with pure solutions of several monosaccharides-glucose, fructose, ribose, galactose and xylose- showed that the proposed methodology and apparatus are able to give precision of about 1,5%. The signal due to temperature rise is related to the first stages of periodate oxidation and it was found a good linear correlation between sugar concentration and signal. Simultaneous determination of glucose and fructose in mixtures of these sugars is also possible by the use of a slightly modified procedure.

Total sugar analyses in cane juice and molasses were compared with the Lane-Eynon method. Data from juice analyses showed a good agreement between the proposed and the reference method. Concerning molasses, the sugar contents obtained from entalpimetric method were 2% greater than those from the Lane-Eynon method indicating probably some interference of substances not removed during sample preparation.

8. LITERATURA CITADA

1. R.D.GUTRIE & J.HONEYMAN. An Introduction to the chemistry of carbohydrates, Clarendon Press, Oxford, 1968, 144p.
2. J.STANECK; M.CERNY; J.KOCOUREK; J.PACAK. The Monosaccharides, Academic Press, New York, 1963, 1006 p.
3. R.J. MC ILROY. Introduction to Carbohydrate chemistry , Butterworths, London, 1967, 133 p.
4. R.T. MORRISON & R.N. BOYD. Organic chemistry, Allyn and Bacon, Boston, 1976, 1258 p.
5. E.A. DAVIDSON. Carbohydrate chemistry, Holt, Rinehart -

- and Winston Inc., 1967, 441 p.
6. J.R. COLLINS, *Anal. Chim. Acta*, 9 (1953) 500.
 7. G.L. MILLER & A.L. BURTON, *Anal. Chem.*, 31 (1959) - 1790.
 8. T. TANIMOTO & G.O. BURR, *The Hawaiian Planters' Record*, 57 (1964) 151.
 9. A.A. FORIST & J.C. SPECK, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1166.
 10. N.N. SHARMA, *Anal. Chim. Acta*, 14 (1956) 423.
 11. A.M. MATTSON & C.O. JENSEN, *Anal. Chem.*, 22 (1950) 182.
 12. W. THOMAS & R.A. DUTCHER, *J. Am. Chem. Soc.*, 46 (1924) - 1662.
 13. R.T. BOTTLER & G.A. GILBERT, *Analyst*, 83 (1958) 403.
 14. I.H. BATH, *Analyst*, 83 (1958) 451.
 15. B. KLEIN & M. WEISSMAN, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 771.
 16. E.E. MORSE, *Anal. Chem.*, 19 (1947) 1012.
 17. M. DUBOIS; K.A. GILLES; J.K. HAMILTON; P.A. REBERS; F. SMITH, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350.
 18. V.L. FRAMPTON; L.P. FOLEY; L.L. SMITH; J.G. MALONE, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1244.
 19. P.S. SKELL & J.G. CRIST, *Nature*, 173 (1954) 401.
 20. P. DEVILLERS; R. DETAVERNIER; J. ROGER, *Sucrierie Française*, (1975) 229.

21. G.G. GUILBAUT, Enzimatic Methods of Analysis, Pergamon Press, Oxford, 1973, 347 p.
22. P. HONIG, Principios de Tecnologia Azucarera, Continental, Mexico, 1969.
23. J.H. LANE & L. EYNON, Determination of Reducing Sugars - by Feehling Solution with Methilene Blue Indicator, - Norman Rodger, London, 1934, 9 p.
24. L.S. MUNSON & P.H. WALKER, J. Am. Chem. Soc., 28 (1906) 663.
25. M. SOMOGYI, J. Biol. Chem., 160 (1945) 61.
26. E.L. HIRST & J.K.N. JONES, J. Chem, Soc., (1949) 1659.
27. R. QUICK, Anal. Chem., 29 (1957) 1439.
28. G. NISLI & A. TOWNSHEND, Talanta, 15 (1968) 1377.
29. L.S. BARK & P. PRACHUABPAIBUL, Anal. Chim. Acta, 72 - (1974) 196.
30. E.KRAUSE; F. TODT; W. MAUCH, I.S.S.C.T. , 16, São Paulo , 1977 Proceedings.
31. L. MALAPRADE, Comp. Rend., 186 (1928) 384.
32. P. FLEURY & J. LANGE, Comp. Rend., 195 (1932) 1395.
33. P. KARRER & K. PFAEHLER, Helv. Chim. Acta, 17 (1934) 766.
34. J. CRISTENSEN, The Mecanism of Periodate Oxidation of - Simple Sugars, Tese de Doutoramento, Michigan Sate - University, 1956, 100 p.
35. G. HUGHES & T.P. NEVELL, Trans. Far. Soc., 44 (1948) 941.

