

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Paracar
Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Lireny Aparecida
Guaraldo Gonçalves e aprovada pela Comissão
Julgadora em 07.01.88.
Campinas, 07 de janeiro de 1988.

Frederick C. Strong III
Presidente da Banca

CONTRIBUIÇÃO A DETERMINAÇÃO ESTEQUIOMETRICA
DE AÇÚCARES REDUTORES

LIRENY APARECIDA GUARALDO GONÇALVES
Bacharel Química
Mestre em Química Analítica

02/88

Prof. Dr. FREDERICK CARL STRONG III
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS- SP -1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A LUIZ, que sempre me incentivou com sua
abnegação e sacrifício, e aos nossos filhos
Luciano Augusto, Fábio Eduardo e Rogério
César, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

-À FAPESP, que possibilitou a realização deste trabalho, concedendo bolsa de doutorado durante 3 anos na pós-graduação em Ciências de Alimentos da F.E.A.

- Ao Prof. Dr. Frederick Carl Strong III, minha gratidão pela acolhida em seu laboratório, aliada ao incentivo, amizade, dedicação e orientação constante no decorrer de minha carreira.

-À Profa. Dra. Délia Rodrigues Amaya, da qual tenho a maior admiração e respeito pelo exemplo de abnegação à ciência, sou grata pelo privilégio de sua convivência.

-A Edmond Garo Hagopian e Paulo Gouvea, que viabilizaram a execução dos ensaios cromatográficos, agradeço o exemplo de cooperação científica.

-Ao Prof. Dr. Waldomiro Sgarbieri pela concessão do multititulado automático para desenvolvimento de alguns trabalhos práticos.

- Ao Prof. Dr. Sátiro de Oliveira pelas sugestões dadas na correção da redação deste trabalho.

-Aos Professores Dr. Paulo Anna Bobbio e Dra. Florinda Bobbio pelo intercâmbio de equipamentos e reagentes efetivados durante este trabalho.

-A todos amigos no laboratório de Análise de Alimentos da UNICAMP, meu agradecimento à acolhida e amizade que me dedicam desde meu ingresso na FEA.

-À toda equipe do laboratório de Óleos e Gorduras, em especial ao Prof. Walter Esteves, Prof. Gerhard Plonis e

Roseli Ferrari, que me deram oportunidade de continuar meus estudos nesta área.

-Aos colegas de Pós-Graduação pelo convívio familiar do qual sempre pude aprender.

-Ao amigo Mário Peterlevitz Frigerio, minha gratidão à imensurável paciência que me dedicou na iniciação à informática.

-À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA) pelas cópias xerográficas.

-À Secretaria de Pós-Graduação e Coordenadoria pela atenção e colaboração dispensada no decorrer desta Jornada e à Srta. Telma Silvia T. Assad Sallum, pela presteza na tramitação da documentação.

- A todos que de perto acompanharam e se interessaram pelo meu trabalho.

Agradeço em especial à minha irmã Ana Maria pelo carinho, solidariedade e espírito de renúncia com que vem me acompanhando. Aos meus pais e avó minha gratidão pois não mediram sacrifícios para dar a seus filhos mais que a eles próprios, encaminhando-os para a vida.

RESUMO

Na oxidação de açúcares redutores com íons cúpricos, a tabela de Lane - Eynon exibe uma faixa de 4,85 - 5,20 eqs/mol para a glicose e 7,25-7,48 eqs/mol para lactose. Na presença de 1 a 25 g de sacarose/100mL de solução, encontramos valores mínimos de 5,0 e 5,7 eqs/mol de glicose. A tabela de Hammond apresenta, a partir de mg de óxido cuproso, 5,21 - 6,20 eqs/mol de glicose e 7,21-7,30 eqs/mol de lactose. Com base na discrepância desses valores obtidos das tabelas atualmente em uso, efetuamos um estudo de oxidação de açúcares redutores com cobre, complexado com tartarato em meio alcalino.

A técnica adotada levou em conta a modificação do método oficial de Lane - Eynon, empregando a titulação do açúcar com a mistura do oxidante em lugar de titular o reagente com solução da amostra. Sistemas de reagentes com concentrações variáveis de base foram usados para tentar encontrar condições ideais para obtenção de oxidações estequiométricas. Soluções de cobre: tartarato : hidróxido de sódio (Cu:T:OH), na proporção 1:2:3 forneceram resultados estequiométricos de oxidação para monossacarídeos normalmente presentes em alimentos, sendo determinada a oxidação estequiométrica entre 1 mol de açúcar e 4 moles de cobre. Para dissacarídeos como lactose, encontrou-se proporção entre açúcar e cobre de 1:6, sendo o melhor

sistema oxidante $\text{Cu:T:OH} = 1:4:3$. Foi também estudada a estabilidade dos reagentes oxidantes, variando-se proporções entre agente complexante e meio alcalino. A estabilidade do reagente varia inversamente com a concentração de hidróxido de sódio, sendo que soluções $\text{Cu:T:OH}::1:2:3$ e $1:4:3$ podem ser armazenadas por até 6 meses, sem apresentarem depósitos de óxido cuproso ou alterações de sua coloração.

Alguns sistemas de eletrodos foram estudados para avaliação do ponto final da titulação através de titulação potenciométrica. A reação complexa, envolvendo reação de oxi-redução com precipitação, efetuada a temperatura de ebulição, forneceu resultados promissores com o emprego de eletrodo de cobre. Bons resultados foram obtidos quando um eletrodo de calomelano serviu de eletrodo de referência imerso em solução de KCl, mantida a temperatura ambiente e conectada ao frasco de reação fervente por meio de ponte salina. Sistemas de eletrodos cobre/cobre, com eletrodo de referência imerso em solução contendo íons Cobre (II), separado da solução fervente por uma membrana de vidro, também levaram a resultados promissores.

O método dispensa a colocação de solução de açúcar na bureta e se aplica perfeitamente a técnicas micrométricas de laboratório microbiológicos e bioquímicos. Aliquotas contendo no mínimo 1×10^{-5} mol de açúcar redutor podem ser titulados sem problemas. Sacarose, quando presente em níveis de concentração até o dobro da

concentração do açúcar redutor não oferece qualquer interferência.

Técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), identificaram ácido fórmico, ácido oxálico e ácido glicólico entre os sub-produtos da oxidação da glicose com íons cúpricos.

Os açúcares redutores glicose e lactose foram também estudados frente à oxidação com hexacianoferrato (III) de potássio (HCFP) em meio alcalino. Sistemas de oxidação em presença de hidróxido de sódio em concentrações variáveis foram submetidos à oxidação à temperatura de ebulição, por titulação com solução de açúcar. O HCFP não mostrou nenhuma tendência de parar a oxidação numa região estequiométrica. Observou-se o comportamento dos compostos formiato, glicerol, lactato, piruvato, manitol, tartarato e sacarose, quando tratados em condições de oxidação semelhantes aos açúcares redutores, detectando-se seu poder de redução na presença de íons férricos. Titulações potenciométricas de lactose, utilizando eletrodos de platina e tungstênio, forneceram bons resultados para monitoração da oxidação com HCFP. A alternativa utilizando 2,6-diclorofenolindofenol sódico como indicador forneceu ótimos resultados, com viragem de verde-limão para incolor. Ácido fórmico foi identificado como sub-produto de oxidação de lactose e reações envolvendo 6,8 e 10 elétrons foram detectadas por técnicas espectrofotométricas, conforme a concentração de hidróxido de sódio utilizada e as condições de oxidação.

CONTRIBUTION TO THE STOICHIOMETRIC DETERMINATION OF REDUCING SUGARS

In the oxidation of reducing sugars with cupric ions, the table of Lane - Eynon exhibits a range of 4.85-5.20 eq/mole for glucose and 7.25-7.48 eq/mole for lactose. In the presence of 1 to 25 g of sucrose/100 mL of solution, we find minimum values of 5.0-5.7 eq/mole of glucose. The table of Hammond, which is based on mg of cuprous oxide, gives 5.21-6.20 eq/mole of glucose and 7.21-7.30 eq/mole of lactose. Because of the discrepancy of these values obtained from tables in current use, we undertook a study of the oxidation of reducing sugars with copper complexed with tartrate in alkaline medium.

The technique adopted proposed a modification of the official method of Lane and Eynon, using a titration of the sugar with the oxidizing mixture in place of titrating the reagent with the solution of the sample. Reagents with variable concentrations of base were used to try to find ideal conditions for obtaining stoichiometric oxidations. Solutions of copper:tartrate:sodium hydroxide (Cu:T:OH) in the proportion 1:2:3 furnished stoichiometric oxidation results for monosaccharides normally present in foods, a stoichiometry of 1 mole of sugar and 4 moles of copper being determined. For disaccharides like lactose, a sugar-copper proportion of 1:6 was found, the best oxidation system being $\text{Cu:T:OH} = 1:4:3$. The stability of oxidizing reagents was also studied, varying the proportions between complexing agent and the alkaline medium. The reagent stability varies inversely with the sodium

hydroxide concentration, but solutions of Cu:T:OH::1:2:3 and $1:4:3$ can be stored for up to 6 months without showing deposits of cuprous oxide or changes in their color.

Some electrode systems were studied for detecting the end point of the titration through a potentiometric titration. The complicated reaction of oxidation-reduction with precipitation, carried out at the boiling point, gave promising results with the copper electrode. Good results were obtained when a calomel electrode, immersed in KCl solution at room temperature and serving as a reference electrode, was connected to the reaction flask with the boiling solution by a salt bridge. Systems of copper/copper electrodes, with the reference electrode immersed in a solution containing copper (II) ions and separated from the boiling solution by a glass membrane, also led to promising results.

The method dispenses with placing the sugar solution in the buret and applies perfectly to micro techniques of biochemical and microbiological laboratories. Aliquots containing a minimum of 1×10^{-5} mole of reducing sugar can be titrated without problems. Sucrose, when present at levels up to double the concentration of reducing sugar, do not offer any interference.

The technique of high pressure liquid chromatography (HPLC) identified formic acid, oxalic acid and glycolic acid among the sub-products of the oxidation of glucose with copper.

The reducing sugars glucose and lactose were also studied with respect to oxidation by potassium hexacyano-

ferrate(III) in alkaline medium(K₂Cr₂O₇).Oxidizing systems with variable concentrations of sodium hydroxide were submitted to reduction at boiling temperature by titration with sugar solution. The K₂Cr₂O₇ did not show any tendency to stop the reaction in a stoichiometric region. The behavior of the following ions and compounds was observed when treated under conditions of oxidation similar to those for reducing sugars to detect their reducing power : formate, glycerol, lactate, pyruvate, mannitol, tartrate and sucrose. Potentiometric titrations of lactose, utilizing platinum and tungsten electrodes gave good results for monitoring oxidations with K₂Cr₂O₇. The alternative method using the sodium salt of the indicator 2,6- dichlorophenolindophenol yielded excellent results with a color change from lime-green to colorless. Formate was identified as a sub-product of the oxidation of lactose and reactions involving 6, 8 and 10 electrons were detected by spectrophotometric techniques, according to the concentration of sodium hydroxide and the conditions of oxidation.

SUMÁRIO

I-	INTRODUÇÃO	01
II-	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
III-	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
III-1	Instrumentação.....	19
III-1.1	Medidas espectrofotométricas.....	19
III-1.2	Medidas de pH e potencial de reação.....	19
III-1.3	Medidas eletrolíticas.....	20
III-1.4	Medidas cromatográficas.....	20
III-2	Reagentes.....	20
III-3	Soluções padrão.....	20
III-4	Métodos.....	23
III-4.1	Oxidação com íons Cúpricos.....	23
III-4.1.1	Método oficial.....	23
III-4.1.2	Metodologia adaptada:métodos volumétricos....	23
	A)Titulação de solução de cobre com açúcar em meio alcalino de concentração variável....	23
	B)Titulação de solução de açúcar com proporções variáveis de cobre, tartarato e hidróxido de sódio.....	24
III-4.1.3	Determinação de íons cúpricos em excesso por complexiometria.....	24
III-4.1.4	Determinação de íons cúpricos em excesso por espectrofotometria de absorção atômica.....	25
III-4.1.5	Titulação de açúcar redutor na presença de sacarose.....	25

III-4.1.6	Titulação de açúcar redutor em equipamento comercial.....	26
III-4.1.7	Estudo de oxidação de alguns redutores com íons cúpricos.....	26
III-4.1.8	Titulações potenciométricas.....	27
III-4.1.9	Tratamento das amostras para determinação de açúcar redutor.....	28
III-4.1.10	Determinação de ácido fórmico.....	29
III-4.1.11	Métodos cromatográficos.....	30
	cromatografia em papel.....	30
	cromatografia em camada delgada.....	31
	cromatografia líquida de alta eficiência.....	31
III-4.2	Oxidação com ferricianeto de potássio.....	33
III-4.2.1	Método volumétrico por potenciometria.....	33
III-4.2.2	Método espectrofotométrico.....	34
	A) Estudo da lactose.....	34
	B) Estudo de outros redutores.....	34
III-4.3	Tratamento estatístico dos dados.....	35
IV-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
IV-1	Oxidação de açúcar por íons cúpricos.....	36
IV-1.1	Método oficial.....	36
IV-1.2	Metodologia adaptada: métodos volumétricos.....	36
IV-1.2.1	Titulação de cobre com solução de açúcar em meio alcalino de concentração variável.....	36
IV-1.2.2	Titulação de solução de açúcar com mistura de solução de Cu: I: NaOH em proporções variáveis..	39

IV-1.2.3	Titulação de açúcar redutor na presença de sacarose.....	47
IV-1.2.4	Titulação de açúcar redutor em equipamento comercial.....	50
IV-1.2.5	Determinação de íons Cu(II) em excesso por complexiometria.....	50
IV-1.2.6	Determinação de íons cúpricos em excesso por espectrofotometria de absorção atômica....	54
IV-1.2.7	Estudo de oxidação de alguns redutores com íons cúpricos.....	54
IV-1.2.8	Aplicação do método.....	55
IV-1.2.9	Equações.....	56
IV-1.2.10	Titulações potenciométricas.....	62
IV-1.2.11	Determinação de ácido fórmico.....	70
IV-1.2.12	Métodos cromatográficos (CG e CLAE).....	71
IV-2.	Oxidação de açúcares por Hexacianoferrato (III) de Potássio (HCFP).....	77
IV-2.1.	Estudo da oxidação por método volumétrico potenciométrico.....	77
IV-2.2.	Estudo da oxidação de lactose por método espectrofotométrico.....	90
V	CONCLUSÕES.....	103
VI	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

I - I N T R O D U Ç Ã O

A determinação de açúcares redutores e açúcares totais é uma prática amplamente utilizada em laboratórios químicos que analisam produtos alimentícios. Esta determinação pode ser efetuada com o objetivo de caracterizar uma amostra, acompanhar uma reação química ou enzimática, ou ainda avaliar o estado de maturação de uma cultura. Qualquer que seja o objetivo, o ideal é efetuar a determinação de maneira rápida, eficiente e com baixo custo.

A técnica mais simples empregada em laboratórios de análise de alimentos e controle de qualidade de produtos alimentícios é o método volumétrico de LANE-EYNON (1923).

A tendência de escolha deste método explica-se pelos recursos irrisórios necessários à sua implantação. Qualquer laboratório carente de recursos ou de equipamentos sofisticados pode, sem problemas, adotar esta metodologia.

O método de Lane-Eynon para determinação de açúcares redutores é um método ímpar na análise volumétrica porque o reagente (solução alcalina do complexo de fénico com tartarato) é colocado no frasco e a amostra na bureta. A reação não segue uma estequiometria definida e os produtos de oxidação dos açúcares são desconhecidos.

Apesar do método fornecer resultados razoáveis em condições bem padronizadas, apresenta desvantagens como a

variação da estequiometria conforme o teor de açúcar e interferência de sacarose. Para cálculos recorre-se ao uso de tabelas.

A tabela de Lane-Eynon (52.017- AOAC 1980) exibe uma faixa de 4,89-5,20 equivalentes/mol para glicose enquanto que para lactose 7,25-7,48 equivalentes/mol. Na presença de 1 a 25 g de sacarose/100 mL de solução encontramos valores mínimos de 5,0 a 5,7 eq./mol de glicose. Valores mínimos de concentração referentes à tabela apresentam para a frutose 4,8 eq./mol e para maltose 6,15 eq./mol.

A tabela de Hammond (AOAC-1980) apresenta, a partir de mg de óxido cuproso obtidos da oxidação com íons cúpricos , 5,21-6,20 eq./mol de glicose e 7,21-7,30 eq./mol de lactose.

O estudo mais detalhado do método tem como objetivo uma modificação que permita titulação com o reagente de cobre na bureta e amostra no frasco, em meio oxidante menos intenso, com obtenção de reações estequiométricas com açúcares redutores comuns.

Outra reação de comportamento pouco estudado é a oxidação de açúcares redutores através de íons férricos. HAGEDORN E JENSEN (1923) propuseram esta reação na presença de hexacianoferrato (III) de potássio, também denominado de ferricianeto de potássio, em meio fracamente alcalino. Inicialmente o método foi utilizado para determinação de amostras de sangue. A reação efetuada em excesso de meio

oxidante e utilizando o recurso da iodometria para dosagem de íons ferricianeto residual, leva à estequiometria 5,08 entre o oxidante e o redutor (glicose).

Outros autores, efetuando a mesma oxidação, em pH mais baixo, determinaram a proporção Fe(III)/glicose entre 5,0 e 7,7 evidenciando a conhecida falta de estequiometria desta oxidação.

Estudos específicos desta oxidação com íons férricos tornam-se necessários para verificação da viabilidade em análises rotineiras.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Complexo de cobre divalente com ácido tartárico em solução alcalina, denomina-se solução de Fehling. O primeiro registro da solução de Fehling data de 1850 (apud, MUNSON E WALKER, 1906) e a partir de 1879 encontra-se publicações na área de determinação quantitativa de monossacarídeos, explorando esta técnica de oxidação de açúcares.

BROWN, MORRIS E MILLAR (1897) empregaram solução de Fehling para determinação de açúcar redutor por gravimetria, convertendo óxido cuproso a óxido cúprico.

MUNSON E WALKER (1906) utilizaram o mesmo princípio, determinando a concentração de açúcar através de tabelas que expressam mg de óxido cuproso esperado para diversas concentrações de açúcares.

BERTRAND (1906) após formação do óxido cuproso, sugeriu modificação submetendo o óxido à dosagem volumétrica com solução ácida de sulfato férrico e titulando o sulfato ferroso formado, por permanganometria.

* LANE E EYNON (1923) propuseram um método volumétrico para determinação de açúcares redutores recorrendo ao uso de azul de metileno como indicador. O método proposto titula solução de Fehling à temperatura de ebulição com solução de açúcar clarificado. O reagente cúprico apresenta-se instável e recorre-se ao uso de misturas 1:1 de solução contendo tartarato duplo de sódio e potássio em meio alcalino e solução de sulfato cúprico, conhecidas como soluções Soxhlet A e B.

OFNER em 1928 (apud; MC DONALD E TURCOTTE ,1947) introduziu o uso de reagentes de baixa alcalinidade para determinação de açúcar invertido. Hidróxido de sódio foi substituído por carbonato de sódio e dihidrogenofosfato de sódio.

LUFF-SCHOORL (1931) utilizando o mesmo tipo de reagente, ampliou a aplicação do método, para açúcar invertido em amostras contendo até 45 mg de açúcar, recorrendo à dosagem iodométrica. O autor avaliou a interferência de 1 a 5 g de sacarose.

Algumas modificações dos métodos baseados na oxidação de açúcar em presença de íons cúpricos tiveram aplicação prática durante algum tempo. MC DONALD E TURCOTTE (1947) efetuaram um estudo sobre as modificações do método de Ofner, realizadas por JACKSON E MC DONALD (1943). Refazendo diversas quantificações com o método modificado, os autores reconheceram que a precisão do método foi aumentada pela acidificação com ácido acético antes da adição do iodo e subsequente adição de ácido clorídrico. Assim a oxidação rápida de cloreto cuproso em solução ácida foi eliminada. Amostras de açúcar com teores de 5,0 a 25,0 mg de açúcar invertido apresentaram boa precisão na ausência de sacarose.

HILDRETH E BROWN (1942) modificaram o método de Lane-Eynon. A modificação consistiu na adição de uma alíquota de amostra desconhecida diretamente a uma quantia determinada de solução de Fehling padronizada, completando-se a redução pela titulação da mistura fervente com solução padrão de açúcar

invertido. A vantagem desta modificação resumiu-se na utilização de uma solução padrão para todas titulações, evitando mudanças de buretas entre determinações.

MC DONALD (1948, 1949, 1952, 1953, 1955, 1957), como membro de uma Comissão Internacional de Uniformização de métodos de análises de açúcares, após avaliar uma série de métodos, recomendou que se continuassem as pesquisas sobre o método de Lane-Eynon, pois apesar de ser amplamente utilizado, apresentava problemas relacionados com a determinação de açúcares redutores na presença de sacarose, sem um método modificado adequado à resolução do problema.

Titulações complexiométricas utilizando EDTA podem ser empregadas para a determinação indireta de açúcar redutor. Autores como STREET (1958), HENNART (1965) e NARASARAJU, RAO E SINGH (1971) descreveram métodos utilizando este princípio. Amostras contendo até 30 mg de açúcar, tratadas com soluções de Fehling, poderiam ser submetidas ou não a uma filtração para dosagem posterior com solução de EDTA. Os autores determinaram a relação átomos de cobre/átomos de glicose igual a 5,0, conforme AOAC.

SOMOGYI (1945) desenvolveu uma metodologia para direccionar as medidas de concentração de açúcares redutores por oxidação com íons cúpricos para o campo da colorimetria. Para tanto, utilizou dissolução de óxido cuproso em excesso de solução de fosfomolibdato, medindo a intensa coloração azul formada e correlacionando com teores de açúcar presente na amostra.

NELSON (1944) fez uma modificação no método de

SOMOGYI (1945), tornando-o colorimétrico, sem alterar sua precisão. O método colorimétrico apresentava a limitação de ser aplicável a soluções de açúcar oxidado transparentes e relativamente incolores. Neste, o cobre reduzido pela reação com reagente de arsenomolibdato produzia um complexo mais colorido e mais estável que o produzido pelo fosfomolibdato. A solução de cobre empregada era bastante estável, sendo a mesma do método de Somogyi (1945). A absorbância do complexo formado deveria ser lida a 550 nm num tempo máximo de 40 minutos. A amostra não poderia conter teor de glicose superior a 0,6 mg.

WAGER (1954) mostrou que o reagente de Somogyi de 1945 satisfazia o método modificado se fosse tomado o cuidado de se excluir rigorosamente o ar durante as operações de mistura, aquecimento e resfriamento. Wager aconselhou também o uso de reagente de baixa alcalinidade e verificou aumento da absorbância do complexo com o tempo, sugerindo medidas colorimétricas a tempos de reação constante.

AINCIBURU (1969) elaborou uma adaptação do método de Somogyi-Nelson para determinação de lactose em leite, podendo ser aplicado na presença de sacarose.

FOLIN E WU (1919) elaboraram um método para determinação de dextrose com interesse particular na área de medicina e bioquímica utilizando a propriedade de redução do complexo hexacianoferrato (III) a hexacianoferrato (II) na presença de monossacarídeos. Aplicável na faixa de 5,0 a 30,0 mg dextrose/100 mL o método foi utilizado durante muitos anos sem modificações.

HAGEDORN E JENSEN (1923) propuseram a reação do açúcar em presença de ferricianeto de potássio em excesso, em meio fracamente alcalino. O excesso de ferricianeto era então determinado por iodometria e a conversão completa acelerada por íons zinco e potássio como $K_2 Zn_3 [Fe(CN)_6]_2$. Foi observado que a reação entre açúcar e ferricianeto não ocorria estequiometricamente e a quantidade de açúcar deveria ser determinada empiricamente por tabelas e calculada por meio de fatores. Os autores avaliaram também parâmetros como a concentração de ferricianeto, alcalinidade da solução, tempo de aquecimento e volume apropriado de reagentes da mistura. Foram considerados fontes de erro a luz, por destruir ferricianeto em solução alcalina, e a reoxidação do ferricianeto.

FOLIN em 1928 fez uma modificação neste método baseando-se na mudança de coloração de amarelo (ferricianeto) para incolor (ferrocianeto), fazendo o açúcar, após ser oxidado por ferricianeto de potássio, ser determinado colorimetricamente como azul da prússia (ferrocianeto férrico). Esta modificação, empregada para determinação de açúcar em 0,1 mL de sangue, aumentou a precisão das medidas.

HAWKINS E VAN SLYKE (1929) determinaram açúcares redutores em amostras de sangue e urina, utilizando como princípio apenas a propriedade da descoloração da solução de ferricianeto de potássio pelo açúcar. O método baseava-se na obtenção, através de curvas padrões, de tempos de redução (a quente) da solução de ferricianeto por solução padrão de glicose. Os autores detectaram tempos de 100 a 300 segundos como

suficientes para tornar incolor a solução de ferricianeto qualificando o método como bem rápido para propostas clínicas. Foi detectada precisão da ordem de 5%, compensada pela simplicidade de equipamentos e rapidez de detecção para controle de pacientes hipo ou hiperglicêmicos.

FORSEE (1938) introduziu o uso de colorímetro fotoelétrico para determinação de glicose em amostras contendo até 0,4 mg , baseado na oxidação por ferricianeto.

BLOM E ROSTED (1947) efetuaram modificações do método de HAGEDORN E JENSEN (1923), recorrendo ao uso de sistemas tampões de carbonato/bicarbonato, pH 9,8 , pH 10,5 e Na_3PO_4 / Na_2HPO_4 pH 11,9, detectando proporções de Fe(III)/ glicose 7,73 , 6,72 e 8,03 respectivamente . Em concentrações bem maiores de oxidante (0,04 M) em relação ao método original (0,0007M) a oxidação de açúcar também variou, sobretudo para a maltose. Na determinação de açúcares redutores por meio de tartarato de cobre, obtiveram resultados mais reprodutíveis, porém ainda discrepantes. Novas modificações empregadas por estes autores através do uso de soluções de carbonato de potássio/bicarbonato de potássio, que baixa o pH de 14 para 9,9 foram capazes de estabilizar o complexo *carbonato-cobre. Em diluições foram observadas precipitação de carbonato de cobre e instabilidade após aquecimento. A composição do reagente foi limitada pela concentração da mistura $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$. Melhores resultados foram observados com relação equimolar dos dois componentes, obtendo-se a proporção $\text{Cu}^{+2} : \text{HCO}_3^- : \text{CO}_3^{2-} = 0,1:1:1$.

O estudo da influência do pH e do tempo de aquecimento sobre o equivalente de redução de diferentes açúcares mostrou que o equivalente de redução aumentava com o tempo de aquecimento e decrescia com o aumento de pH, nas oxidações com íons cúpricos. Galactose apresentou equivalente de redução menor que glicose. O tempo de aquecimento ideal situou-se na faixa de 40 a 50 minutos. Foi observado que o equivalente de redução não dependia do teor de açúcar nas faixas de 10 a 30 mg para galactose, açúcar invertido e glicose. Entretanto, verificou-se que o equivalente de redução da lactose aumentava na presença de excesso de íons cúpricos (BLOM E ROSTED, 1947).

SMITH (1952) elaborou um estudo de determinação de açúcar invertido e sacarose em produtos de panificação utilizando ferricianeto de potássio. Após eliminação da proteína, os filtrados foram tratados com solução de ferricianeto, aquecidos em banho maria e dosados por iodometria. O autor comparou resultados obtidos por quatro laboratórios para a mesma amostra e todos, comparados com o método de MUNSON-WALKER (1906), levaram a uma superestimação dos teores, embora os resultados não fossem tão discrepantes entre si. Foi recomendado que se continuassem estudos neste campo.

Após MALAPRADE (1928) ter observado que ácido periódico age sobre glicóis fornecendo aldeído fórmico e ácido fórmico, FLEURY E LANGE (1932) estenderam esta propriedade para o estudo de glicose, ácido tartárico, frutose, ácido glucônico e poli-álcoois. Observaram que o íon periodato não age sobre álcoois simples e ácido glicólico, málico e cítrico. Atualmente

existem diversos métodos que empregam esta oxidação com ácido periódico para determinação de açúcares redutores.

RODELLA (1979), utilizando oxidação de açúcares pelo íon periodato, elaborou um estudo e montou um sistema de análise entalpimétrica, adaptando dispositivos para proporcionar uma marcha analítica simples e rápida. Estudando soluções puras de glicose, frutose, xilose, galactose, arabinose e ribose no sistema desenvolvido, detectou-se precisão da ordem de 1,5 %. Para tanto empregou sinal de variação de temperatura correspondente aos estágios iniciais da reação com íon periodato. O autor observou linearidade entre o sinal de variação da temperatura e concentração de açúcares, sendo a técnica empregada inclusive para determinação simultânea de glicose e frutose. Aplicações em caldo de cana e comparações com método de Lane-Eynon mostraram ser a técnica entalpimétrica adequada à determinação de açúcares redutores. Medidas para melaço foram superiores às obtidas pelo método referência, sinal de que substâncias interferentes estavam presentes.

DREYWOOD (1946) descreveu pela primeira vez o comportamento da antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno), um produto de redução da antraquinona, frente a carboidratos. O autor observou que em meio sulfúrico a antrona reagia com muitos carboidratos produzindo uma cor azul esverdeada característica. MORRIS (1948) mostrou que esta coloração esverdeada obedecia a lei de Beer a 620 nm para carboidratos como glicose, para glicogênio e maltose.

SATTLER E ZERBAN (1948), estudando a reação, confirmaram que a coloração era devido à formação de compostos de

furfural na presença de ácido sulfúrico, particularmente hidroximetilfurfural e furfural. Diversos pesquisadores transformaram o método qualitativo em quantitativo, surgindo técnicas apropriadas para determinação de sacarose, glicogênio, lactose, amido, e celulose, metilcelulose, dextrana, pentoses, ceto-hexose, maltose, ácidos urônicos, deoxiaçúcares e glicosídeos.

Carboidratos e seus derivados, os quais não produzem furfural, apresentaram, nesta reação uma larga faixa de cores diferentes. A velocidade de desenvolvimento da coloração variava em muitos açúcares que tivessem estruturas similares. Estas diferenças impediam o uso de antrona na determinação de carboidratos totais em muitas misturas de açúcar. No entanto, estas mesmas diferenças foram utilizadas como vantagem na análise diferencial de mistura de açúcares. O método de antrona foi muito empregado na determinação quantitativa de uma série de misturas de carboidratos tais como amido e celulose, deoxihexose e ácido d-galacturônico, d-xilose e 2-deoxi-d-ribose e derivados de ácido nucléico, d-galactose e l-ramnose (SATTler e ZERBAN, 1948).

DUBOIS et al (1956) descreveu o método colorimétrico fenol-sulfúrico para determinação de açúcar total. A ausência de interferência na presença de solventes usualmente empregados em técnicas de cromatografia em papel e camada delgada, transformou-o num método apropriado para determinação de açúcares isolados através de cromatografia. Os autores estenderam sua aplicação à determinação direta de lactose em queijos e leite porque caseína, aminoácido, ácido láctico e ácido cítrico, nas

quantidades encontradas nestes produtos não interferiam. Através de quantificação a 480 nm, o método apresentou-se sensível na faixa de 10 a 70 µg de açúcar.

Compostos nitro-aromáticos como ácido pícrico, produzem, conforme THOMAS E BUTCHER (1924), na presença de açúcares redutores em meio alcalino, a quente, soluções de coloração vermelha intensa. A mesma propriedade se estende a outros compostos como 2-4-dinitrofenol, ácido 3,5-dinitrosalicílico, ácido 3,6 dinitroftálico. Normalmente a formação de cor obedece a lei de Beer. O método também se aplica a determinação de açúcar invertido.

GOALSTAD (1946) desenvolveu um método eletrométrico para determinar sacarose e açúcares redutores usando solução de Fehling, sem clarificação prévia da amostra. Para eliminação das impurezas, o autor sugeriu o uso de carvão animal. O método potenciométrico utilizava eletrodo indicador em contato com uma solução contendo o agente complexante e sulfato de sódio, em cela dotada de uma parte porosa que atuava como ponte salina. O eletrodo de referência, do mesmo metal do indicador, ou seja, eletrodo de cobre, em contato com a solução de Fehling e sob ebulição sofria adição do açúcar. No ponto final da titulação, o eletrodo indicador imerso em solução alcalina de íons de cobre de concentração infinitesimal, apresentava através do sistema mudança de polaridade. Este fato, detectado por uso de um galvanômetro resultava na medida da concentração de açúcar.

FRAMPTON et al (1951) empregaram a reação de Killiani, que consiste na adição de cianeto ao grupo carbonílico

dos açúcares como método analítico, efetuando a hidrólise alcalina das cianidrinhas formadas e titulando a amônia liberada para quantificação.

Halogênios oxidam açúcares em meio alcalino. Sob condições especiais pode-se quantificar aldoses, se estas forem oxidadas quantitativamente a ácido aldônico, conforme COLLINS (1953). Pode-se empregar o iodo como oxidante, cujo excesso é determinado pelo tiosulfato ou colorimetricamente segundo MILLER E BURTON (1959).

SKELL E CRIST (1954) utilizaram a propriedade de redução de borohidreto sobre o grupo aldeídico dos açúcares para, após reação, determinar o teor de reagente não consumido através de medição do volume de hidrogênio produzido pelo agente redutor, na presença de ácido.

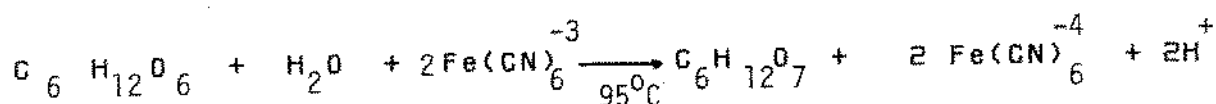
Açúcares redutores podem também ser determinados por sais de cério, sendo a reação conduzida em meio alcalino e sob ebulição, titulando-se o excesso de íon cério não reduzido com o íon ferroso, segundo FORIST E SPECK (1955). Pode-se estimar o consumo de perclorato de cério por titulação com ácido oxálico ou íon arsenito conforme SHARMA (1956).

Alguns métodos potenciométricos encontram-se disponíveis na literatura. PAPASTATHOPOULLOS, NIKOLELIS E HADJIOANNOU (1977) descreveram um método potenciométrico para determinação de açúcares redutores em amostras contendo 0,25 a 2,0 mg de glicose. Amostras tratadas com reagente de Stanley-Benedict (sulfato de cobre, ácido cítrico e carbonato de sódio) foram

submetidas a aquecimento. Os compostos formados foram tamponados a pH 4,1, termostatizados e submetidos à leitura em potenciômetro. Através de método de adições sucessivas, novas medidas de potenciais eram tomadas, empregando eletrodo seletivo de cobre. A escolha do tampão acetato de sódio-ácido acético pH 4,1 foi devido à observação de que este tampão não apenas ajustava o pH mas também servia como descomplexante de cobre de todos agentes complexantes fortes, segundo observação de SMITH E MANAHAN (1973).

No estudo de melão, defrontamo-nos com problemas inerentes ao meio. Melões contém materiais coloridos resultantes da decomposição térmica da sacarose constituindo-se em mais de 22 % de matéria dializável. O peso molecular está na faixa de 10.000 a 50.000 Daltons. Estes compostos coloridos possuem grupos redutores que podem interferir na precisão das medidas baseadas nas propriedades de açúcares redutores em soluções alcalinas. Colóides com cargas positivas e negativas contribuem com aproximadamente 85 % na cor do melão interferindo em métodos colorimétricos a pH variáveis (JANSHEKAR E MOR, 1977).

A técnica que pode ser empregada é o método de HOFFMAN (1937) modificado para minimizar as interferências das impurezas. Segundo o autor, a glicose é oxidada a ácido glucônico com solução de hexacianoferrato (III), de acordo com a equação:



Um sistema automático por análise de fluxo dotado de unidades de diálise por membrana, termostatos, bombas

dosadoras, filtros adequados para leitura de absorbância a 425 nm e registrador foi utilizado por JANSHEKAR E MOR 1977). Os autores empregaram hidróxido de sódio, ao invés de carbonato, para evitar formação de gás carbônico no fluxo. As amostras foram hidrolisadas antes de serem analisadas e o método foi otimizado para açúcares redutores na faixa de concentração de 1 a 9 g/L. Tendo em vista o decréscimo na intensidade da coloração, o método apresentou desvios significativos para amostras com baixa concentração (abaixo de 1 g/L). Estudos de recuperação para diferentes açúcares mostraram que rafinose não pode ser determinada por este método. Os autores justificaram sua menor recuperação devido hidrólise incompleta. Tentativas de aumento de tempo, temperatura ou concentração de ácido para completar a hidrólise levaram à destruição dos monossacarídeos. Sacarose e arabinose apresentaram boa recuperação, seguidos em menor valor pela frutose, galactose e manose.

PASQUINI et al (1985), desenvolveram outro método físico-químico. Os autores determinaram açúcar redutor total em caldo de cana utilizando análise por injeção de fluxo e detecção refratométrica. No sistema, apenas 200 µL de amostra de caldo de cana diluído 1:3, invertido e descolorido com carvão ativo eram introduzidos em fluxo carregador constituído de solução de HCl. Foi observada uma faixa linear de resposta no intervalo de 2-6 % de açúcar redutor, porém a curva de calibração poderia ser utilizada até teores de 10%. Por este método foram possíveis 90 determinações por hora. A comparação com o método colorimétrico de Somogyi-Nelson revelou uma diferença de 2 % entre os resultados

obtidos. A porcentagem de recuperação de adições de sacarose em caldo de cana foi de 99 %.

Muitos outros métodos utilizados na determinação de açúcares redutores são encontrados na literatura, envolvendo reagentes específicos e técnicas físico-químicas. Na Tabela 1, destaca-se uma listagem das publicações nas últimas duas décadas, excluindo-se a grande maioria de métodos enzimáticos e métodos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência.

T A B E L A 1
REVISÃO DE MÉTODOS

ANO	MÉTODO	REFERÊNCIA
1964	Revisão de métodos e aparelhagens para a dosagem de lactose e seus produtos de 1974 hidrólise.	BOSSET, BLANC E PLATTNER
1974	Complexiométrico (EDTA)	SANDELL
1974	Argentimétrico (semi-micro)	SOLIMAN E BELAL
1975	Colorimétrico usando hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico	GRASSERT E OERTEL
1976	Fotométrico com reagente hidrazina fluorescamina	AVIGAD
1976	Fotométrico com 4-amino-3-hidrazina-5-mercaptop-1,2,4-triazol como agente colorimétrico.	REINEFELD et al.
1977	Espectrofotométrico por variação de pH utilizando ácido nitrosalicílico.	MEUR E RAO
1977	Fotométrico usando ácido hidroxinitroantraquinodissulfônico	SOLONIEWICZ E TEODORCZYK
1977	Eletrométrico, com eletrodo seletivo de cobre	PAPASTATHOPOULOS NIKOLELIS E HADJIOANNOU

T A B E L A I (cont.)
REVISÃO DE MÉTODOS

ANO	MÉTODO	REFERÊNCIA
1977	Polarográfico	KRAUSE
1980	Espectrofotométrico - com método indireto usando fenolftalína como reagente.	SHAHINE E MAHMOUD
1981	CLAE - fase reversa	PALLA
1981	Fotométrico com azul de tetrazolium aplicação em cromatografia de permeação em gel	ROBIN E TOLLIER
1981	Espectrofotométrico modificação do método Park-Johnson	PORRO <i>et al.</i>
1981	CLAE usando complexos do borato em cromatografia de troca iônica e 2- cianoacetamida.	HONDA <i>et al.</i>
1982	Espectrofotométrico com outros compostos nitroaromáticos	SOŁONIEWICZ E TEODORCZYK
1982	Fluorométrico pós coluna de CLAE utilizando arginina	MIKAMI E ISHIDA
1982	Electrométrico com eletrodo sensível a periodato	DIAMANDIS E HADJIOANNOU
1983	Amperométrico para detecção em cromatografia líquida	WATANABE E INQUE
1983	Polarografia de pulso diferencial	SULAMAIN E AMIN
1983	Titulométrico usando 4-(5-Bromo-2-piridilazo) 1-3- diaminobenzeno como indicador	BAUDINO E MARONE
1984	Voltamétrico uso de ferricianeto de potássio em análises de fluxo.	HANGOS- MAHR E PUNGOR
1984	CLAE - com coluna derivatizada	WNUKOWAKI
1984	Potenciométrico indireto	PALANIVEL E RIYAZUDDIN
1985	Cromatografia gasosa - determinação simultânea de ácidos aldônicos e aldoses	LEHRFELD
1985	Enzimático com enzimas imobilizadas - determinação simultânea de açúcares por injeção de fluxo	MASOOM E TOWNSHEND

III - MATERIAL E MÉTODOS

III-1. INSTRUMENTAÇÃO

III-1.1. MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Espectros na região do visível foram obtidos inicialmente em um espectrofotômetro Zeiss-M4QIII com indicador PMQ-11 e subsequentemente com um espectrofotômetro Perkin-Elmer-Lambda 3. As medidas foram realizadas em cubetas de vidro de 1,000 cm de espessura.