36. J.C. SPECK JR. & A.A. FORIST, *Anal. Chem.*, 26 (1954) - 1942.
37. P.F. FLEURY; J.E. COURTOIS; A. BIEDER, *Bull. Soc. Chim. France*, (1952) 118.
38. D. J. BELL; A. PALMER; A.T. JOHNS, *J. Chem. Soc.*, (1949) - 1536.
39. G.D. GREVILLE & D.H. NORTHCOTE, *J. Chem. Soc.*, (1952) - 1945.
40. R.W. KERR & F.C. CLEVELAND, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 4036.
41. F.S.H. HEAD & H.A. STANDING, *J. Chem. Soc.*, (1952) 1437.
42. F.S.H. HEAD & G. HUGHES, *J. Chem. Soc.*, (1952) 2046.
43. J.E. TAYLOR; D. SOLDANO; G.A. HALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 2656.
44. G.J. BUIST & J. BUNTON, *J. Chem. Soc.*, (1954) 1046.
45. C.F. HUBNER, S.R. AMES; E.C. BUBL, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 1621.
46. C.C. PRICE & M. KNELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) - 552.
47. J.N. PRATT; N.K. RICHTMYER; C.S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2200.
48. J. HONEYMAN & J. G. SHAW, *J. Chem. Soc.*, (1959) 2451.
49. G.R. BARKER & D.F. SHAW, *J. Chem. Soc.*, (1959) 584.
50. S.A. WARSI & W.J. WHELAN, *Chem. & Ind.*, (1958) 71.

51. F.S.H. HEAD, Chem. & Ind., (1958) 360.
52. L. HOUGH; T.J. TAYLOR; G.H.S. THOMAS; B.M. WOODS, J. Chem. Soc., (1958) 1212.
53. S.J. ANGYAL & J.E. KLAVINS, Australian J. Chem., 14 - (1961) 577.
54. Y. KHOUVINE & G. ARAGON; Comp. Rend., 212 (1941) 167.
55. J. JORDAN; J.K. GRIME; D.H. WAUGH; C.D. MILLER; H.M. - CULLIS; D. LOHR, Anal. Chem., 48 (1976) 427.
56. W.A. DE OLIVEIRA, Química Nova, 1 (1978) 5.
57. H.V. MALMSTAD & C.G. ENKE, Eletronic for Scientists, W. A. Benjamin, New York, 1969.
58. W.A. DE OLIVEIRA, Rev. Sci. Instrum., 48 (1977) 1278.
59. M.F. FERENGE JR; H.B. LEMON; R.J. STEPHENSON, Curso de Física - Calor, Editora Edgard Blucher - Editora da Universidade de São Paulo, 155 p.
60. P.T. PRIESTLEY; W.S. SEBBORN; R.F.W. SELMAN, Analyst, 90 (1965) 589.
61. D. JEFFREIS & J. FRESCO, J. Chem. Ed., 51 (1974) 545.
62. F.L. SNELSON; W.R. ELLIS; J. WILKAULS, Analyst, 92 - (1967) 264.
63. J.C. WASILEWSKI; T.S. PEI; J. JORDAN, Anal. Chem. 36 - (1964) 2131..
64. H. JANSHEKAR & J.R. MOR, Anal. Chim. Acta, 90 (1977) 201.

65. G.P. MEADE, Cane Sugar Handbook, 8-ed, John Wiley & Sons, 1957, 834 p.
66. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 11ed, 1970, 1015 p.
67. ICUMSA, 16, Ankara, 1974. Proceedings, 383 p.
68. P. GUILLOT, Anal. Chim. Acta, 50 (1970) 499.
69. W.R. MCLEAN & G.E. PENKETH, Talanta, 15 (1968) 1185.
70. I. WADSO, Science Tools, 13 (1966) 33.
71. W.A. DE OLIVEIRA & L. MEITES, Anal. Chim. Acta, 70 (1974) 383.
72. L. MEITES, The General Multiparametric Curve Fitting Program C F T 4. Computing Laboratory, Department of Chemistry, Clarkson College of Technology, Postdam, N.Y., 1976.
73. L.J. PAPA; H.B. MARK JR; C.N. REILLEY, Anal.Chem., 34 (1962) 1443.
74. H.B. MARK JR. & G.A. RECHNITZ, Kinetics in Analytical Chemistry, Interscience, New York, 1968, 339 p.
75. R.G. GARMON & C.N. REILLEY, Anal. Chem. 34 (1962) 600.
76. H. CAMPOS, Estatística Experimental Não Paramétrica, 3 ed, Piracicaba, 1979, 343 p.

9. APÊNDICE

São apresentadas a seguir as tabulações fornecidas pelo computador PDP-10, correspondentes ao ajuste dos dados experimentais obtidos no estudo entalpimétrico da oxidação de glicose e frutose pelo íon periodato, em diversos valores de pH.

Os parâmetros $V(1)$, $V(2)$, $V(3)$ e $V(4)$ correspondente aos parâmetros k , ΔT_1 , ΔT_2 e E da equação 3.9.

$V(1) = 2.51751E-2$
 $V(2) = -1.09175$
 $V(3) = 5.99877$
 $V(4) = 4.89896E-5$

Glicose pH 1,8

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD.DEV.
90	4.26	4.27348	-1.34789E-2	-1.12238
120	4.61	4.59686	1.31407E-2	1.09425
150	4.75	4.74501	4.98885E-3	0.41542
180	4.82	4.81083	9.16982E-3	0.763568
210	4.85	4.83797	1.20327E-2	1.00196
240	4.85	4.84693	3.06642E-3	0.25534
270	4.85	4.84737	2.63292E-3	0.219242
300	4.85	4.8436	6.20323E-3	0.516541
330	4.85	4.83835	-8.35055E-3	-0.695348
360	4.82	4.83205	-1.20285E-2	-1.00161
390	4.81	4.8253	-1.53003E-2	-1.27405
420	4.8	4.81839	-1.83868E-2	-1.53106
450	4.8	4.81139	-1.13918E-2	-0.948588
480	4.8	4.80436	-4.36395E-3	-0.363385
510	4.8	4.79733	2.67386E-3	0.222652
540	4.8	4.79029	9.71079E-3	0.808614
660	4.78	4.76222	1.77820E-2	1.4807
720	4.75	4.74824	1.75911E-3	0.146481

$SUM(DEV.)^{**2} = 2.01908E-3$, $STD.DEV. = 1.20092E-2$
 $CHI^{**2} = 7.11765$

$V(1) = 7.57473E-3$
 $V(2) = 0.998579$
 $V(3) = 1.46443$
 $V(4) = -6.99329E-4$

Fructose pH 1,8

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD.DEV.
90	1.77	1.81317	-4.31684E-2	-1.52591
120	2.06	2.00381	5.61906E-2	1.98621
150	2.2	2.16755	3.24454E-2	1.14687
180	2.3	2.31012	-1.01223E-2	-0.357802
210	2.45	2.43607	1.39259E-2	0.492249
240	2.51	2.54905	-3.90497E-2	-1.38032
270	2.65	2.65195	-1.95444E-3	-6.90850E-2
300	2.72	2.74711	-2.71089E-2	-0.958239
330	2.81	2.83637	-2.63675E-2	-0.932033
360	2.91	2.92121	-1.12140E-2	-0.396389
390	3	3.00284	-2.83614E-3	-0.100251
420	3.1	3.08219	1.78131E-2	0.629655
450	3.19	3.16003	2.99686E-2	1.05932
480	3.25	3.23699	1.30140E-2	0.460018
510	3.32	3.31355	6.45199E-3	0.228064
540	3.4	3.39012	9.87917E-3	0.349207
660	3.7	3.70225	-2.25475E-3	-7.97006E-2
720	3.85	3.84459	-1.45944E-2	-0.515881