Espectrofotômetro de absorção atômica modelo SP-90A-series 2 da Pye Unicam foi utilizado para medidas de concentrações dos íons cúpricos.

Espectrofotômetro na região infra-vermelho modelo 267 da Perkin-Elmer foi utilizado para obtenção dos espectros I.V.

III-1.2. MEDIDAS DE pH E POTENCIAL DE REAÇÃO

O pH das soluções foi medido através de pH-metro Beckman modelo SS-2 com eletrodos de vidro e calomelano.

Titulações potenciométricas foram efetuadas neste equipamento utilizando-se eletrodos de platina (Beckman) e tungstênio (Beckman) ou outros eletrodos de cobre, preparados no laboratório. Quando necessário, foi acoplado um registrador

Perkin-Elmer modelo 56 ao potenciômetro.

III-1.3 MEDIDAS ELETROLÍTICAS

Eletrodeposição de cobre sobre eletrodo de platina foi realizada com um aparelho de análise eletrolítica Ederbach Corporation.

III-1.4 MEDIDAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência da Hewlett Packard com detector ultra-violeta (210 nm) e cromatógrafo a gás da Perkin Elmer, Sigma 3D com detector por ionização de chama foram utilizados para identificação de sub produtos de oxidação.

III-2 REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau PA analítico das marcas Merck, Sigma, Baker, Carlo Erba, BDH e Riedel.

III-3 SOLUÇÕES PADRÃO

Solução de ácido clorídrico: a padronização de solução padrão de ácido clorídrico foi realizada segundo BACCAN et al(1979) com carbonato de sódio anidro previamente aquecido em estufa a 270°C por 1 hora. Fenolftaleína e verde de bromocresol foram utilizados como indicadores.

Solução de hidróxido de sódio: foi preparada a partir de solução 50 % (p/p), filtrada em amianto e tratada com cloreto de bário, para eliminar carbonato residual.

Partindo-se de frasco lacrado de lentilhas de hidróxido de sódio, preparamos também solução 50 % (p/p) com água fervida. Filtramos em amianto e 100 mL desta solução foram submetidos ao tratamento com solução saturada de hidróxido de bário, sob agitação constante. Esta solução centrifugada e diluída foi padronizada após um dia de preparação. A padronização foi efetuada em pH-metro, com HCl padronizado e a concentração calculada a partir do ponto de equivalência. Resultados foram comparados com padronização na presença de biftalato de potássio.

Solução de sulfato de cobre: Partindo-se de solução de sulfato de cobre aproximadamente 1,0 molar, transferiu-se uma alíquota de 50,00 mL para o frasco de eletrodeposição. Após diluição, adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 mL de ácido nítrico previamente fervido, para liberação de ácido nitroso. Utilizando 0,5 ampères, agitação constante e 40 minutos, efetuamos eletrodeposição sobre eletrodo de platina (cátodo) previamente tarado. Após este tempo, o volume da solução foi aumentado para recobrir mais uma parte da haste do eletrodo e efetuou-se mais 30 minutos de eletrólise. A solução, completamente incolor, juntamente com a ausência de aparecimento de coloração de cobre sobre a nova porção de platina no eletrodo submerso é uma indicação de eletrólise completa. Os eletrodos lavados e secos apresentaram eletrodeposição homogênea e de aspecto sedoso. Após pesagem do eletrodo, foi calculada a concentração de cobre na solução original.

Algumas soluções diluídas de cobre, obtidas a partir da solução eletrolítica foram padronizadas pelo método iodométrico, segundo PIERCE et al (1958).

Solução de tiossulfato de sódio: preparada com água fervida e utilizando 1,0 mL de clorofórmio/Litro de solução como conservante, a solução foi padronizada com bicromato de potássio previamente dessecado a 200°C . Na presença de ácido e excesso de iodeto, titulou-se o Iodo liberado com tiossulfato de sódio.

Solução de açúcar invertido: 9,5 g de sacarose previamente seca foram dissolvidos em 80 mL de água. Adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico concentrado. A inversão foi esperada ocorrer durante uma semana à temperatura ambiente e só após este tempo, preparou-se uma solução padrão, elevando-se o volume a 1,0 L. A verificação da inversão da sacarose foi realizada por leituras da solução resultante em polarímetro, tendo-se em vista a ocorrência de mudanças no poder rotatório das soluções hidrolisadas. Esta solução ácida mantém-se inalterada por longo período. Alíquotas desta solução devem ser previamente neutralizadas, para não interferirem no meio alcalino da oxidação. A inversão da sacarose a 60°C segue o seguinte comportamento para ocorrer completamente: 17,5 horas em solução 0,01 M HCl; 1,6 horas em solução 0,1 M HCl e 8,7 minutos em solução 0,7925 M HCl.

III-4 MÉTODOS

Para estudo dos açúcares glicose e lactose, determinamos a umidade ,depois de aquecimento em estufa a vácuo a 60-70 °C, conforme método 31.005 do "Official Methods of Analysis" (AOAC - 1984).

Frutose foi seca previamente em estufa a vácuo e deixada em dessecador a vácuo, à temperatura ambiente durante uma semana, para início do trabalho.

Os açúcares foram utilizados sem purificação prévia.

III-4.1 OXIDAÇÃO COM ÍONS CÚPRICOS

III-4.1.1 MÉTODO OFICIAL

Primeiramente foi efetuado um estudo de oxidação de açúcares redutores segundo método de Lane-Eynon (31.042- AOAC).

III-4.1.2 METODOLOGIA ADAPTADA : MÉTODOS VOLUMÉTRICOS

A) Titulação de solução de cobre com açúcar em meio alcalino de concentração variável.

A partir de soluções de açúcar 0,01 M e solução de NaOH padronizada, sem carbonato ,0,700 M preparou-se soluções de NaOH e açúcar na proporção 1:1 em várias concentrações de NaOH .Esta mistura sempre foi preparada poucos minutos antes de se efetuar a determinação. Alíquotas de solução com íons cúpricos diluídas a 25,0 mL foram submetidos à fervura e tituladas com solução de açúcar alcalina, sob agitação

constante. Próximo ao ponto de viragem foi adicionado 1 mL do indicador azul de metileno. Utilizou-se bureta de ponta dobrada para evitar saída de vapores diretamente sobre a torneira.

B) Titulação de solução de açúcar com proporções variáveis de cobre, tartarato e hidróxido de sódio.

Foram preparadas soluções de sulfato cúprico, tartarato duplo de sódio e potássio e hidróxido de sódio, variando-se a proporção de tartarato de 1 a 5 em relação ao cobre. O mesmo foi efetuado com a solução alcalina.

III-4.1.3 DETERMINAÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS EM EXCESSO POR COMPLEXIOMETRIA

Sem utilização de indicadores alíquotas conhecidas de solução de íons cúpricos foram submetidas ao tratamento com teores conhecidos de açúcar, de tal modo que a solução contivesse íons cúpricos em excesso. Dois métodos foram utilizados:

A) Titulação do filtrado obtido da reação em meio ácido tamponado a pH 5,0 com solução padronizada de EDTA, preparada segundo FLASCHKA (1964), utilizando PAN como indicador (viragem de róseo violáceo para verde).

B) Titulação do filtrado obtido da oxidação com açúcar, com solução de EDTA em meio básico utilizando murexida como indicador (viragem de alaranjado para violáceo).

III-4.1.4 DETERMINAÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS EM EXCESSO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.

Soluções de glicose (18 mg) resultantes de titulações na presença de íons cúpricos foram submetidas à filtração do óxido cuproso formado. Os filtrados foram acidificados e diluídos a 50 mL e uma alíquota de 1,00 mL foi diluída novamente a 100 mL. Empregou-se esta diluição para leitura em espectrofotômetro de absorção atômica, nas seguintes condições:

comprimento de onda : 324,8 nm

fenda : 0,1 mm

altura do queimador : 1,0 cm

solução padrão de cobre: preparada a partir de 1000 ppm.

Foi utilizada solução de 5,0 ppm para acerto de absorbância 1,0.

III-4.1.5 TITULAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR NA PRESENÇA DE SACAROSE

Soluções de glicose, sacarose e açúcar invertido foram preparados nas seguintes concentrações:

Glicose (G) = 180 mg/100 mL

Sacarose (S) = 342 mg/100 mL

Açúcar invertido (AI)* = 342 mg/100 mL tratados com HCl, neutralizados e diluídos a 500 mL.

Alíquotas de diversas concentrações de sacarose foram adicionadas a uma quantidade fixa de solução de glicose ou açúcar invertido. A avaliação da alteração da estequiometria foi obtida pela titulação destas misturas com solução de sulfato cúprico, tartarato duplo de sódio e potássio e

hidróxido de sódio nas proporções 1:4:3. Para simplificação da descrição desta mistura oxidante, consideraremos a notação Cu:T:OH onde as cargas serão omitidas, para facilitar a redação.

III-4.1.6 TITULAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR EM EQUIPAMENTO COMERCIAL

Soluções de açúcares 0,01M de glicose, lactose e xilose foram testadas na presença de Cu:T:OH=1:4:3 em aparelho de marca comercial Redutec, da firma Tecnal. Este equipamento foi cedido pelo fabricante para testar o comportamento da reação.

O equipamento é dotado de um sistema de aquecimento por vapor e frasco reator de vidro que sofre agitação contínua pelo borbulhamento de vapor na amostra. O escoamento da amostra titulada contendo o óxido cuproso é efetuado automaticamente por diferença de pressão no frasco reacional. O ponto ideal de aquecimento da amostra foi obtido mantendo-se a caldeira sob fervura constante.

III-4.1.7 ESTUDO DE OXIDAÇÃO DE ALGUNS REDUTORES COM ÍONS CÚPRICOS

Para estudo da extensão da oxidação com cobre na presença de açúcar redutor foram avaliados isoladamente os seguintes compostos : ácido fórmico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido láctico, ácido pirúvico, glicerol, sorbitol e manitol.

Foram preparadas soluções 0,20 M de todos compostos, tomando-se o cuidado de neutralizar as soluções ácidas e tê-los na forma de sal. Alíquotas de 10,00 mL de solução de cobre 0,200M, 2,0 mL de solução de tartarato 2,0 M e 3,00 mL de solução NaOH 2,000 M (Cu:T:OH = 1:2:3) foram adicionados às soluções dos compostos redutores. Após aquecimento em chapa por 5 minutos, diluiu-se a 50,0 mL. Diluições 1:1000 foram submetidas à leitura em espectrofotômetro de absorção atômica.

III-4.1.8 TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS

Foram testados diversos eletrodos na avaliação do ponto final da titulação na oxidação com cobre. Em todas titulações empregamos soluções Cu:T:OH = 1:2:3 ou 1:4:3, com concentração de cobre igual a 0,04 M, preparada no dia da determinação. Foram utilizados os seguintes eletrodos: sulfeto de prata/sulfeto de cobre preparado no laboratório, platina/platina (adaptado no circuito utilizado para determinação biampérométrica do sistema de Karl Fisher, com aplicação de 10 mv), platina/tungstênio, fio de cobre/fio de cobre recoberto com óxido cuproso, cobre/calomelano (com uso de ponte salina) e platina/aço inox.

A montagem do eletrodo de Ag_2S/CuS foi realizada utilizando carvão de pilha como suporte. O carvão foi tratado com HCl por uma noite, após ser submetido a processos de lavagem e polimento da superfície. Após este tratamento, o cilindro de carvão foi encaixado em tubo de teflon, deixando-se

exposto 2,5 cm. Esta parte exposta, sofreu tratamento com solução saturada de sulfeto de sódio, solução saturada de nitrato de prata e solução saturada de sulfato cúprico, intercaladas por lavagens.

Para conectar o eletrodo ao potenciômetro recobriu-se a parte interna da haste de teflon com mercúrio e adaptou-se na interface um fio de cobre. Eletrodo de tungstênio foi adotado como referência.

Eletrodos de aço 316 foram preparados segundo MARTINS E CAPELATO (1983), sendo polidos com lixa de água A-600 entre as determinações. Eletrodo de Tungstênio foi utilizado como referência.

III-4.1.9 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR

2,000 a 5,000 g de amostras alimentícias, previamente secas e trituradas foram tratadas com 50 a 200 mL de álcool etílico 80%, previamente neutralizado com carbonato de cálcio. Carbonato de cálcio foi adicionado à solução para evitar hidrólise do açúcar. Após 1 hora de extração em banho-maria a 75 °C, o álcool foi evaporado até volume mínimo. Foram necessários 2 horas para se detectar ausência de odor alcoólico. As soluções filtradas sofreram adição de água e foram aquecidas a 80 °C para precipitar toda massa insolúvel.

Após adição de acetato básico de chumbo, as amostras foram deixadas em repouso durante 15 minutos e filtradas, acrescentando-se oxalato ao filtrado até precipitação de todo chumbo. Testes negativos de chumbo foram

efetuados e o pH acertado entre 7 e 8. Após diluição a 250 mL, alíquotas de 10,00 mL foram tituladas com solução íons cúpricos 0,04 M na presença de tartarato e hidróxido de sódio.

O mesmo tratamento foi efetuado em amostras, sem adição de carbonato de cálcio, para comparação dos resultados.

Filtrados das amostras clarificadas foram submetidos à inversão da sacarose. Alíquotas de 50,0 mL foram tratadas com 5 mL de HCl concentrado e deixadas em banho maria a 60 °C por 2 horas ou durante 24 horas à temperatura ambiente. Após neutralização foram diluídas a 100 mL e 5,00 a 10,00 mL das amostras foram igualmente tituladas com o sistema oxidante.

III-4.1.10 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO

A verificação da existência de ácido fórmico ou formiato como sub produto da oxidação foi efetuada preliminarmente seguindo a técnica de destilação e reconhecimento descrita por GUAGNINI & VONESCH (1959).

Amostras contendo 18 mg de glicose foram utilizadas para oxidação. Após filtração e lavagem, o filtrado foi acidificado a pH 1,5 e diluído a volume conhecido.

Solução padronizada de ácido fórmico, contendo 1 g HCOOH/100 mL foi utilizada para preparação de curva padrão na avaliação colorimétrica como quelato férrico a 520 nm.

O método baseado na esterificação do ácido fórmico a formiato de etila com subsequente destilação e reconhecimento como perclorato férrico, segundo GUAGNINI E VONESCH (1959) detecta 50 a 500 µg de ácido fórmico sendo que outros ácidos carboxílicos, alfa-ceto ácidos, aldeídos e açúcares redutores

não interferem.

Outro método utilizado para glicose e lactose foi a redução a formaldeído na presença de magnésio em pó e identificação com ácido cromotrópico ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$), segundo GRANT (1948). Na presença de ácido fórmico, a solução torna-se violeta, podendo ser dosada espectrofotometricamente.

III-4.1.11 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Cromatografia em papel

Filtrados aquosos da oxidação de glicose com solução de $Cu:T:OH = 1:2:3$ obtidos de titulações estequiométricas, sem uso de indicador, foram concentradas e adidificadas para aplicação em papel Whatmann no. 1.

Os seguintes sistemas foram utilizados :

A) Para ácidos carboxílicos e ceto-ácidos

Solvente: n-butanol, ácido acético e água (10:2:5:)

Cromatografia descendente e ascendente em camara saturada

Reveladores testados: azul de bromofenol

azul de timol 0,2% + vermelho fenol 0,2%

(manchas de ácido róseo e fundo amarelo)

2,6-diclorofenolindofenol sódico

(apresentando fundo róseo azulado com manchas brancas, após aquecimento, foi o único revelador para ácido 2 ceto glucônico).

Amostras aplicadas : ácido oxálico, ácido 2- cetoglucônico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido tartárico e mistura de

oxidação.

B) Para açúcares:

Solvente: n-butanol, ácido acético e água (10:2:5)

Cromatografia descendente

Revelador: Nitrato de prata/KOH

Amostras aplicadas, açúcares puros, mistura de oxidação.

Cromatografia em camada delgada

Foram testadas placas de celulose (D.C.Alufolien Celulose) placas preparativas de sílica (Kieselgel 60 PF 254-Merck) e placas analíticas de sílica (TLC-Kieselgel 60 GF 254 - Merck).

Após aplicação das amostras em placas preparativas de sílica, previamente ativadas e após eluição e secagem do solvente, parte das placas foram reveladas. Faixas de sílica, de interesse, sem revelação, foram raspadas, extraídas com água, aquecidas e filtradas. Frações aquosas retiradas das placas foram liofilizadas e com o extrato obtido foram preparadas pastilhas de KBr, para leitura em espectrofotômetro infravermelho. Pastilhas transparentes e homogêneas foram utilizadas para registro dos espectros, empregando-se filme de poliestireno para calibração. Espectros foram obtidos com fenda 5, velocidade de varredura lenta e constante de tempo 3.

Cromatografia líquida de alta Eficiência (CLAE)

Sub produtos da oxidação foram submetidos ao estudo para avaliação em CLAE.

Para diminuir a interferência dada pelo tartarato,

preparamos solução de Cu:T:OH na proporção 1:1:3.

Utilizando água Milli-Q, que constitui-se em um sistema da Millipore de tratamento de água para análises em absorção atômica e CLAE, preparamos as soluções iniciais de cobre, tartarato e hidróxido.

As seguintes amostras foram preparadas em água Milli-Q para injeção em CLAE.

Solução padrão de glicose anidra 0,01M,

Solução padrão de frutose seca 0,01 M,

Solução de tartarato 0,2M + OH (1:3),

Solução de tartarato + hidróxido de sódio, na mesma concentração que na amostra, após fervura durante 5 minutos.

Solução filtrada da oxidação estequiométrica de glicose, (36 mg) diluída a 100 mL.

Solução filtrada da oxidação estequiométrica de frutose (18 mg) diluída a 50 mL.

Diluições convenientes em ácido sulfúrico, pH 2,0 foram submetidas à leitura em sistema CLAE isocrático, após filtração em membrana de fase aquosa. A separação foi efetuada em coluna de troca iônica Aminex HPX87-H a 45 °C utilizando ácido sulfúrico 0,01 M como fase móvel. Empregou-se sistema isocrático com detetor de ultravioleta (210nm) e índice de refração em série.

Os cromatogramas obtidos foram comparados com soluções padrões de ácidos, injetados no mesmo dia e nas mesmas condições.

III-4.2 OXIDAÇÃO COM FERRICIANETO DE POTÁSSIO (HCFP)

III-4.2.1 MÉTODO VOLUMÉTRICO

Todas as titulações foram efetuadas com bureta de ponta dobrada para evitar que a torneira ficasse diretamente sobre a saída de vapores da solução.