$SUM(DEV.)^{**2} = 1.12048E-2$, $STD.DEV. = 2.82903E-2$
 $CHI^{**2} = 1.47059$

U(1)= 3.00045E-2
 U(2)=-1.04541
 U(3)= 6.3
 U(4)= 2.94043E-5

Fructose pH 4,60

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD. DEV.
90	4.8	4.82024	-2.02367E-2	-1.24783
120	5.1	5.06704	3.29631E-2	2.03256
150	5.18	5.16462	1.53751E-2	0.948058
180	5.2	5.20156	-1.55824E-3	-9.60841E-2
210	5.2	5.21384	-1.38370E-2	-0.853216
240	5.2	5.2161	-1.60958E-2	-0.992493
270	5.2	5.21428	-1.42836E-2	-0.880752
300	5.2	5.21082	-1.08188E-2	-0.667109
330	5.2	5.20668	-6.68484E-3	-0.412199
360	5.2	5.20228	-2.28119E-3	-0.140662
390	5.2	5.19777	2.22981E-3	0.137494
420	5.2	5.19322	6.78194E-3	0.418186
450	5.2	5.18865	1.13485E-2	0.699768
480	5.2	5.18408	1.59184E-2	0.981559
510	5.19	5.17951	1.04873E-2	0.646666
540	5.19	5.17495	1.50535E-2	0.928222
660	5.15	5.15672	-6.71941E-3	-0.414331
720	5.13	5.14763	-1.76296E-2	-1.08707

SUM(DEV.)**2= 3.68211E-3 , STD.DEV.= 1.62175E-2
 CHI**2= 4.76471

U(1)= 2.60187E-3
 U(2)= 1.98767
 U(3)= 3.15292
 U(4)=-5.10321E-4

Glicose pH 4,60

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD. DEV.
90	2.75	2.75528	-5.27996E-3	-0.515437
120	3	2.98657	1.34342E-2	1.31146
150	3.21	3.20725	2.75502E-3	0.268949
180	3.42	3.41822	1.78206E-3	0.173967
210	3.6	3.62032	-2.03196E-2	-1.98363
240	3.81	3.81432	-4.32354E-3	-0.42207
270	4	4.00095	-9.46999E-4	-9.24473E-2
300	4.2	4.18086	1.91449E-2	1.86895
330	4.35	4.35466	-4.66448E-3	-0.455353
360	4.51	4.52295	-1.29477E-2	-1.26397
390	4.7	4.68624	1.37646E-2	1.34372
420	4.84	4.84502	-5.02092E-3	-0.490149
450	5	4.99976	2.38299E-4	2.32631E-2
480	5.15	5.15088	-8.83222E-4	-8.62213E-2
510	5.3	5.29878	1.21933E-3	0.119033
540	5.45	5.44382	6.17880E-3	0.603183
660	6	6.00191	-1.90657E-3	-0.186122
720	6.27	6.27165	-1.65033E-3	-0.161108

SUM(DEV.)**2= 1.46905E-3 , STD.DEV.= 1.02437E-2
 CHI**2= 0.529412

V(1)= 2.55218E-1
 V(2)= 2.07808
 V(3)= 5.39198
 V(4)=-3.84453E-4

Glucose pH 5,20

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD. DEV
90	3.39	3.40661	-1.66125E-2	-0.943383
120	3.6	3.79282	7.17777E-3	0.407609
150	4.18	4.15479	2.52149E-2	1.4319
180	4.49	4.4946	-4.60035E-3	-0.261243
210	4.82	4.81419	5.80603E-3	0.329711
240	5.1	5.11533	-1.53337E-2	-0.870762
270	5.4	5.39964	3.56343E-4	2.03495E-2
300	5.69	5.66861	2.13933E-2	1.21488
330	5.9	5.9236	-2.35956E-2	-1.33994
360	6.15	6.16586	-1.58627E-2	-0.900806
390	6.4	6.39656	3.44038E-3	0.195371
420	6.6	6.61674	-1.67438E-2	-0.950843
450	6.82	6.82737	-7.38609E-3	-0.419439
480	7.04	7.02938	1.06218E-2	0.60319
510	7.23	7.22354	6.46114E-3	0.366913
540	7.44	7.41062	2.93796E-2	1.6684
660	8.11	8.10116	3.8367E-3	0.501825
720	8.4	8.41947	-1.94746E-2	-1.10592