Em erlenmeyer de 250 mL preparou-se misturas de 5,00 mL de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 0,200 M com alíquotas pre-determinadas de NaOH para obtenção de diversas proporções de OH/HCFP. As soluções foram submetidas a aquecimento sobre chapa elétrica com agitação e titulou-se a mistura fervente com solução de açúcar 0,01 M até descoramento da solução.

III-4.2.2 MÉTODO VOLUMÉTRICO POR POTENCIOMETRIA

Foram utilizados dois procedimentos:

A) conforme item anterior, adicionando solução de 0,5 em 0,5 mL no início e de 0,1 em 0,1 mL próximo ao ponto de equivalência. O ajuste inicial do potenciômetro foi efetuado após fervura da solução, com adição de 1,0 mL do redutor. Sempre que possível, recorreu-se ao uso de erlenmeyer para colocação dos 2 eletrodos, a fim de evitar evaporação demasiada da solução durante a titulação.

B) Titulou-se com solução padrão de hidróxido de sódio soluções de HCFP e açúcar, variando-se os teores de oxidante conforme pontos desejados. Utilizou-se eletrodos de Pt e W, comparando-se o ponto de equivalência obtido potenciometricamente com a viragem visual de alguns indicadores. Foram testados azul de

metileno, fenolftaleína, vermelho neutro e 2,6-diclorofenolindofenol sódico como indicadores. A técnica empregada foi a mesma descrita anteriormente.

III-4.2.3 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

A) Estudo da lactose:

Em balão volumétrico de 50 mL adicionou-se 5,00 mL de solução de HCFP 0,200 M, água destilada e alíquotas variáveis de hidróxido de sódio 0,400 M. A adição de NaOH diretamente à solução de HCFP acarretava uma mudança de coloração original. Portanto, a diluição antes da adição de NaOH foi uma etapa obrigatória. Alíquotas constantes ou variáveis de solução de lactose 0,01M foram juntadas ao balão volumétrico e diluídas. Os balões com tampa foram submersos em banho maria a 95 °C durante o tempo desejado (5 minutos a 1 hora), e agitados casualmente. Depois de resfriados, foram diluídos a 50 mL e homogeneizados. Alíquotas de 2,00 mL foram em seguida diluídas a 50 mL e submetidas à leitura espectrofotométrica a 420 nm contra água. Brancos específicos para cada tipo de estudo foram preparados, sem oxidante. As leituras foram efetuadas com fenda 0,3 mm (largura de banda espectral de 7,5 nm).

B) Estudo de outros redutores:

Soluções estoque de ácido fórmico, ácido oxálico, manitol, tartarato, ácido láctico, sacarose, ácido pirúvico, sorbitol e glicerol foram preparadas na concentração de 0,025M.

Em balões volumétricos de 50,0 mL foram adicionados

10,00 mL de cada um dos redutores acima, 5,00 mL de HCFP 0,200 M, 10,00 mL de água 3,20 mL de NaOH 0,408 M. Os frascos foram submetidos ao aquecimento em banho maria a 95 °C por 10 , 30 ou 50 minutos. Após resfriamento e diluição, retirou-se alíquota de 2,00 mL e diluiu-se a 50,0 mL. A solução assim obtida foi lida a 420 nm contra água e corrigida com a média de 3 brancos.

III-4.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Dados da relação cobre/açúcar foram obtidos de 3 a 6 determinações e submetidos ao teste Q para rejeição de resultados. Após o teste dos valores suspeitos, foi calculada a média das determinações a cada condição para os valores x incluídos, a diferença entre cada valor x , a média aritmética $\bar{x}$ de todos eles e em seguida $(x - \bar{x})^2$ (BACCAN et al., 1979).

O desvio padrão fornecido pela equação:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

onde n = número de determinações (graus de liberdade), calculado para cada condição, foi utilizado pelo cálculo do desvio padrão da média S_m dado pela equação:

$$S_m = \pm S / \sqrt{n}$$

O intervalo de confiança da média foi obtido a partir de

$$u = \bar{x} \pm t S / \sqrt{n} \quad \text{ou} \quad u = \bar{x} \pm t S_m$$

onde t variou conforme graus de liberdade n e foi retirado de tabelas para 95 % de probabilidade ou 95 % de confiança.

IV- R E S U L T A D O S E D I S C U S S Ã O

IV-1 OXIDAÇÃO DE AÇÚCAR POR ÍONS CÚPRICOS

IV-1.1. MÉTODO OFICIAL

A etapa preliminar consistiu em dominar a técnica oficial do método de Lane-Eynon e avaliar a estequiometria obtida experimentalmente.

Amostras contendo 50,0 mg de glicose em 30 mL de água foram testadas com 25 mL de solução Soxhlet A e B (1:1) e obteve-se para B repetições estequiometria média de 4,93, valor este bem próximo ao calculado da tabela de Lane-Eynon.

Cálculos das concentrações das soluções propostas pelos autores indicam que a proporção Cu:T:OH é de 1:4,4:9,0.

IV-1.2 METODOLOGIA ADAPTADA: MÉTODOS VOLUMÉTRICOS E ESPECTROFOTOMÉTRICOS

IV-1.2.1 TITULAÇÃO DE COBRE COM SOLUÇÃO DE AÇÚCAR EM MEIO ALCALINO DE CONCENTRAÇÃO VARIÁVEL.

Avaliou-se a influência da concentração da base no desempenho da oxidação titulando-se solução de cobre com mistura 1:1 de solução de glicose e hidróxido de sódio. Com o volume gasto na titulação, calculou-se a relação Cu/açúcar. A Tabela II mostra os resultados obtidos para a glicose, sendo que

TABELA II - ESTUDO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO Cu(II)/G
EM FUNÇÃO DO MEIO ALCALINO (*)

OH /Glicose	Cu(II)/Glicose
4,5	1,80
5,0	2,00
5,5	2,20
6,0	2,36
7,0	2,72
8,0	3,14
9,0	3,51
10,0	4,05
11,0	4,20
12,0	4,20
14,0	4,55
16,0	5,07
18,0	4,96
20,0	4,73

(*) Dados obtidos na presença de tartarato adicionado ao erlenmeyer, na proporção Cu:T=1:4,4 e com titulação de solução de íons cúpricos com mistura 1:1 de solução de açúcar:NaOH.

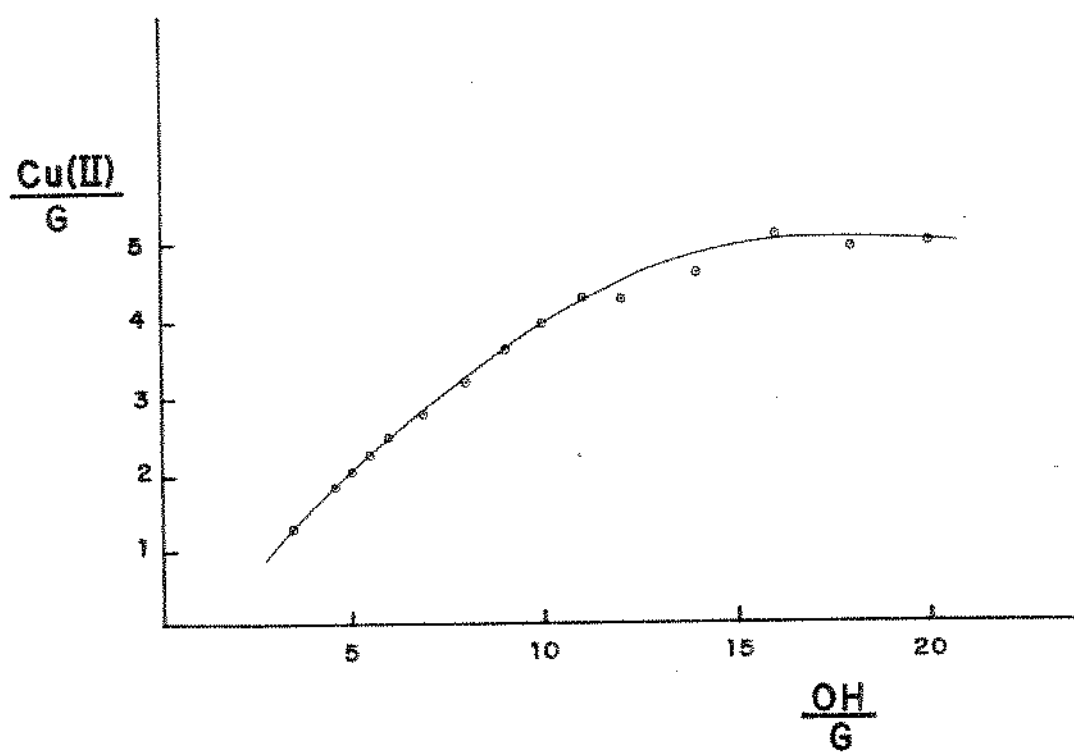


FIG. 1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO ALCALINO
NA OXIDAÇÃO DE SOLUÇÃO DE GLICOSE

Dados obtidos através de titulação de
solução de íons cúpricos com mistura
1:1 de solução de glicose:NaOH.

a proporção de tartarato utilizada neste experimento foi de Cu:T= 1:4,4. A Fig. 1 realça a tendência da oxidação de glicose permanecer próximo de 5,0 a valores elevados de alcalinidade.

IV-1.2.2 TITULAÇÃO DE SOLUÇÃO DE AÇÚCAR COM MISTURA DE SOLUÇÃO DE Cu:T:NaOH EM PROPORÇÕES VARIÁVEIS .

$1,0 \times 10^{-4}$ mol de glicose foram submetidos ao tratamento com soluções de concentrações diferentes da utilizada pelo método oficial. Através dos dados obtidos com misturas de açúcar e hidróxido de sódio pode-se claramente denotar que a concentração da solução alcalina é um fator predominante no controle da estequiometria. Porém, a estabilidade do reagente afeta a determinação e seria interessante a obtenção de uma mistura oxidante eficiente que pudesse ser armazenada por longo período , pronta para o uso. Tendo em vista este objetivo iniciou-se o estudo através do preparo de mistura de solução contendo íons cúpricos, tartarato duplo de sódio e potássio e hidróxido de sódio em diversas proporções.

Na presença de azul de metileno a ausência de coloração azul na solução contendo óxido cuproso indicou o final da titulação.

Titulações sem indicador e com 2,6-diclorofenolindofenol sódico, que apresenta o potencial de oxirredução próximo ao azul de metileno, foram realizadas observando-se os seguintes matizes na solução titulante :

sem indicador : azul esverdeado, verde claro, verde escuro, -verde garapa, verde amarelado, marrom claro e marrom avermelhado.

Em presença de 2,6-diclorofenolindofenol sódico: róseo-violáceo, cinza claro, cinza esbranquiçado, verde claro, marrom claro, vermelho tijolo.

A tabela III mostra a relação íons cúpricos/açúcar para alguns sacarídeos em concentrações variadas de mistura oxidante. Após tratamento estatístico detectou-se desvio padrão entre 0,07 e 0,27, situando-se os intervalos de confiança da média entre 0,01 e 0,18 para proporções Cu:OH = 1:3. A estequiometria Cu/açúcar para hexoses como glicose, sorbose, frutose, manose e galactose, para proporção Cu:OH=1:3 situou-se na faixa de 4:1. Sorbose apresentou valores mais baixos.

Soluções de mistura de oxidante 1:1:3 mostraram-se instáveis, havendo necessidade de maior concentração do complexante. Proporções 1:2 entre cobre e tartarato apresentaram-se bem estáveis, sem denotar variação na estequiometria de oxidação, fornecendo na prática boa visualização do ponto de viragem. A titulação das hexoses exigiu em média 5 minutos de reação.

Concentrações de NaOH um pouco acima da proporção Cu:OH:1:3 levaram a resultados de estequiometria discrepantes. Resultados obtidos para galactose já indicaram estequiometria bem diferente. Para as hexoses estudadas, parece ser limitante, na concentração de cobre empregada, a proporção 1:3 entre o oxidante e o meio básico.

Um estudo mais detalhado com grande número de soluções oxidantes de diversas concentrações foi efetuado para lactose, representada nas tabelas pelo símbolo La (Tabela IV).

A amostra de açúcar em erlenmeyer foi titulada

TABELA III

OXIDAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COM MISTURA Cu: T: OH

AÇÚCAR	Cu:T:OH [Cu] = 0,04M	<u>Cu(II)</u> (*) Açúcar	INTERVALO CONFIANÇA DA MÉDIA
GLICOSE	1: 1,0 :3,0	4,09	0,18
	1: 2,0 :3,0	3,96	0,12
	1: 4,0 :3,0	4,08	0,16
	1: 4,5 :3,2	3,66	0,18
MANOSE	1: 1,75:3,0	4,29	0,18
	1: 2,0 :3,0	4,17	0,13
	1: 4,5 :3,2	3,83	0,21
SORBOSE	1: 1,75:3,0	3,67	0,17
	1: 4,5 :3,2	3,12	0,34
FRUTOSE	1: 2,0 :3,0	4,10	0,10
	1: 4,5 :3,2	3,47	0,10
GALACTOSE	1: 1,75:3,0	3,85	0,11
	1: 2,0 :3,0	4,17	0,09
	1: 4,5 :3,2	5,76	0,43

(*) Média de 6 determinações

pela mistura oxidante mantendo-se o volume inicial ao redor de 30 mL. Análises das amostras mostraram que a cinética da reação é alterada, tornando-se bem mais lenta que a oxidação normal.

Os resultados mostram que na equação exata de estequiometria $\text{Cu:OH} = 1:2,25$ é impossível ocorrer oxidação. Iniciou-se o estudo com 1:2,5 que ainda não forneceu meio alcalino suficiente à oxi-redução. Só a partir de valor 2,75, foi possível efetuar a titulação. À medida que a concentração de hidróxido de sódio na mistura oxidante aumenta, observa-se menor estabilidade da solução. Todas soluções na proporção 1:5 de Cu:OH apresentaram durante a titulação escurecimento da solução em contato com vapor e depósitos alaranjados em repouso. Após poucas semanas observou-se óxido cuproso no frasco em que se encontravam guardadas, evidenciando a instabilidade. Soluções preparadas com proporções até 1:4:4 de Cu:T:OH após 6 meses de estoque à temperatura ambiente, apresentaram-se azul límpidas, sem qualquer depósito. A estabilidade de soluções oxidantes com proporções variáveis de tartrato e base pode ser verificada na Tabela V.

É possível estabilizar o reagente utilizando proporção mínima Cu:T de 1:3,5, mesmo para uso prolongado, sem necessidade de guardar o frasco em geladeira.

Todas soluções mais concentradas em termos de meio alcalino, além de serem preparadas no momento do uso, foram refrigeradas enquanto se processavam os trabalhos.

Pela tabela IV observa-se que o aumento da alcalinidade do meio altera a estequiometria da lactose para valores mais baixos.

TABELA IV

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA OXIDAÇÃO DA LACTOSE EM MISTURAS
DE OXIDANTE DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES

Cu:T:OH	Valor médio(*) Cu(II)/La	intervalo da média	confiança
1:2,0:2,50	**		
:2,75	6,54	1,09	
:2,90	6,46	0,21	
:3,00	6,26	0,51	
:3,20	6,30	0,30	
:3,80	6,22	0,45	
1:2,5:2,50	**		
:2,75	6,34	1,34	
:3,00	6,83	0,64	
:3,50	6,30	0,85	
:4,00	6,50	0,86	
:4,50	5,99	0,08	
:5,00	5,86	0,62	
1:3,0:2,50	**		
:2,75	6,45	0,23	
:3,00	6,84	0,29	
:3,50	6,75	0,43	
:4,00	6,54	0,33	
:5,00	5,87	0,60	
1:3,5:2,50	**		
:2,75	7,05	0,24	
:3,00	6,91	0,46	
:3,50	6,62	0,30	
:4,00	6,35	0,66	
:5,00	6,17	0,99	

(*) Média de 4 determinações

(**) Não ocorre oxidação

TABELA IV (continuação)

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA OXIDAÇÃO DA LACTOSE EM MISTURAS
DE OXIDANTE DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES

Cu:T:OH	Valor médio(*) intervalo de confiança	
	Cu(II)/La	da média
1:4,0:2,50	**	
:2,75	6,57	0,26
:3,00	6,15	0,15
:3,50	6,49	0,34
:4,00	6,22	0,09
:4,50	6,06	0,26
:5,00	6,29	0,36
1:4,5:2,50	**	
:2,55	**	
:2,75	6,36	0,48
:3,00	6,96	0,66
:3,20	6,00	0,31
:3,50	6,86	0,57
:4,00	4,85	0,63
:5,00	4,85	0,31
1:5,0:2,50	**	
:2,75	6,50	1,00
:3,00	7,01	0,36
:3,50	6,55	0,60
:4,00	6,12	0,23

(*) Média de 4 determinações

(**) não ocorre oxidação

Os desvios padrões calculados variaram de 0,03 (1:4:4) a 0,73 (1:2,5:2,75). Os maiores desvios padrões foram observados com o uso de soluções oxidantes que apresentavam proporções menores de tartarato e base, devendo-se evitar uso de soluções Cu:OH 1:2,5 ou 1:2,75.

Por motivos de estabilidade das soluções iniciais devemos evitar também o uso de soluções Cu:OH = 1:5.

Titulando-se solução 0,01M de açúcar com solução de cobre 0,04M na proporção 1:4:3 (Cu:T:OH) temos na prática que para cada 10,0 mL de solução de açúcar, a adição de excesso de 1 gota do titulante acarreta uma variação de 0,02 na estequiometria, ou seja, 0,5% do valor esperado. Assim, a adição de 0,5 mL além do permitido, de fácil ocorrência pela má detecção do indicador, pode levar a erros de 5%.

Observamos também que se colocarmos indicador próximo ao ponto de viragem, como recomenda Lane - Eynon, ou seja, quando a solução está bem vermelha, há gasto excessivo de solução titulante. A prática levou-nos a uma melhor visualização da viragem quando adicionamos indicador após adição da metade do volume total, quando o óxido presente caracteriza-se pela coloração alaranjada. A solução deve estar sempre fervendo para eliminar bolhas de ar em contato com o indicador e nenhuma gota de água deve ser adicionada durante a titulação. Oxidação da lactose deve ser efetuada em tempo maior que o gasto para a glicose, mantendo-se o ajuste de aquecimento da chapa sempre no mesmo ponto para se evitar erros. O sistema de oxidação é complexo e além de requerer condições padrões para que se minimizem os erros, exige

TABELA V

ASPECTO DE SOLUÇÕES OXIDANTES DE ÍONS CÚPRICOS
APÓS SEIS MESES DE ESTOCAGEM À TEMPERATURA AMBIENTE

Cu : T : OH			ASPECTO DA SOLUÇÃO
1	: 1	: 3	depósito alaranjado
1	: 2	: 3	azul límpido sem depósito
1	: 3	: 3,5	elevada quantidade de depósito
1	: 3	: 5	depósito alaranjado
1	: 3,5	: 2,75	sem depósito
1	: 3,5	: 3	sem depósito
1	: 3,5	: 3,5	azul límpido, sem depósito
1	: 3,5	: 5	depósito alaranjado
1	: 4	: 2,75	solução límpida
1	: 4	: 3	azul límpido, sem depósito
1	: 4	: 3,5	azul límpido, sem depósito
1	: 4	: 4	azul límpido, sem depósito
1	: 4	: 5	depósito alaranjado
1	: 4,5	: 3	azul límpido, sem depósito
1	: 4,5	: 3,5	solução sem depósito

do operador habilidade visual para detecção do ponto final da oxidação.

Bons resultados foram obtidos com soluções

$\text{Cu}:\text{T:OH} = 1:2,5:4,5 ; 1:4,0:3,0 ; 1:4,5:3,2$. O primeiro valor, no entanto, pode ser eliminado pela instabilidade do reagente, restando as duas outras opções.