SUM(DEV.)**2= 4.34130E-3 , STD.DEV.= 1.76095E-2
 CHI**2= 6.529412

V(1)= 3.93994E-2
 V(2)=-1.82367
 V(3)= 7.52859
 V(4)=-9.55021E-5

Fructose pH 5,20

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD. DEV
90	5.52	5.5192	8.01980E-4	5.15564E-2
120	5.7	5.68584	1.41635E-2	0.91052
150	5.71	5.7484	-3.83968E-2	-2.46839
180	5.77	5.77907	-9.07248E-3	-0.583237
210	5.8	5.8	-3.03984E-6	-1.95420E-4
240	5.81	5.81798	-7.97790E-3	-0.512871
270	5.85	5.83508	1.49202E-2	0.959164
300	5.86	5.85195	8.05300E-3	0.517699
330	5.87	5.86878	1.22422E-3	7.87007E-2
360	5.9	5.88563	1.43738E-2	0.924042
390	5.9	5.90252	-2.51669E-3	-0.161789
420	5.91	5.91945	-9.45312E-3	-0.607707
450	5.95	5.93644	1.35626E-2	0.871892
480	5.96	5.95347	6.52987E-3	0.419782
510	5.98	5.97055	9.44835E-3	0.6074
540	6	5.98768	1.23178E-2	0.791865
660	6.05	6.0567	-6.69730E-3	-0.430545
720	6.07	6.0915	-2.15026E-2	-1.38233

SUM(DEV.)**2= 3.38738E-3 , STD.DEV.= 1.55554E-2
 CHI**2= 2.88233

V(1)= 2.70745E-2
 V(2)=-1.16044
 V(3)= 6.50195
 V(4)=-1.54717E-4

Fructose pH 6,0

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD.DEV.
90	4.88	4.81359	6.64064E-2	1.34706
120	5.1	5.15303	-5.30330E-2	-1.07578
150	5.25	5.31773	-6.77318E-2	-1.37395
180	5.35	5.40493	-5.49344E-2	-1.11435
210	5.42	5.45781	-3.78050E-2	-0.766879
240	5.49	5.4955	-5.50258E-3	-0.111621
270	5.51	5.52653	-1.65315E-2	-0.335343
300	5.58	5.55467	2.53329E-2	0.513882
330	5.61	5.58159	2.84149E-2	0.5764
360	5.65	5.60803	4.19701E-2	0.85137
390	5.68	5.63433	4.56680E-2	0.926382
420	5.7	5.66064	3.93612E-2	0.798447
450	5.72	5.68702	3.29847E-2	0.669099
480	5.75	5.71349	3.65084E-2	0.740579
510	5.75	5.74008	9.91946E-3	0.201218
540	5.79	5.76679	2.32114E-2	0.470846
600	5.84	5.87486	-3.48577E-2	-0.707093
720	5.85	5.92965	-7.96480E-2	-1.61567

SUM(DEV.)**2= 3.40230E-2 , STD.DEV.= 4.92972E-2
 CHI**2= 7.11765

V(1)= 9.16557E-3
 V(2)=-1.74968
 V(3)= 16.2288
 V(4)= 8.32924E-5

Glicose pH 6,60

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD.DEV
90	7.3	7.34073	-4.07342E-2	-1.22817
120	9.1	9.0301	6.98994E-2	2.10753
150	10.31	10.3047	5.28193E-3	0.159254
180	11.2	11.2643	-6.43152E-2	-1.93916
210	12	11.9846	1.53549E-2	0.462962
240	12.54	12.5232	1.67502E-2	0.505033
270	12.95	12.9238	2.61624E-2	0.788616
300	13.22	13.2196	3.90053E-4	1.17604E-2
330	13.4	13.4358	-3.57858E-2	-1.07897
360	13.57	13.5915	-2.15214E-2	-0.64889
390	13.7	13.7014	-1.36852E-3	-4.12621E-2
420	13.77	13.7764	-6.37913E-3	-0.192336
450	13.82	13.8249	-4.94957E-3	-0.149234
480	13.88	13.8535	2.65429E-2	0.80029
510	13.89	13.8667	2.32544E-2	0.701139
540	13.88	13.8685	1.15051E-2	0.346889
660	13.79	13.8068	-1.68481E-2	-0.507984
720	13.75	13.7542	-4.17399E-3	-0.125849