IV-1.2.3 TITULAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR NA PRESENÇA DE SACAROSE

Para o estudo da influência da sacarose na titulação de açúcar redutor foi testado inicialmente reação negativa com solução de cobre. Concentrações da ordem de 100 mg submetidas à titulação com solução $\text{Cu}:\text{T:OH} = 1:2:3$ não apresentaram qualquer indício de oxidação. Amostras nas concentrações 1×10^{-4} mol de glicose sofreram adição de solução de sacarose e misturas 1:1 dos dois açúcares foram testadas. A Tabela VI mostra o comportamento estequiométrico para $\text{Cu:OH} = 1:3,0$. Não se observou alteração dos resultados obtidos com açúcar puro (Tabela III).

A Tabela VII revela o comportamento da oxidação de glicose na presença de teores de sacarose em proporções até o dobro de sua concentração inicial. Açúcar invertido também foi testado por esta mesma mistura oxidante, bem como seu comportamento na presença de sacarose. Os dados da Tabela VIII mostram que sacarose, na proporção 1:1 e 1:2 a baixos níveis de concentração de açúcar invertido não interferem sensivelmente na estequiometria. Calculando-se a relação Cu/A.I. pela tabela de Lane-Eynon, para 15 mL de Solução Soxhlet, encontramos o valor 4,95.

TABELA VI

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE ADIÇÃO DE SACAROSE A SOLUÇÃO DE GLICOSE
NA ESTEQUIOMETRIA DE OXIDAÇÃO COM COBRE EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS
DE MISTURA DE OXIDANTE

Cu:T:OH	Cu/AÇÚCAR (*)	INTERVALO DE CONFIANÇA DA MÉDIA
1:1,0 :3,0	4,16	0,15
1:1,1 :3,0	4,32	0,01
1:1,5 :3,0	4,20	0,37
1:1,75:3,0	4,19	0,13
1:2,0 :3,0	3,93	0,19
1:4,0 :3,0	3,97	0,15

(*) Média de 5 determinações

Amostra : G + S (1:1)

TABELA VII

COMPORTAMENTO DA ESTEQUIOMETRIA DE OXIDAÇÃO DE GLICOSE NA

PRESENÇA DE SACAROSE COM SOLUÇÃO Cu:T:OH = 1:4:3

A Ç Ú C A R	(*) Cu/G	INTERVALO DE CONFIANÇA DA MÉDIA
G (1x10 ⁻⁵ e 2x10 ⁻⁴ moles)	3,94	0,09
G (2x10 ⁻⁴ mol)	3,94	0,09
G + S (1:1,0)	3,98	0,16
G + S (1:1,5)	3,90	0,20
G + S (1:2,0)	3,96	0,19
G + S (2:1,0)	3,90	0,04

* Média de 5 determinações

TABELA VIII

TITULAÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO (A.I.) COM SOLUÇÃO DE

Cu:T:OH = 1:4:3 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE SACAROSE

A Ç Ú C A R	* Cu/A.I.	INTERVALO DE CONFIANÇA DA MÉDIA
A.I. (1,0 x 10 ⁻⁴ mol)	4,00	0,08
A.I. (1,5 x 10 ⁻⁴ mol)	3,85	0,19
A.I. (5,0 x 10 ⁻⁵ mol)	4,04	0,18
A.I. + S (1:1)	3,99	0,20
A.I. + S (1:2)	3,82	0,36

* Média de 5 determinações.

IV-1.2.4 TITULAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR EM EQUIPAMENTO COMERCIAL

Efetuu-se o estudo de oxidação de açúcar redutor em um equipamento comercial segundo ítem III-4.1.6, com a finalidade de verificar se os resultados obtidos com o método modificado se adequavam e se reproduziam no sistema comercial disponível. Soluções de aldose, pentose e dissacarídeos foram testadas neste equipamento. Utilizou-se oxidação com solução de $\text{Cu:T:OH}=1:4:3$. O tempo de titulação para cada determinação foi de 4 a 7 minutos, não havendo neste caso, problema de evaporação da amostra. Níveis de 1×10^{-5} mol de glicose, foram titulados sem problema, conservando a estequiometria $\text{Cu:G}=4:1$ (Tabela IX).

Observa-se pelos resultados da tabela que, através de dados de intervalo de confiança da média, valores anteriormente obtidos foram reproduzidos.

IV-1.2.5. DETERMINAÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS EM EXCESSO POR COMPLEXIOMETRIA.

Considerando a relação $\text{Cu:EDTA}=1:1$ estudou-se a possibilidade de titular cobre (II) em excesso no meio alcalino da oxidação de glicose, como um segundo parâmetro na avaliação da estequiometria da reação.

HENNART (1965) propôs a determinação de glicose pela medida da quantidade de EDTA liberada de seu complexo de cobre (II), após redução de cobre (II) a óxido de cobre(I). A medida, feita sem filtração, pela titulação de EDTA com solução de sulfato cúprico faz uso de murexida como indicador, com viragem brusca e

TABELA IX

TITULAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COM SOLUÇÃO DE

Cu:T:OH = 1:4:3 , EM EQUIPAMENTO COMERCIAL

AÇÚCAR	QUANTIDADE DE AÇÚCAR (mg)	(*) <u>Cu (II)</u> AÇÚCAR	INTERVALO DE CONFIANÇA DA MÉDIA
GLICOSE	1,8	4,00	0,03
	9,0	3,84	0,30
	18,0	4,08	0,23
	27,0	4,19	0,06
XILOSE	18,0	4,34	0,28
LACTOSE	18,0	6,04	0,07
	36,0	6,16	0,30

* Média de 4 determinações

[Cu⁺²] = 0,04M

perfeita. Neste caso, o EDTA atua como agente quelante, não havendo interferência por uso do tartarato. O autor recomenda o método apenas para a faixa de 5 a 25 mg de glicose.

Inicialmente realizou-se determinações em meio ácido.

O óxido cuproso formado dissolve-se em pH ácido e não é possível efetuar determinação de íons Cu(II) em solução sem prévia filtração. Por outro lado, partículas de óxido cuproso apresentam-se finamente divididas, retidas apenas por filtros de placa porosa de classificação ultra-fina, o que torna a preparação da amostra extremamente morosa. A titulação a pH 4,7, na presença de PAN, como indicador apresentou coloração inicial róseo no sobrenadante devido à presença de tartarato. A viragem para verde é de difícil visualização. Cálculos de estequiometria de oxidação por este método chegaram a valores próximos de 3,5 para a glicose, com difícil reprodutibilidade. Minúsculas partículas de óxido cuproso em solução podem se fazer presentes e ocasionam uma reoxidação muito rápida, levando a valores errôneos.

Para evitar modificação do pH do meio após oxidação, recorreremos ao uso de murexida como indicador. Titulações com murexida dão viragem de vermelho para verde no sobrenadante. Diluições das amostras para tornar o pH do meio entre 8 e 10 tornaram-se necessárias. No entanto, resultados de estequiometria não foram ainda satisfatórios, chegando a valores 3,7.

Um terceiro indicador foi testado: Ponceau 3R, que a pH 9,0 fornece viragem de verde para róseo com EDTA. Em presença de tampão borato, detectou-se que esta titulação, sem prévia filtração, é mascarada pela coloração do óxido cuproso, tornando-se róseo-alaranjado. Já alíquotas da reação apresentaram viragem

a rosa-violáceo.

Existe uma tendência dos pesquisadores que estudam oxidação de glicose por íons Cu(II) em não isolar o óxido cuproso da reação, etapa que torna o método muito moroso.

STREET (1958) propôs a determinação de açúcar redutor com EDTA na presença de tartarato empregando solução de cobre 1,5 mg/mL.

Amostras de glicose tituladas com solução de $\text{Cu:T:OH} = 1:2:3$ foram diluídas até pH 8,0 e novamente tituladas com solução de EDTA 0,005M conforme STREET (1958). A mudança de alaranjado para róseo chegando à cor púrpura no ponto final foi observada nitidamente em presença de teores inferiores a 10 mg de açúcar. Para teores superiores, com maior formação de óxido cuproso, a viragem é menos perceptível. Utilizou-se uma placa iluminada internamente para melhor visualização. A cor púrpura formada desaparece gradualmente, dependendo da quantidade de óxido cuproso presente. Quando o ponto de viragem é muito difícil, uma nova diluição se faz necessária. Não obtivemos resultados conclusivos, para indicar a complexometria como boa monitoração da oxidação de açúcares através da determinação de íons Cu(II) em excesso. A presença de íons interferentes na água destilada também pode afetar os resultados. Dentre eles pode-se destacar íons cálcio, tornando-se necessário o tratamento prévio da amostra e uso de água deionizada.

IV-1.2.6 DETERMINAÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS EM EXCESSO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A técnica de espectrofotometria de absorção atômica pode ser utilizada para quantificar o teor de íons em solução. Pelo fato do equipamento ser de fácil acesso, recorreremos à utilização deste equipamento com a finalidade de detetar a estequiometria da reação via dosagem utilizando excesso de íons cúpricos.

Soluções de glicose anidra e frutose seca foram tituladas com solução $\text{Cu}:\text{T:OH} = 1:2:3$. Amostras contendo o volume estequiométrico previsto e amostras contendo +1 e -1 mL de mistura oxidante, foram avaliadas segundo metodologia descrita no item III-4.1.4. O valor médio estequiométrico obtido através desta técnica foi 4,12 para $\text{Cu(II)}/\text{glicose}$ e 4,09 para $\text{Cu(II)}/\text{frutose}$. Volumes superiores ao estequiométrico levaram à obtenção de valores inferiores e vice-versa.

Embora a técnica seja mais sofisticada, a sua utilização, ao contrário da determinação complexiométrica levou à conclusões comprobatórias da estequiometria para glicose e frutose na oxidação com íons cúpricos.

IV-1.2.7 ESTUDO DE OXIDAÇÃO DE ALGUNS REDUTORES COM ÍONS CÚPRICOS

A extensão de oxidação de íons cúpricos pode ser avaliada através do estudo de alguns compostos redutores, de tal modo que o comportamento destes compostos frente ao agente oxidante pode ser extrapolado para o estudo do comportamento de oxidação de sub-produtos de reação.

Seguindo metodologia descrita no item III-4.1.7 estudamos o efeito da oxidação de alguns compostos com $\text{Cu:T:OH} = 1:2:3$, baseado num meio ideal para ocorrer oxidação. Tartarato foi considerado como branco e submetido à leitura a frio e após aquecimento. Resultados de amostras acidificadas, analisadas por espectrofotometria de absorção atômica indicaram sorbitol e manitol como compostos suscetíveis à oxidação. Ácido pirúvico, ácido láctico, ácido fórmico, glicerol e sacarose forneceram poder redutor nulo. Manitol e sorbitol apresentaram leve poder redutor.

IV-1.2.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Testou-se aplicação do método para amostras contendo 1 a 50 mg de glicose. Não se obteve boa reprodutibilidade com amostras contendo teores inferiores a 9,0 mg de açúcar, representando níveis abaixo de 5×10^{-5} mol de glicose.

Amostras com teores acima de 50 mg de glicose, se presentes em solução extremamente diluída, fornecem problemas de viragem e necessita-se demanda de muito tempo para determinação, tornando-se às vezes inviável. O ideal é enquadrar esta alíquota contendo esta faixa de teor de açúcar redutor em até 25 mL de solução a ser titulada.

A faixa ideal de trabalho situou-se ao redor de 20 mg de açúcar redutor, onde são gastos ao redor de 10,0 mL de solução titulante. Para a lactose, a faixa ideal apresentou-se ao redor de 35 mg.

Lane e Eynon (1925, 1927, 1931) discutiram o efeito da presença de cálcio nas soluções de açúcar. Acetato de chumbo

neutro remove diversas substâncias, mas não açúcar invertido. A retirada de cálcio pode ser efetuada por adição de oxalato de potássio. Esta eliminação também pode ser realizada pela adição de EDTA.

Se a retirada de íons cálcio não for efetiva, no método modificado acentua-se tão fortemente que soluções de açúcar clarificado, após a primeira gota de solução de cobre, tornam-se esbranquiçadas, impossíveis de serem tituladas. Quando isto ocorre faz-se necessário um segundo tratamento com oxalato, seguido de filtração.

Segundo metodologia já descrita, extraiu-se açúcares redutores de amostras alimentícias e clarificou-se segundo método oficial e modificado. Amostras contendo sacarose, nos teores indicados também foram avaliadas para se julgar as diferenças. Amostras contendo teores elevados, acima do dobro da concentração de açúcar redutor, apresentaram grandes desvios. Já na faixa menor, as diferenças não foram significativas (Tabela X).

Amostras tituladas visualmente, em teores variados de açúcares foram estudados para cálculo de níveis de recuperação. Neste experimento utilizou-se açúcares padrões (Tabela XI).

IV-1.2.9 EQUAÇÕES

Equações possíveis para oxidação de lactose na presença de cobre em meio alcalino com tartarato são indicadas a seguir.

Na prática vimos que na estequiometria é impossível ocorrer oxidação, portanto é necessário um leve excesso de meio alcalino para que a reação se inicie.

Dentre as equações propostas são prováveis as

TABELA X

Teores de açúcar redutor determinados pelo método
oficial de Lane-Eynon e pelo método modificado

Amostra	teor de sacarose	Lane-Eynon	% açúcar redutor	
			mét. modificado	
A	isenta	5,32	5,35	0,01
B	isenta	9,47	9,49	0,01
C	isenta	3,15	3,13	0,01
D	34,65	6,46	7,59	0,01
E	30,52	4,13	4,96	0,02
F	34,16	9,31	9,81	0,02
G	33,88	12,56	13,14	0,02
H	21,00	11,55	11,60	0,02

TABELA XI
RECUPERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES
PELO MÉTODO DE OXIDAÇÃO COM ÍONS CÚPRICOS

Teor de açúcar		Faixa de recuperação
GLICOSE	1 mg	96,1 - 85,0 %
	9 mg	101,1 - 99,7
	18 mg	98,6 - 99,8
	50 mg	97,0 - 95,1
	100 mg	89,5 - 87,3
FRUTOSE	18 mg	101 - 99,8
	36 mg	101,2 - 99,5
	50 mg	98,1 - 96,5
AÇÚCAR	9 mg	100,7 - 99,0
INVERTIDO	18 mg	102 - 99,5
	36 mg	99,8 - 99,1
	50 mg	98,6 - 96,3
LACTOSE	17 mg	102 - 98,7
	34 mg	100 - 99,8
	50 mg	98,4 - 98,2
	120 mg	89,3 - 88,9

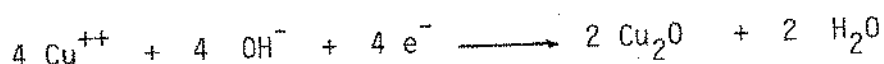
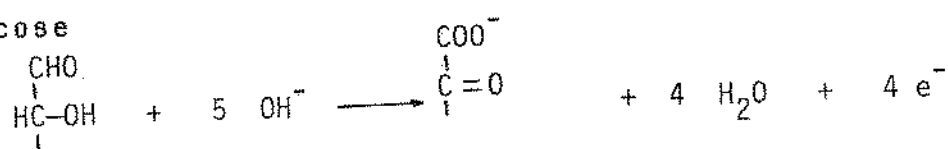
Mistura complexante: Cu :T:OH = 1:2:3

equações envolvendo 13 ou 15 OH. Relação Cu(II):OH para equações (2), (3), (6), (7) e (9) é 2,5 enquanto as equações (4), (5), (8) e (10) apresentam valores 2,25; 2,17; 2,37 e 3,5 respectivamente.

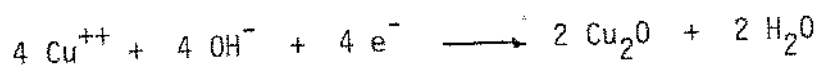
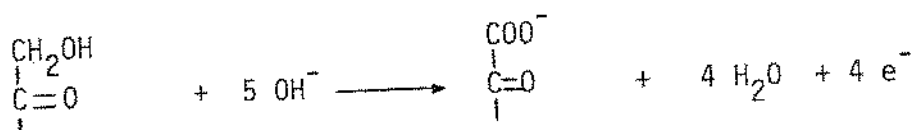
Para frutose e glicose, reações envolvendo 4 elétrons podem ser expressas similarmente como as de lactose, no qual se enfoca a parte redutora da molécula.

São prováveis equações envolvendo 10 OH que resultam formiato e carboxilato em solução ou ainda podemos escrever as seguintes equações :

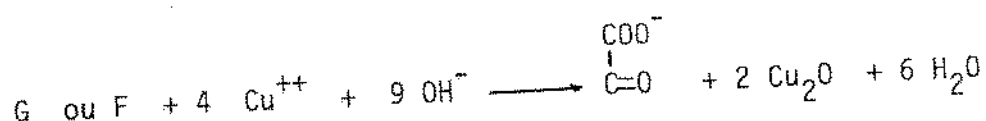
Para glicose



Para frutose

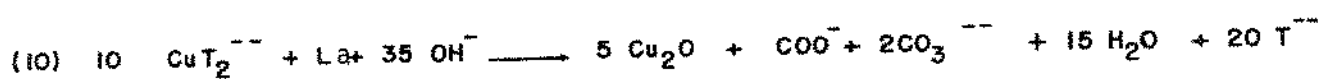
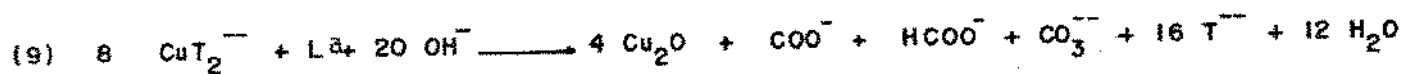
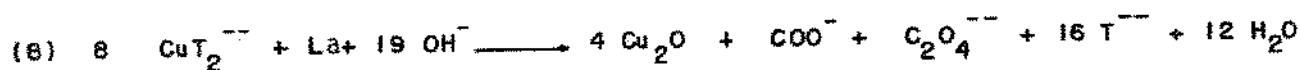
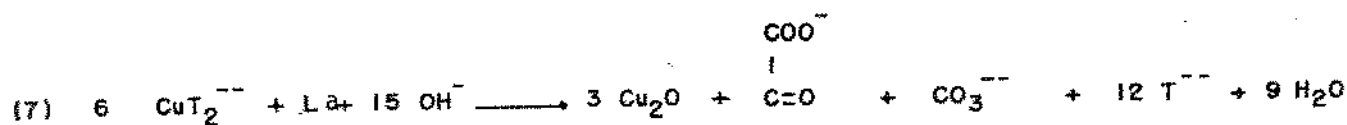
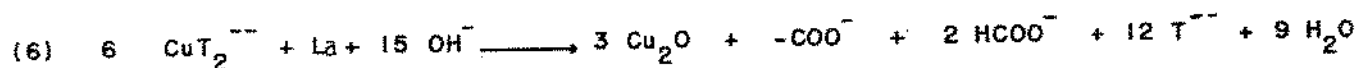
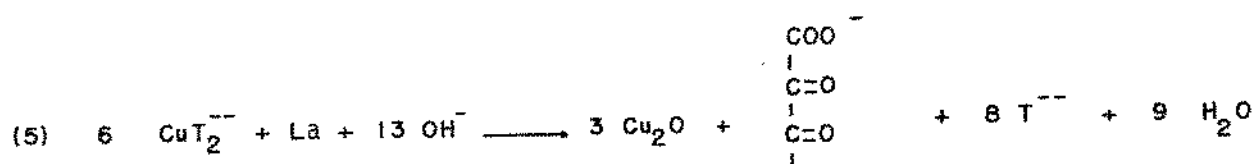
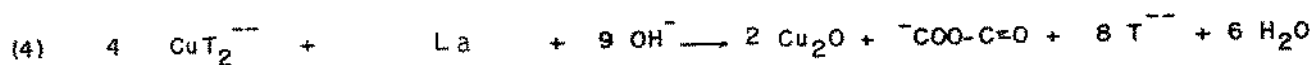
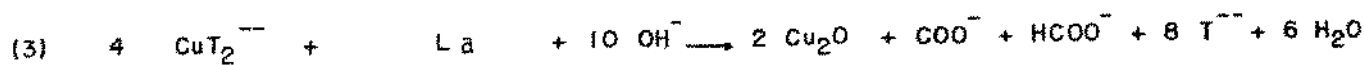
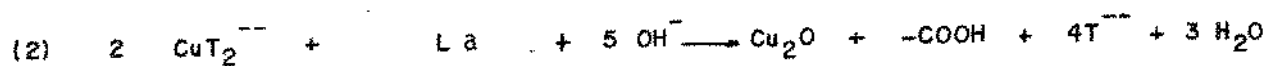
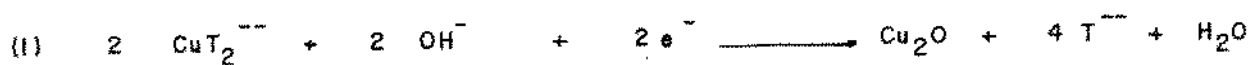


A representação global das equações será :



Acompanhamento da reação com cromatografia em camada delgada ou cromatografia em papel apresentaram sistema álcool butílico:ácido acético:água, Rf bem distintos para ácido oxálico

EQUAÇÕES PARA OXIDAÇÃO DE LACTOSE COM ÍONS CÚPRICOS



(0,52), tartárico (0,43), cetoácidos (como 2-cetoglucônico - Rf 0,18), glicose (0,26), frutose (0,31), lactose (0,13), galactose (0,24). Sacarose e ácido fórmico não apareceram na revelação.