SUM(DEV.)**2= 1.54003E-2 , STD.DEV.= 3.31666E-2
 CHI**2= 1.47059

V(1)= 1.17712E-2
 V(2)= 2.31537
 V(3)= 3.62293
 V(4)=-9.21697E-5

Fructose pH 6,60

X	Y, MEAS.	Y, CALC.	DIFF., M-C	DIFF./STD.DEV
90	4.7	4.7134	-1.34029E-2	-0.590098
120	5.12	5.10066	0.019337	0.851363
150	5.4	5.37766	2.23384E-2	0.983507
180	5.59	5.57722	1.27828E-2	0.562798
210	5.71	5.72238	-1.23843E-2	-0.545252
240	5.8	5.82936	-2.93581E-2	-1.29257
270	5.89	5.90952	-1.95156E-2	-0.859228
300	5.95	5.97085	-2.08490E-2	-0.917935
330	6	6.01897	-1.89729E-2	-0.835332
360	6.05	6.05783	-7.83104E-3	-0.344782
390	6.1	6.09019	9.80568E-3	0.431721
420	6.12	6.11801	1.99103E-3	8.76606E-2
450	6.18	6.14264	3.73577E-2	1.64477
480	6.19	6.16506	2.49448E-2	1.09826
510	6.2	6.18592	1.40779E-2	0.619817
540	6.22	6.20572	1.42828E-2	0.628837
660	6.28	6.27952	4.75168E-4	2.09206E-2
720	6.28	6.31513	-3.51259E-2	-1.54651

SUM(DEV.)**2= 7.22232E-3 , STD.DEV.= 2.27130E-2
 CHI**2= 4.76471

V(1)= 1.22356E-2
 V(2)=-4.17204
 V(3)= 16.8679
 V(4)= 8.48291E-6

Glicose pH 6,90

X	Y,MEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV.
90	7.1	7.08589	1.41116E-2	0.394943
120	8.75	8.80687	-5.68656E-2	-1.5915
150	10	9.9981	1.89734E-3	5.31008E-2
180	10.85	10.8224	2.76442E-2	0.773678
210	11.45	11.3924	5.76235E-2	1.61271
240	11.77	11.7863	-1.62745E-2	-0.455474
270	12.1	12.0582	4.18384E-2	1.17093
300	12.2	12.2455	-4.55241E-2	-1.27408
330	12.35	12.3743	-2.43316E-2	-0.680968
360	12.47	12.4626	7.42555E-3	0.207819
390	12.47	12.5227	-5.27158E-2	-1.47536
420	12.55	12.5634	-1.33903E-2	-0.374755
450	12.6	12.5906	9.42135E-3	0.263676
480	12.61	12.6084	1.57571E-3	4.40994E-2
510	12.65	12.6198	3.02016E-2	0.845252
540	12.65	12.6267	2.33104E-2	0.652389
660	12.65	12.6314	1.86337E-2	0.521503
720	12.6	12.6277	-2.76669E-2	-0.774315

SUM(DEV.)**2= 1.78737E-2 , STD.DEV.= 3.57308E-2
 CHI**2= 5.88235E-2

V(1)= 1.25043E-2
 V(2)= 1.98728
 V(3)= 5.12799E
 V(4)=-5.77029E-5

Fructose pH 6,90

X	Y,MEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV.
90	5.55	5.57508	-2.50794E-2	-0.647181
120	6.18	6.12121	5.87911E-2	1.51712
150	6.51	6.50048	9.52309E-3	0.245746
180	6.78	6.76508	1.49156E-2	0.384903
210	6.93	6.9509	-2.09040E-2	-0.539434
240	7.05	7.08259	-3.25875E-2	-0.840931
270	7.13	7.17708	-4.70757E-2	-1.2148
300	7.2	7.24601	-4.60101E-2	-1.18731
330	7.28	7.29739	-1.73908E-2	-0.448776
360	7.32	7.33672	-1.67159E-2	-0.431358
390	7.4	7.36776	3.22372E-2	0.83189
420	7.4	7.39313	6.67164E-3	0.177325
450	7.45	7.4146	3.54036E-2	0.913601
480	7.48	7.43339	4.66068E-2	1.2027
510	7.49	7.45036	3.96388E-2	1.02289
540	7.5	7.46608	3.39203E-2	0.875323
660	7.5	7.52277	-2.27697E-2	-0.58758
720	7.5	7.54959	-4.95874E-2	-1.27962