A revelação para açúcares e outros polióis foi efetuada mergulhando-se o cromatograma em solução de nitrato de prata saturado em acetona-água e, em seguida, mergulhando o cromatograma em solução de NaOH. Imediatamente evidencia-se a presença de manchas marrom metálica para açúcares redutores.

A revelação para açúcares em cromatografia descendente em papel mostrou ausência total de açúcar na estequiometria da reação de oxidação com cobre (II).

Placas preparativas contendo compostos da mistura de oxidação de glicose, previamente eluídos foram separados e produtos da reação sofreram processo de liofilização. Espectros I.V. obtidos através de pastilhas de KBr indicaram, em diversas frações, bandas de estiramento simétrico $C=O$ a 1600 cm^{-1} . Foram observadas ainda : $1380 - 1385\text{ cm}^{-1}$ (δ OH do $RCOOH$); 1400 cm^{-1} (γ CHOH secundários e grupos $COOH$); 1140 cm^{-1} (estiramento $C=O$) para $RCOOH$ normal ; 2920 cm^{-1} (estiramento C-H).

Não foi possível isolamento puro dos subprodutos para identificação completa por técnicas de espectrofotometria infravermelha.

Embora o ácido 2-ceto glucônico não tenha sido isolado da reação e tenha sido detectado ácido fórmico no produto final da reação, é difícil prever um mecanismo completo para oxidação. Enolização, beta eliminação, isomerização por transferência de hidreto são mecanismos paralelos passíveis de

ocorrerem com açúcares em meio alcalino.

IV-1.2.10 - TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS

Um dos problemas quando se utiliza a titulação do açúcar redutor com solução oxidante é a detecção do ponto final. O uso de eletrodos tem substituído com eficiência diversos sistemas analíticos de determinação de compostos orgânicos.

Verificou-se que metais supostamente inertes respondem com diferentes velocidades à razão das formas oxidada e reduzida de uma substância em solução. A platina responde rapidamente, mas alguns outros metais, como particularmente tungstênio, atingem o potencial de equilíbrio com velocidade mais lenta. Assim, como são necessários apenas valores relativos em titulação, pode-se utilizar o tungstênio no lugar do eletrodo de referência usual, caso a titulação seja conduzida a uma velocidade constante. Isto permite a eliminação do eletrodo de calomelano com sua ponte salina, de modo a exigir menor reposição deste conjunto mais resistente.

A curva obtida é semelhante à de uma titulação potenciométrica padrão, mas frequentemente a mudança brusca é mais nítida. Discutiremos o uso deste par de eletrodos metálicos na determinação de açúcar redutor com ferricianeto de potássio. Para o caso especial de cobre, testamos este par bimetálico, titulando lentamente soluções de glicose e lactose com misturas $\text{Cu}:\text{T:OH}$, porém, não constatamos qualquer viabilidade de uso.

Recorremos à utilização de titulação biampérométrica

com dois eletrodos de platina que foram adaptados do circuito de Karl Fisher, com aplicação de 10 mV. Este sistema evidenciou mudança brusca de potencial no ponto de equivalência (Fig.2).

Titulações potenciométricas efetuadas com estes eletrodos, após acerto da escala no zero com solução de açúcar-água fervendo, mostraram mudanças gradativas no potencial, porém nada conclusivo. Entre as titulações, efetuamos tratamento com hidróxido de amônia.

Eletrodos de aço inox passivados com lixa de água (A-600) utilizando tanto Pt quanto W como referência, não forneceram resultados conclusivos, embora apresentassem mudanças de potencial durante a titulação.

Eletrodos seletivos como fios de cobre foram montados ao potenciômetro, tomando-se o cuidado de construir o eletrodo com cabo blindado. A limpeza do eletrodo resume-se em lixar ou mergulhar em solução de ácido clorídrico para eliminação de óxido cuproso aderido durante o processo de oxidação. Obtivemos bons resultados quando executamos titulações com solução de glicose, tendo-se como referência o eletrodo de calomelano instalado em becker separado por uma ponte salina, a fim de evitar o aumento de temperatura. A atmosfera de nitrogênio não interferiu nos resultados. O perfil da titulação potenciométrica assim obtida consta da Fig.3. ALEIXO E GODINHO (1985) sugeriram o uso deste eletrodo de fácil manuseio e de custo acessível.

Foram testados eletrodos de cobre mergulhados em um mesmo frasco cônico, dispostos de maneira que um esteja em solução de Cu^{+2} 0,1M interconectado à solução de açúcar por membrana porosa. Quando conectados a um registrador, mostraram

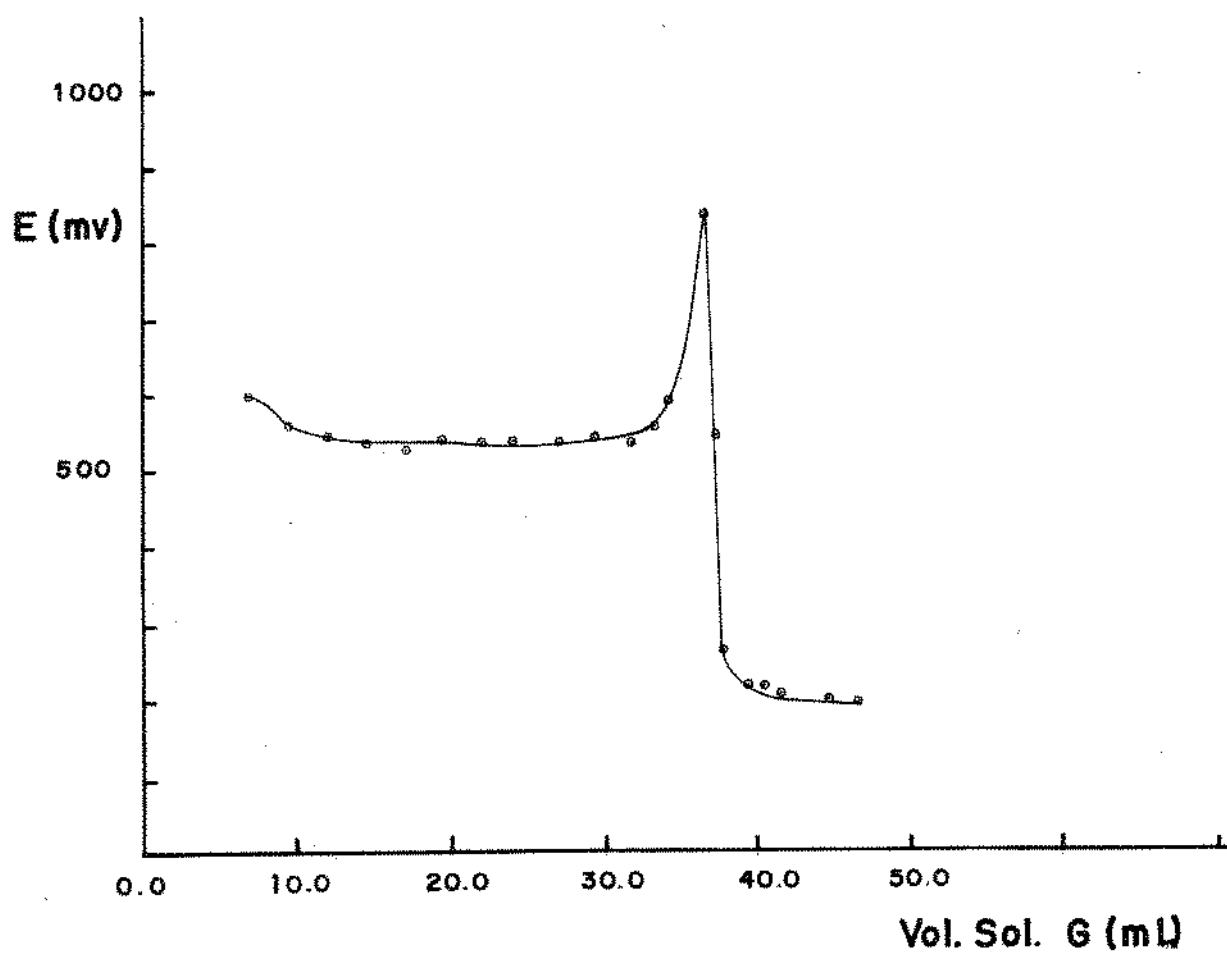


FIG.2 - Perfil da curva potenciométrica obtida da titulação
 biamperométrica de glicose com solução de Cu:T:OH
 (1:2:3) Eletrodos de: Pt/Pt.

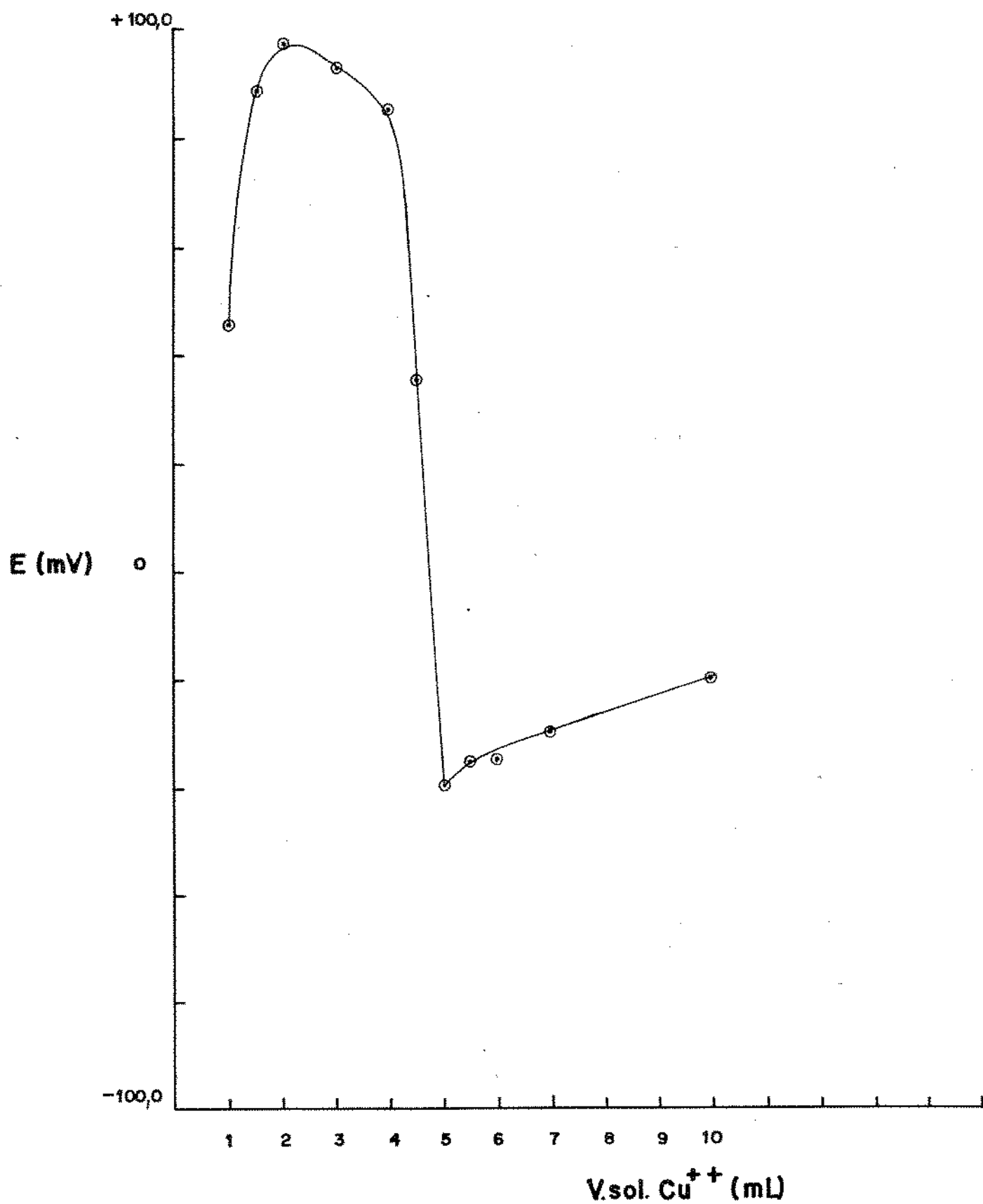


FIG. 3 Titulação potenciométrica de solução de glicose (9mg) com mistura $\text{Cu}:\text{T}:\text{OH}=1:4:3$ (escala expandida). Eletrodos de Cobre/Calomelano

mudanças de potenciais com tendência a chegar a um patamar próximo do ponto de equivalência, podendo no futuro desenvolver-se técnicas adequadas para seu uso.

As Figuras 4 e 5 foram obtidas com auxílio de um registrador acoplado a um potenciômetro, com adição automática da amostra. A oxidação de açúcar redutor tem a desvantagem de ser muito lenta, o que nos conduz a sugerir técnicas automáticas para executá-la. O uso do pHmetro Beckman Expandomatic com bureta automática e registrador acoplados obtidos com titulações de glicose e lactose na presença de $\text{Cu:T:OH} = 1:2:3$ mostram-se promissores.

O ponto de equivalência apresentou pequeno desvio que possivelmente com ajustes da técnica facilmente chegarão ao valor esperado.

Para a determinação do ponto de equivalência em titulações potenciométricas, GRAN(1952) desenvolveu um método que tem tido grande repercussão no meio científico. Quando a curva potencial e volume obtido através de titulação potenciométrica mostra uma pequena mudança de potencial no ponto final, é costume elaborar um gráfico $\Delta E / \Delta V \times \text{volume}$ e tomar o pico desta curva como ponto de equivalência. O autor propôs um método de transformação destas curvas por manipulações numéricas em linhas retas em cuja intersecção se dá o ponto de equivalência. Um tratamento teórico mostrou que o método pode ser aplicado a titulações, formação de complexos e reações de oxi-redução.

Para cada tipo de reação, GRAN desenvolveu equações matemáticas e sugeriu expressões para calcular e elaborar o

FIG. 4 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA AUTOMÁTICA DE GLICOSE UTILIZANDO ELETRODOS

DE COBRE E MÉTODO MODIFICADO DE LANE-EYNON.

Potenciômetro utilizado: Beckman expandomatic com multititulador
Metrohm e registrador acoplados

Solução titulante Cu:T:OH=1:2:3
velocidade do papel: 5 mm/min
massa de glicose titulada: 18,0 mg
ajuste na escala em 2000 mV

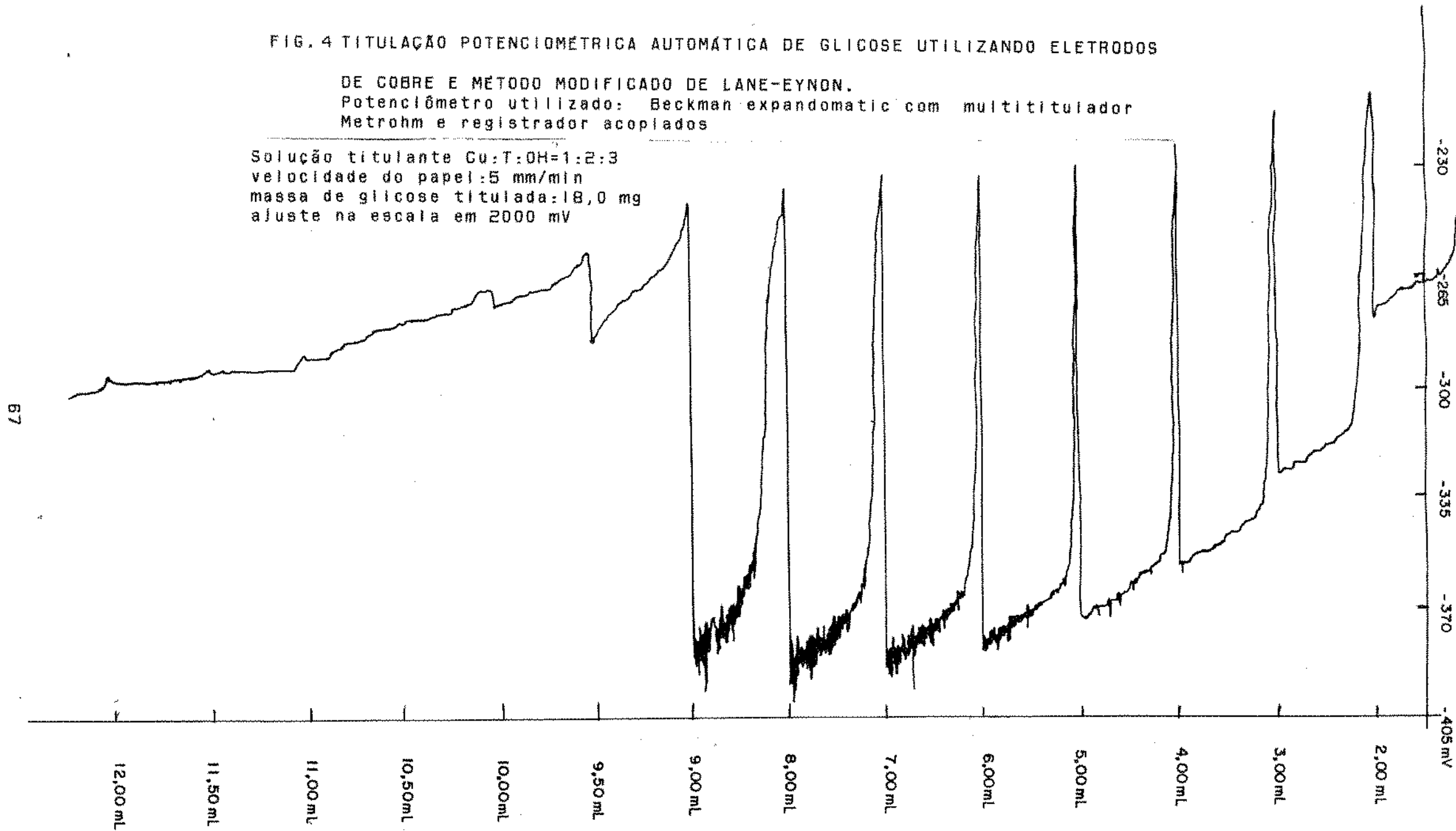


FIG. 5 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA AUTOMÁTICA DE LACTOSE UTILIZANDO ELETRODOS

DE COBRE - DETERMINAÇÃO COM MÉTODO MODIFICADO DE LANE - EYNON.
INSTRUMENTO UTILIZADO: POTENCIÔMETRO BECKMAN EXPANDOMATIC
ACOPLADO A TITULADOR AUTOMÁTICO E REGISTRADOR

amostra: sol. de Lactose
eletrodos: fios de cobre
velocidade do papel 5 mm/min
ajuste da escala a 2000 mV

88

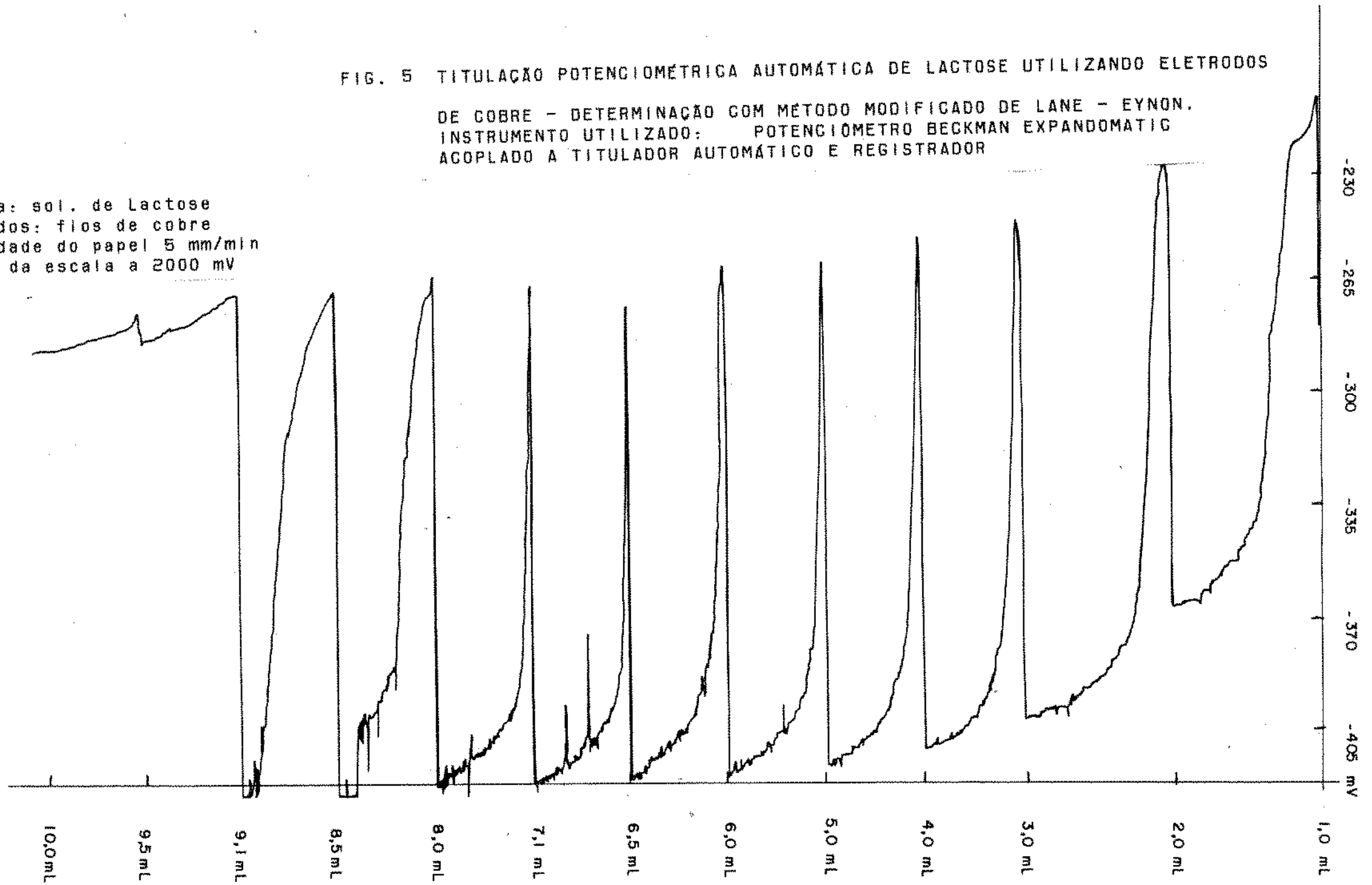


gráfico de forma a obter linhas retas. Em 1970, o fabricante de eletrodos Orion adotou os princípios desenvolvidos por Gran e aplicou-os à determinação do ponto de equivalência para eletrodos seletivos, desenvolvidos pela Companhia.

Para elaborar uma curva de titulação linear, é necessário converter os potenciais de eletrodos em concentração. Isto pode ser efetuado pelos caminhos: 1- pode-se utilizar uma curva de calibração para converter leituras de milivolt em concentrações; 2 - pode-se recorrer à escala logarítmica de uma medida de um eletrodo de íons específico para calcular valores de concentração diretamente; 3 - valores de concentração podem ser obtidos por adição ou subtração de quantidades conhecidas ponto a ponto. Em todos é necessário fazer correções ocasionadas pela elaboração de um papel especial denominado "Gran's Plot Paper". Este permite que o potencial do eletrodo possa ser graficado diretamente, sem cálculos prévios e apresentam escala semi-antilog, com correção para 10% e 100% do volume.

O método de Gran para determinação de cobre por íon seletivo detecta concentração abaixo de $9 \mu\text{g/L}$.

O tratamento teórico de titulações com precipitação e complexiométricas com eletrodos seletivos indicam que a interferência com a resposta do detector e o baixo valor da constante de equilíbrio levam a erros substancialmente maiores na titulação.

Um trabalho a ser realizado seria o desenvolvimento de formulações teóricas para se obter uma função de Gran adequada para este caso atípico, onde ocorre uma reação de oxi-redução à temperatura de ebulição (que ao contrário da titulação

tradicional, a adição de titulante não dilui a amostra pelo fato desta estar se concentrando por evaporação). seguida de formação de um precipitado. Equações para calcular com exatidão o ponto de equivalência destas titulações potenciométricas ainda não estão disponíveis na literatura e o presente trabalho apenas contribui para os tipos de sistemas favoráveis.

IV-1.2.11 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO

Filtrados obtidos da oxidação de glicose e lactose com solução $\text{Cu:T:OH} = 1:4,5:3,0$ após concentração a volume de 1 mL mínimo, foram testados com ácido cromotrópico segundo item III - 4.1.10. A solução adquiriu uma coloração violeta, indicando a presença de ácido fórmico como sub-produto de oxidação. A técnica empregada segundo GUAGNINI E VONESCH (1959) também levou à confirmação de ácido fórmico como sub-produto da oxidação da glicose e lactose.

Para determinação quantitativa submeteu-se filtrado da reação, acidificado a pH 5,0 a uma microdestilação a 50 mm Hg, em banho de gelo.

Soluções padronizadas de ácido fórmico em concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ foram empregadas para elaboração de uma curva padrão na faixa de 2,5 a 50 μg de ácido fórmico / 10 mL de solução (A).

670

Destilados das filtrações de produtos de oxidação, após diluição a 500 mL foram submetidos à reação com perclorato férrico. Medidas de absorbância a 420 nm foram efetuadas para alíquotas diversas destes destilados. Para 0,1 mmol de lactose,

detectou-se ao redor de 23 mg de ácido fórmico como sub produto, segundo procedimento descrito por GRANT (1928).

IV-1.2.12 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS (CG e CLAE)

Cromatografia gasosa tem sido muito utilizada para a determinação de ácidos orgânicos. No entanto, a maioria dos ácidos orgânicos não possui suficiente volatilidade e, para tanto, exigem preparação de um derivado. Mais frequentemente utiliza-se a conversão de grupos carboxílicos em ésteres metílicos ou ésteres trimetilsilílicos e grupos hidroxílicos em ésteres trimetilsilílicos.

Segundo JAKOBS et al. (1977), a separação e identificação de ácidos orgânicos em pacientes portadores de distúrbio renal, foi possível graças às técnicas de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG/EM) com uso de coluna capilar de SE-30 (25 m x 0,25 mm). Utilizando a mesma técnica, extraiu-se os ácidos orgânicos do meio reacional com acetato de etila, submetendo-se ao tratamento com bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) na presença de trimetilclorosilano. A amostra silanizada foi injetada em coluna de SE-30 (2m x 1/8") à temperatura de 80 a 110°C (0,5 °C/Min). O uso de coluna recheada de diâmetro interno 1/8" não levou a boa resolução dos picos, havendo uma tendência de ceto e hidroxí-ácidos serem co-cromatografados: programação mais lenta, além de aumento de tempo de análise não levou a resultados satisfatórios. Detectou-se problemas de abaixamento da resposta do detector por deposição do composto silanizante e determinamos por abandonar a

técnica. Além disso, a completa falta de possibilidade de identificar os picos através de espectrometria de massa, desestimulou a continuidade do estudo com cromatografia gasosa.

RAJAKYLÄ (1981) sugeriu o uso de cromatografia líquida para determinação de ácido glucônico e outros ácidos formados em oxidações bioquímicas ou catalíticas da glicose. O autor utilizou a separação em coluna de resina de troca iônica e eluiu com ácido sulfúrico diluído. O método é baseado na cromatografia de partição e exclusão de íons com monitoração de U.V. a 210nm. Os ácidos são separados em uma coluna recheada, com resina catiônica (poliestireno sulfonado -divinilbenzeno, copolímero H). Utilizando a coluna indicada pelo autor, conhecida como AMINEX HPX- B7, foi iniciado o estudo de separação e identificação dos sub produtos de reação, através de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sem a desvantagem da exigência da extração da amostra e posterior silanização, o método tornou-se bem mais acessível.

Trabalhando-se com o filtrado da reação e tomando-se como referência algumas amostras, abaixo discriminadas, para identificação de origem de picos estranhos, efetuou-se a determinação cromatográfica por CLAE.

Amostras codificadas segundo legendas abaixo, encontram seus resultados cromatográficos nas Tabelas XII e XIII.

X = água destilada comum

A = D (-) frutose

B = glicose anidra

A1= solução de frutose (180 mg/100 mL)

B1= sol. glicose (180 mg/100mL)

B0 = Sol. glicose 1%

B0-1= Sol. glicose 2%

C1 = sol. tartarato + NaOH (antes do aquecimento)

C2 = sol. tartarato + NaOH (após aquecimento)

A2 = sol. frutose (18 mg/ 35 mL) após oxidação

B2A = sol. glicose (18 mg/10 mL) após oxidação.

B2C= sol. glicose (18 mg/10 mL) após oxidação.

Detectou-se nas amostras branco, um componente com tempo de retenção semelhante ao do ácido oxálico.

As amostras oxidadas de glicose e frutose, apresentaram componentes com tempo de retenção coincidente com os do ácido glicólico, ácido láctico e ácido fórmico. Dois componentes não foram identificados e apresentaram tempo de retenção 11,94 e 16,5 minutos.

TABELA XII - RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - Col. AMINEX HPX87H (45°C).

	2-ceto-D-glucônico				Amostra de Glicose Oxidada						
		Padrão	1970 ppm	200 ppm	200 ppm	Diluição = 100,2 x pH = 2	Diluição = 29,7 x pH = 2	Diluição = 9,9 x pH = 4	Diluição = 5,0 x pH = 4	Diluição = 5,0 x pH = 4	Diluição = 2,5 x pH = 5
Oxálico	t _r	10:46					10:51	10:51	10:52	10:48	10:54
	Conc.	9,7					0,69	2,4	5,5	5,3	16,8
Cis-aconítico	t _r	11:18									
	Conc.	2,2									
	t _r						12:09	12:08	12:08	12:08	12:09
	Área						20.373	74.513	132.378	137.331	391.729
	t _r		12:35	12:34	12:34						
	Área		4.158.298	423.095	309.508						
Maleico	t _r	12:62									
	Conc.	0,46									
Tartárico	t _r	13:10				13:13	13:13	13:12	13:16	13:15	13:16
	Conc.	62				102,3	326,6	1.003,5	1.930	1.939	5.028,5
Málico	t _r	14:72									
	Conc.	99,4									
Trans-aconítico	t _r	15:63	15:68	15:62	15:62	15:66		15:63	15:64	15:63	15:62
	Conc.	12,4	0,12	0,03	0,06	0,03		0,08	0,20	0,21	0,52
	t _r							16:59	16:56	16:54	16:56
	Área							11.282	23.384	23.024	39.776
Succínico	t _r	18:27									
	Conc.	140,4									
Glicólico	t _r	18:76						18:78	18:76	18:76	18:75
	Conc.	47,5						9,1	17,0	17,4	49,4
Lático	t _r	19:58		19:63	19:60	19:63	19:62	19:66		19:65	
	Conc.	73,2		6,5	8,9	7,3	6,1	7,7		11,1	
Fórmico	t _r	21:28						21:28	21:27	21:34	21,3
	Conc.	57,3						2,8	10,0	11,5	27,6
Fumárico	t _r	22:48							22:50	22:50	22:41
	Conc.	0,41							0,13	0,17	0,02

Eluente: ÁCIDO SULFÚRICO 0,01 M

TABELA XIII - DADOS OBTIDOS DA SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM CLARE

		pH Oxálico	Cis- aconítico			Tartárico	Trans- aconítico		Glicólico	Lático	Fórmico	Diluição
Padrão ác. orgânicos Padrão ác. 2-ce-to-glucônico	t _r /Concen- tração ou área		10,39 21	11,06 3,4		12,30 409366	13,04 61	15,53 12		19,5 76	21,21 62	
A2-1	"	2	10,39 6,3		11,94 33277		13,03 1700,07	15,5 0,93	16,51 4445	18,7 157,6	21,15 28,5	10,68
A2-2	"	3	10,41 14,6	11,03 0,88	11,94 117154		13,03 1821	15,54 0,89	16,47 41049	18,65 174,2	21,16 57,5	6,22
A2-3	"	5	10,41 18,5		11,96 290340		13,05 1800	15,59 0,002	16,5 103131	18,68 90,6	19,51 56,8	21,17 56,6
A2-4	"	10	10,43 19,04		11,96 590018		13,05 1820		16,5 208480	18,7 95,2	19,5 66,5	21,19 73,9
A2A-2	"	3	10,39 17,3		11,92 72012		13,03 1191,3		16,5 21489	18,65 119,6		21,16 36,0
A2A-3	"	5	10,39 12,2	10,94 0,66	11,94 177378		13,03 1258,5	15,53 0,008	16,5 11845	18,67 68,5	19,5 41,4	21,19 44,8
A2A-4	"	10	10,41 16,2		11,96 360117		13,05 1252,5	15,47 0,04	16,5 149767	18,67 70,0	19,45 44,4	21,19 52,5
B2A-1	"	2	10,4 2,0		11,95 4539		13,04 1067,1	15,5 0,05		18,64 120,4		21,15 40,9
B2A-2	"	3	10,4 7,0		11,92 52182		13,02 1175,4	15,47 0,14	16,48 22123	18,72 93,5		21,18 39,6
B2A-3	"	5	10,4 14,9		11,95 215891		13,04 1345,9	15,44 0,06	16,48 56958	18,67 69,2	19,44 33,8	21,18 48,4
B2A-4	"	10	10,4 11,1		11,95 341834		13,04 1224,9	15,44 0,03	16,51 112473	18,7 69,4	19,47 33,7	21,2 50,5
B2C-3	"	5	10,42 6,9	10,94 0,13	11,95 145200		13,05 1179,6		16,5 39151	18,7 67,2	19,47 30,4	21,21 39,6
B2C-4	"	10	10,43 12,9		11,96 365248		13,05 1244,1			18,68 64,5	19,53 28,4	21,2 37,8

Eluente: H₂SO₄ 0,01 M

A= frutose; B= Glicose;

TABELA XIII (cont) - DADOS OBTIDOS DA SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM CLAE - Coluna Aminex HPX87H - 45 °C

		pH	Oxálico	Cis- Aconítico	Glicose	Frutose	Tartárico	Trans- Aconítico		Glicólico	Lático	Fórmico	Diluição
Padrão	t _r /Concen- tração ou Área									18,75 54,5			
X	"							15,52 0,002					S/D*
X	"							15,67 0,026					S/D
A1	"					14,80 71,6							S/D
B1	"				13,74 8327								
BO	"				13,96 87700			15,74 0,04					
BO-1	"				14,03 170925								
C1-1	"	12	10,37 11,4				13,05 5775,9						4,98
C1-2	"	12	10,34 18,5				13,05 5749,5						4,07
C1-3	"	12	10,34 18,7				13,05 5801,4	15,38 1,004					2,6
C2-1	"	12	10,39 2,3				13,05 2826,4						2,04

*S/D = Sem Diluição

X = água destilada

A = frutose

B = glicose

C = tartarato em meio alcalino

IV-2 OXIDAÇÃO DE AÇÚCARES POR HEXACIANO FERRATO (III) DE POTÁSSIO (HCFP)

IV-2.1 ESTUDO DA OXIDAÇÃO POR MÉTODO VOLUMÉTRICO E POTENCIOMÉTRICO

Para avaliar o comportamento do íon ferricianeto frente a açúcares redutores, demos início a um estudo titulando inicialmente com solução de glicose, mistura de HCFP e hidróxido de sódio em proporções variáveis de base.

Estas soluções foram tituladas diretamente sobre uma chapa de aquecimento à temperatura de ebulição, considerando ponto de viragem a mudança de coloração de amarelo para incolor, correspondente à presença de ferrocianeto. Optamos pelo uso de açúcar puro na bureta e mistura de oxidante e base no frasco a ser titulado. A viragem desta titulação não se apresentou muito adequada sendo de difícil visualização.

A Tabela XIV mostra os resultados obtidos.

O estudo da variação da proporção OH/HCFP na oxidação da glicose indicou que abaixo do valor 1,5 é impossível se efetuar a oxidação, por falta de meio alcalino. A partir deste valor, observou-se oxidação com estequiometria próximo de 6 mol de Fe(III) para um mol de glicose. Estudos de oxidação da glicose com HCFP a concentrações bem elevadas de hidróxido de sódio (G:OH=1:40) apresentaram desvios ao redor de 3% em relação à estequiometria média a níveis inferiores de concentrações de base.

TABELA XIV
OXIDAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COM FERRICIANETO DE
POTÁSSIO EM MEIO ALCALINO

AÇÚCAR	OH (mmol)	OH/HCFP	Volume (mL) Açúcar	HCFP/Aç.
GLICOSE	1,853	1,2	FALTOU OH	
	2,067	1,5	22,35	6,17
	2,206	1,6	22,90	6,02
	2,482	1,8	22,70	6,08
	2,758	2,0	22,40	6,15
	3,448	2,5	23,10	5,97
	9,642	7,0	23,50	5,87
FRUTOSE	2,069	1,5	23,00	5,99
	2,206	1,6	20,80	6,63
LACTOSE	2,206	1,6	20,80	6,63
	2,482	1,8	19,80	6,96

a bureta: solução de açúcar 0,01 M

o erlenmeyer: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3} = 1,379 \text{ mmol} + \text{OH}$
conforme indicado

Na concentração indicada para as soluções utilizadas neste estudo têm-se que excesso de 0,10 mL de titulante acarreta decréscimo de 0,03 no valor da estequiometria, resultando em erro de 0,5 %. Para desvios estequiométricos na faixa +1 ou -1, em relação à estequiometria exata, serão necessários erros de volume da ordem de 3 a 5 mL, erros estes impossíveis de serem cometidos por analistas acostumados às técnicas volumétricas. Por este fato, não colocamos nas tabelas os desvios padrões dos volumes encontrados, pois a estequiometria não será significativamente afetada por pequenos desvios de volumes detetados normalmente pelo operador, em análises de duplicatas.

Na tabela XIV observa-se ainda um estudo preliminar da oxidação de frutose e lactose, indicando estequiometria superior a 6,0 para os dois açúcares nas condições do teste.

Como a viragem visual de amarelo para incolor pode estar sujeita a erros de visualização do operador, recorreremos à utilização de um indicador. Partindo da observação de RUPPOLT (1976) introduziu-se o uso do reagente 2,6- diclorofenolindofenol sódico, que, em presença de açúcares produz coloração azul. Esta coloração quando formada na presença de cetoses pode ser descorada pelo aquecimento, não ocorrendo este fenômeno com aldoses. Baseado neste fato, utilizamos 2,6 - diclorofenolindofenol sódico (DCFI) como indicador nas titulações de aldoses com HCFP.