SUM(DEV.)**2= 2.10237E-2 , STD.DEV.= 3.87517E-2
 CHI**2= 4.76471

V(1)= 1.36391E-2
 V(2)=-3.625
 V(3)= 16.0892
 V(4)=-1.94429E-5

Glicose pH 7,20

X	Y,MEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV
90	7.75	7.75533	-5.33450E-3	-0.153358
120	9.35	9.34346	6.54292E-3	0.188098
150	10.45	10.4007	4.92681E-2	1.41638
180	11.1	11.1054	-5.42033E-3	-0.155826
210	11.55	11.5759	-2.59223E-2	-0.745224
240	11.86	11.8909	-3.08793E-2	-0.887728
270	12.08	12.1025	-2.25252E-2	-0.647562
300	12.22	12.2456	-2.55533E-2	-0.734617
330	12.31	12.343	-3.30071E-2	-0.948901
360	12.41	12.4102	-1.92046E-4	-5.52101E-3
390	12.45	12.4573	-7.27332E-3	-0.209096
420	12.52	12.491	0.028996	0.833587
450	12.55	12.5159	3.41319E-2	0.981236
480	12.55	12.5348	1.51554E-2	0.435694
510	12.6	12.5499	5.00882E-2	1.43995
540	12.6	12.5624	3.76157E-2	1.08139
660	12.6	12.5999	-5.80549E-5	1.66898E-3
720	12.55	12.6158	-6.57578E-2	-1.89043

SUM(DEV.)**2= 1.69395E-2 ; STD.DEV.= .3.47846E-2
 CHI**2= 4.76471

V(1)= 1.43553E-2
 V(2)= 1.19897
 V(3)= 4.7374
 V(4)=-5.12833E-5

Frutose pH 7,20

X	Y,MEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV
90	4.65	4.66459	-0.014586	-0.533357
120	5.15	5.12948	2.05150E-2	0.750161
150	5.48	5.43494	4.50647E-2	1.64786
180	5.62	5.63674	-1.67363E-2	-0.611985
210	5.75	5.77116	-2.11619E-2	-0.773813
240	5.83	5.86179	-3.17931E-2	-1.16256
270	5.9	5.92396	-2.39596E-2	-0.876116
300	5.95	5.96763	-1.76264E-2	-0.644534
330	5.98	5.99927	-1.92723E-2	-0.70472
360	6.02	6.02311	-3.10862E-3	-0.113671
390	6.06	6.04187	1.81270E-2	0.66284
420	6.08	6.05735	2.26548E-2	0.828404
450	6.1	6.07068	2.93176E-2	1.07204
480	6.11	6.08264	2.73633E-2	1.00058
510	6.11	6.0937	1.63030E-2	0.596142
540	6.12	6.10418	1.58187E-2	0.578434
660	6.14	6.14355	-3.54880E-3	-0.129767
720	6.12	6.16269	-4.26929E-2	-1.56113

SUM(DEV.)**2= 1.04704E-2 ; STD.DEV.= 2.73475E-2
 CHI**2= 4.76471

U(1) = 6.31771E-8
 U(2) = -3.43E-9
 U(3) = 15.2530
 U(4) = 1.38137E-5

Glucose pH 7,70

X	Y,MEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV.
90	5.28	5.25123	2.87738E-2	1.12207
120	5.84	6.86002	-2.00230E-2	-0.780823
150	6.06	6.07493	-1.49316E-2	-0.582274
180	6.94	6.9921	-5.20961E-2	-2.03155
210	8.7	9.68419	1.58063E-2	0.616386
240	10.22	10.3062	1.38396E-2	0.539692
270	10.55	10.5995	5.64755E-2	1.96875
300	10.91	10.8957	1.43234E-2	0.558556
330	11.13	11.1183	1.16541E-2	0.454487
360	11.29	11.2833	4.53091E-3	0.176685
390	11.4	11.4106	-1.06046E-2	-0.41354
420	11.5	11.507	-4.00221E-3	-0.156071
450	11.55	11.5734	-2.34090E-2	-0.912862
480	11.6	11.6247	-2.46813E-2	-0.962478
510	11.65	11.6622	-1.22461E-2	-0.477533
540	11.69	11.6894	5.50270E-4	2.14584E-3
660	11.75	11.7368	1.31501E-2	0.512854
720	11.75	11.741	6.99887E-3	0.350922

SUM(DEV.)**2= 9.20627E-3 ; STD.DEV.= 2.56435E-2
 CHI**2= 4.76471

U(1) = 1.65213E-9
 U(2) = -0.556021
 U(3) = 3.99707
 U(4) = -2.86587E-5

Fructose pH 7,70

X	Y,MEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV.
90	4.09	4.09045	-4.47571E-4	-1.75151E-2
120	4.62	4.62334	-3.53569E-3	-0.138364
150	4.86	4.94986	1.01408E-2	0.396848
180	5.18	5.15033	2.97734E-2	1.16514
210	5.27	5.27387	-2.38673E-2	-0.935933
240	5.32	5.35076	-3.07633E-2	-1.20388
270	5.38	5.39919	-1.91890E-2	-0.750935
300	5.4	5.43027	-0.030271	-1.18461
330	5.52	5.45079	6.92114E-2	2.70849
360	5.45	5.46487	-1.48720E-2	-0.581994
390	5.48	5.47504	4.96328E-3	0.194231
420	5.49	5.49282	7.18439E-3	0.281151
450	5.5	5.48914	1.08579E-2	0.424908
480	5.5	5.49459	5.41478E-3	0.2119
510	5.5	5.49949	5.08964E-4	1.99176E-2
540	5.5	5.50407	-4.07100E-3	-0.159313
660	5.52	5.52106	-1.08994E-3	-4.14400E-2
720	5.52	5.5293	-9.29564E-3	-0.363772

SUM(DEV.)**2= 7.14172E-3 ; STD.DEV.= 2.55575E-2
 CHI**2= 1.47059

U(1)= 1.29173E-5
 U(2)= -0.176114
 U(3)= 16.1231
 U(4)= 1.67614E-4

Glucose pH 9,60

X	Y,NEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV.
90	1.0	1.51855	8.14184E-2	1.94696
120	2.07	2.03694	3.30593E-2	0.790349
150	2.0	2.53390	-3.34638E-2	-0.800223
180	2.96	3.00896	-4.89636E-2	-1.17087
210	3.41	3.46422	-0.42235E-2	-1.29665
240	3.86	3.9	-3.99951E-2	-0.956475
270	4.29	4.31701	-2.70141E-2	-0.64599
300	4.7	4.71597	-1.59720E-2	-0.36194
330	5.1	5.09755	2.45392E-3	5.86808E-2
360	5.45	5.46239	-1.23859E-2	-0.296185
390	5.83	5.81112	1.88823E-2	0.451535
420	6.18	6.14434	3.56557E-2	0.852635
450	6.0	6.46265	-3.73532E-2	-0.893229
480	6.6	6.76658	-3.34157E-2	-0.799071
510	7.09	7.0567	3.33035E-2	0.796389
540	7.35	7.3333	1.64982E-2	0.394525
570	8.3	8.31739	-1.73916E-2	-0.415886
720	8.7	8.74166	-4.16605E-2	-0.996233

SUM(DEV.)**2= 2.44826E-2 ; STD.DEV.= 4.16181E-2
 CHI**2= 2.85235

v(1)= 2.86107E-3
 v(2)= 0.582269
 v(3)= 4.86016
 v(4)= 6.23186E-5

Fructose pH 9,60

X	Y,NEAS.	Y,CALC.	DIFF.,M-C	DIFF./STD.DEV.
90	1.67	1.67912	-9.17409E-3	-0.379174
120	2	1.9847	1.52995E-2	0.635807
150	2.28	2.26431	1.56659E-2	0.651866
180	2.51	2.5201	-1.01018E-2	-0.415805
210	2.75	2.75402	-4.02486E-3	-0.167263
240	2.96	2.96788	-7.88322E-3	-0.327607
270	3.16	3.16333	-3.32898E-3	-0.135344
300	3.34	3.34185	-1.87784E-3	-7.80385E-2
330	3.5	3.50492	-4.92132E-3	-0.204518
360	3.62	3.65374	-3.37363E-2	-1.40199
390	3.79	3.78919	5.05537E-4	2.10088E-2
420	3.9	3.91327	-1.32715E-2	-0.551531
450	4.1	4.02603	7.39455E-2	3.073
480	4.14	4.12875	1.12514E-2	0.467582
510	4.21	4.22219	-1.21858E-2	-0.506409
540	4.3	4.30713	-7.12872E-3	-0.296252
570	4.58	4.57513	4.87357E-3	0.202534
720	4.66	4.67334	-1.38415E-2	-0.575216

SUM(DEV.)**2= 8.10642E-3 ; STD.DEV.= 2.14670E-2
 CHI**2= 5.88234E-2