A solução inicial do açúcar na presença do indicador é verde limão. Com o decorrer da titulação, à temperatura de ebulição, notam-se matizes mais claros de verde até azul esverdeado. A partir deste ponto, modifica-se para coloração azul e no ponto de viragem torna-se totalmente incolor ou amarelo claro, dependendo da concentração inicial do açúcar. Diversas titulações realizadas na presença deste indicador mostraram que, nas condições do experimento, a mudança de coloração azul para incolor é detectado após adição de um excesso máximo de 0,05 mL do titulante.

Foi efetuado um estudo potenciométrico para avaliar o comportamento deste indicador e o comportamento da oxidação de alguns açúcares frente ao HCFP. Segundo LAITINEN E HARRIS (1975) o potencial padrão de redução do hexacianoferrato (III) de potássio é 0,355V sendo o próprio sal um padrão primário.

Como a reação é efetuada à temperatura de ebulição, buscamos eletrodos que pudessem suportar estas temperaturas, sem afetar a precisão das medidas. Testes efetuados com os eletrodos disponíveis no laboratório levaram-nos a um par ideal: eletrodo de platina e de tungstênio (ref.). Os únicos cuidados tomados com estes eletrodos durante o uso foram o tratamento do tungstênio com nitrito de sódio fundido, quando o metal se apresentava escuro e opaco e a imersão dos 2 eletrodos em solução ácida para remoção dos íons ferro, após cada determinação. Algumas vezes efetuamos tratamento da platina com um abrasivo, mas medições antes e depois do tratamento mostraram ser

desnecessária esta passivação, pois a precisão das medidas não se apresentava alterada.

Submetemos amostras de ferricianeto de potássio em meio alcalino à titulação potenciométrica com açúcares redutores, sob aquecimento e agitação constante. Inicialmente as reações foram realizadas a uma relação de 1,5 entre OH e açúcar. Em todas titulações foram anotados valores obtidos visualmente pelo uso de DCFI como indicador.

A reação com lactose mostrou-se mais lenta do que a reação com glicose, ou seja, foi necessário adição mais lenta do redutor ao oxidante.

A tabela XV fornece os valores da estequiometria da lactose obtida por titulações potenciométricas. Os volumes de equivalentes indicados foram obtidos através de gráficos de potencial de reação (mV) e volume de solução titulante.

Os resultados mostram que o uso de DCFI é perfeitamente indicado para oxidações com HCFP pois coincide com as leituras potenciométricas.

A Figura 6 mostra o perfil da curva de titulação potenciométrica do ferricianeto com lactose em meio alcalino, com adição lenta do titulante. Titulações realizadas rapidamente levam a diversos estágios de oxidação visíveis por diferentes pequenos patamares na curva potenciométrica, sugerindo etapas intermediárias de oxidação. Em titulações com Fe(II) dicromato. WINTER E MOYER (1935) observaram uma dependência do potencial em função do tempo após o ponto

TABELA XV

TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO COM
LACTOSE - ESTUDO DA ESTEQUIOMETRIA DA OXIDAÇÃO.

mmol OH	$\frac{\text{mmol OH}}{\text{mmol HGFP}}$	Vol. La(pot) (mL)	$\frac{\text{mmol HGFP}}{\text{mmol La}}$	Vol. visual (mL)
,655	1,2	(*)	-	-
,793	1,3	(*)	-	-
,931	1,4	(*)	-	-
,069	1,5	29,00	4,76	29,00
,207	1,6	21,60	6,39	21,60
,345	1,7	19,52	7,05	19,55
,483	1,8	18,96	7,27	19,04
,758	2,0	17,97	7,54	18,00
,034	2,2	18,30	7,53	18,35
,310	2,4	18,35	7,52	18,35
,862	2,8	18,35	7,52	18,35

*) não houve oxidação.

média de 2 determinações: La= lactose = 0,01M

eletrodos : platina e Tungstênio (ref.)

indicador: DCFI (sol. 0,1%).

GFP = 1,379 mmol em OH conforme indicado

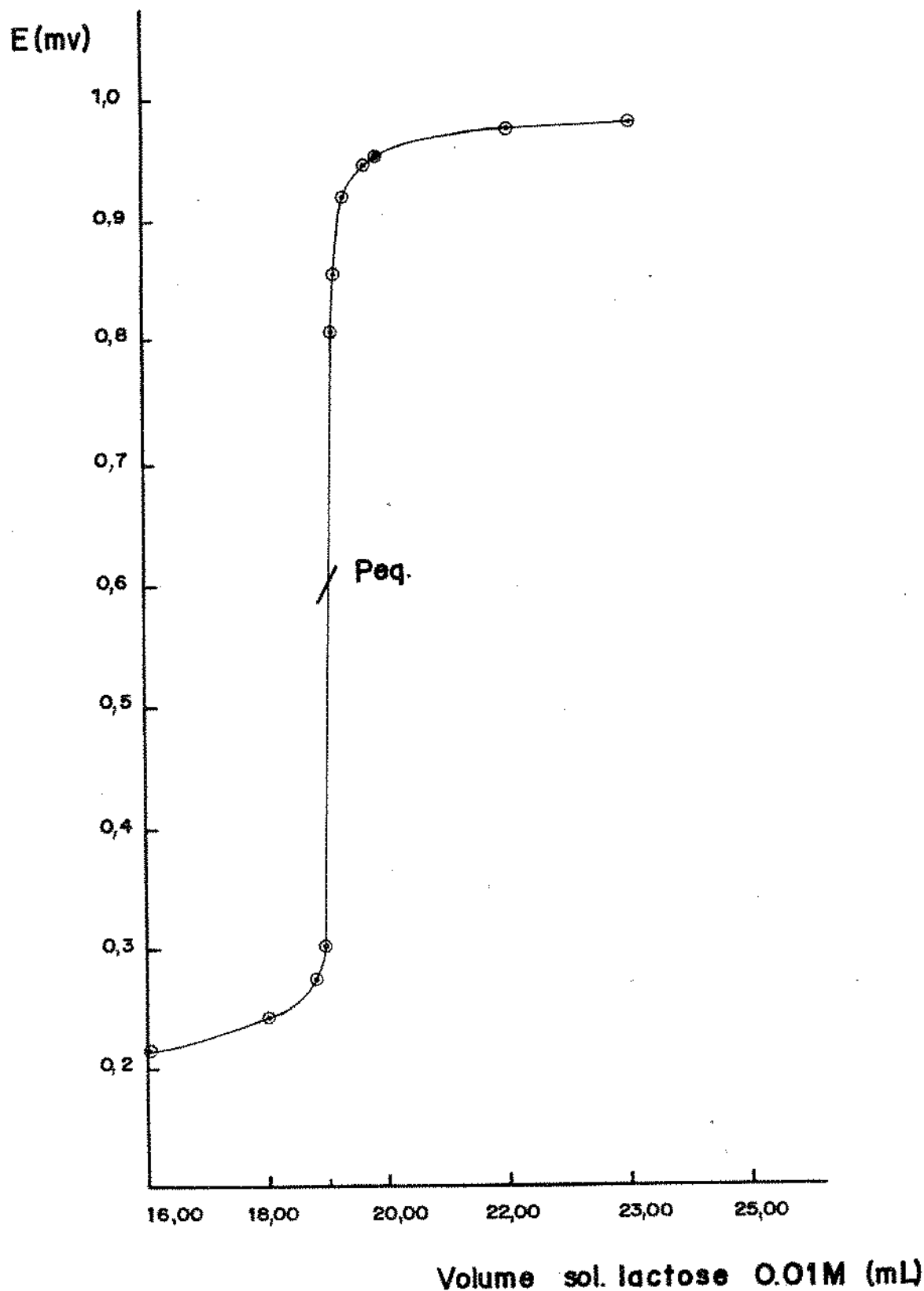


FIG. 6 Perfil de titulação potenciométrica (ferricianeto de potássio com lactose em meio alcalino) ($\text{OH}/\text{HCFP} = 1,8$). Eletrodos = Pt e W.

Na bureta : sol. 0,01 M Lactose;

No erlenmeyer: sol. NaOH + HCFP (1,379 mmol) em ebulição.

final da titulação para dicromato férrico. O mesmo fato foi presenciado nas titulações com ferricianeo.

ROSS E SHAIN (1956) ao estudarem deslocamento do potencial de eletrodos de platina em função de tempo, notaram histerese em curvas obtidas com registradores potenciométricos, justificando o fato de que embora platina seja supostamente inerte, apresenta oxidação. KOLTHOFF E TANAKA (1954) mostraram que esta oxidação poderia ser tanto eletroquimicamente como quimicamente devido à presença de oxidantes fortes como dicromato, cério (IV) e permanganato. Conforme observações de VETTER E SCHULTZE (1972) apenas uma pequena quantidade de oxigênio encontra-se quimicamente ligada. A penetração do oxigênio, dependente da força do campo, forma uma camada superficial de óxido que gradualmente envelhece. Esta camada de óxido permite ocorrência de troca de elétrons a uma velocidade dependente de sua estrutura e do par de oxi-redução envolvido.

O gráfico da Figura 7 revela o comportamento da estequiometria da reação em diferentes concentrações de base para a oxidação de lactose com HCFP. Observa-se que também neste caso, reações efetuadas na relação OH/HCFP 1,2, 1,3 e 1,4 não apresentaram oxidação, pela falta de base, mesmo realizando oxidação direta da solução em chapa de aquecimento. Os dados obtidos nestas titulações indicam um patamar a HCFP/La 7,52 para OH /HCFP acima de 2,0.

Numa série de titulações efetuadas a OH /HCFP 2,0, com velocidade controlada de adição de lactose (0,3 mL/min), nas mesmas condições e utilizando-se os mesmos

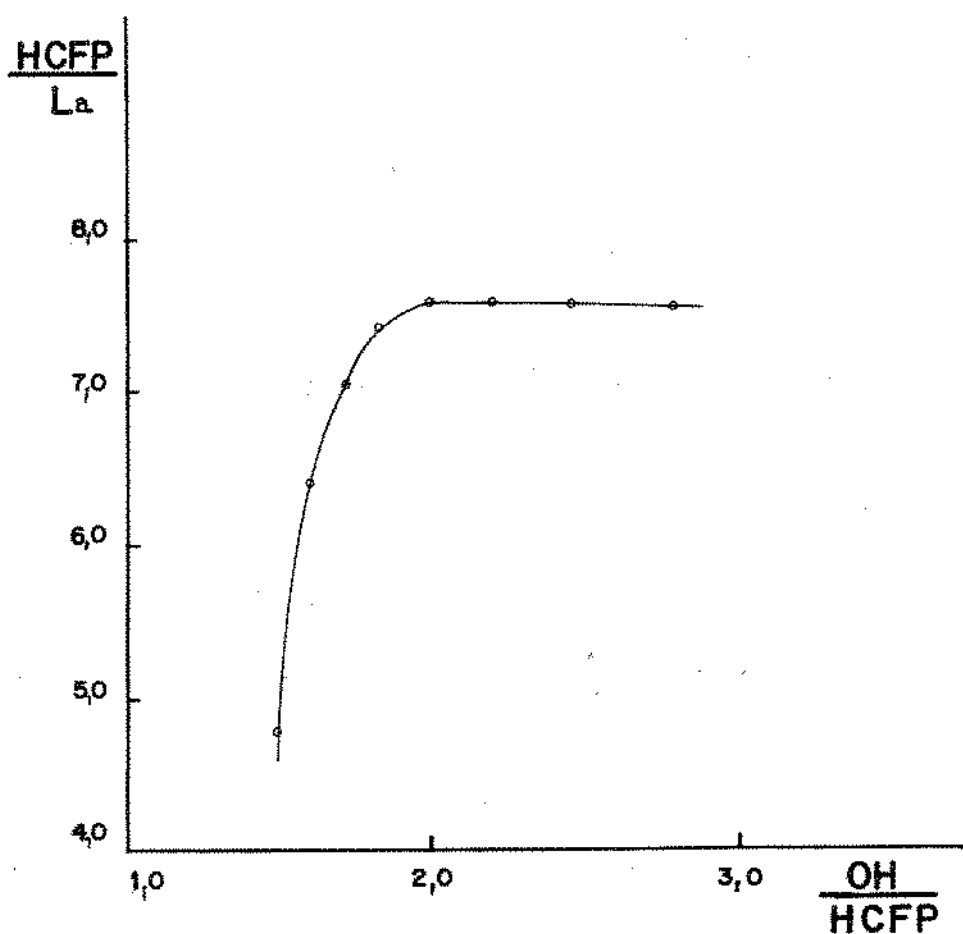


FIG. 7 - Comportamento da estequiometria da oxidação de Lactose com HCFP em concentrações variáveis de hidróxido de sódio. Dados obtidos de titulações potenciométricas com eletrodos de Pt e W.

reagentes, obteve-se 17,10 mL para 1,379 mmol HCFP) como volume médio de lactose 0,01M (6 determinações) . A proporção estequiométrica entre HCFP e lactose obtida neste caso foi de 8,06. Os mesmos resultados foram obtidos com OH/HCFP 2,8.

O comportamento da oxidação considerando variações do meio alcalino, também foi obtido titulando-se com solução de hidróxido de sódio, mistura de lactose (concentração fixa) e HCFP (concentração variável). A partir dos pontos de equivalência gráficos obtidos através das titulações potenciométricas, utilizando Pt e W como eletrodos, calculou-se a relação existente entre a base e o açúcar para proporções pré-estabelecidas de oxidante/redutor. As titulações foram efetuadas igualmente na presença de DCPI e a mudança de coloração de azul para amarelo em todas determinações ocorreu coincidentemente com a mudança de sinal do potencial da reação.

A Figura 8 apresenta o gráfico obtido nas condições acima descritas, para a reação envolvendo 0,5 mmol (0,18 g) de lactose, em concentrações variáveis de agente oxidante.

Quando necessário confirmação titulou-se o excesso de NaOH adicionado na obtenção da curva potenciométrica, com solução padronizada de ácido clorídrico. Com o volume gasto para neutralizar o excesso de solução alcalina, calculou-se o número de mol de base em excesso, que subtraído do número total de mol, forneceu número de mol

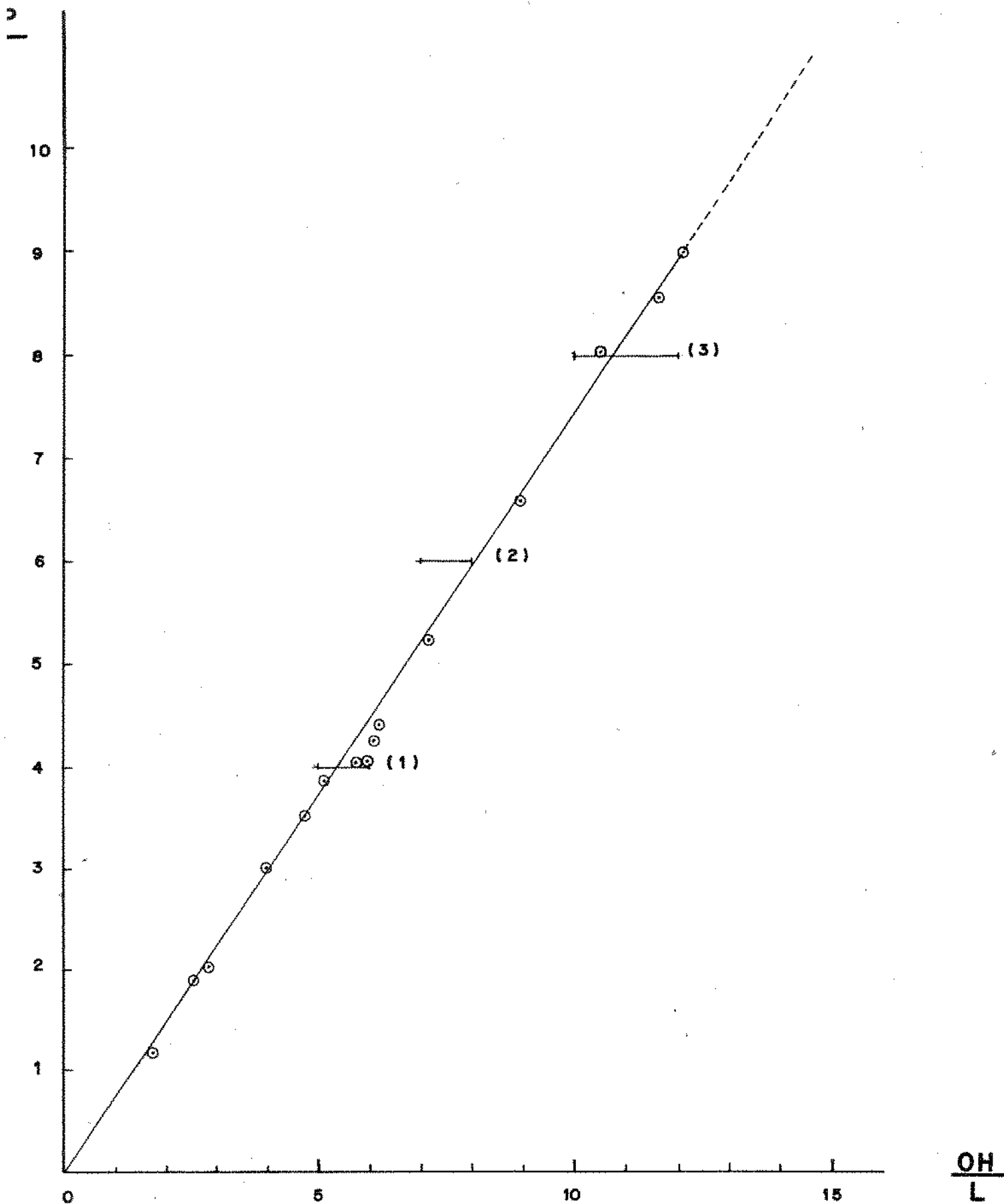


FIG. 8 - Estudo do comportamento da oxidação de Lactose com HCFP através de titulação com NaOH. Titulação potenciométrica de lactose com eletrodos de Pt e W.

Sol. titulada : 10 mL Lactose 0,05M + vol. variáveis de sol. HCFP 0,200M.
Sol. titulante : NaOH 0,1950 M.

(1), (2) e (3) - ocorrência de equações estequiométricas.

reagido. Com este dado, calculou-se o volume no ponto de equivalência da titulação e a proporção OH/La, comparando-o com o valor obtido na titulação potenciométrica.

Na Figura 8 pode-se observar uma linearidade entre os dois parâmetros avaliados sendo que calculando -se valores de OH/HCFP através de dados de OH/La obtidos experimentalmente, verifica-se que todos os pontos encontram-se na faixa de 1,33-1,54 conforme Figura 9 . Estes valores obtidos experimentalmente estão de acordo com as equações teóricas.

Para este gráfico, se considerarmos a ordenada como sendo o número de elétrons envolvidos na oxidação e a abcissa como o número de hidróxidos necessários à reação balanceada quimicamente, teremos reações estequiométricas possíveis nos pontos:

- (1) $\text{La} + 6 \text{ OH}^-$ envolvendo 4 elétrons
- (2) $\text{La} + 8 \text{ OH}^-$ envolvendo 6 elétrons
- (3) $\text{La} + 10 \text{ OH}^-$ envolvendo 8 elétrons

Os 3 patamares indicados na Figura 8 traduzem as faixas teóricas de concentração de hidróxido nos quais é possível escrever uma reação química.

O estudo da viabilidade de ocorrência de oxidação, justificável por equações químicas, envolvendo diversas concentrações de hidróxido de sódio levam-nos a sugerir reações com 4, 6, 8 e 10 elétrons para a lactose.

Por estas equações, verifica-se que a proporção OH/HCFP necessária à oxidação está na faixa 1,17-

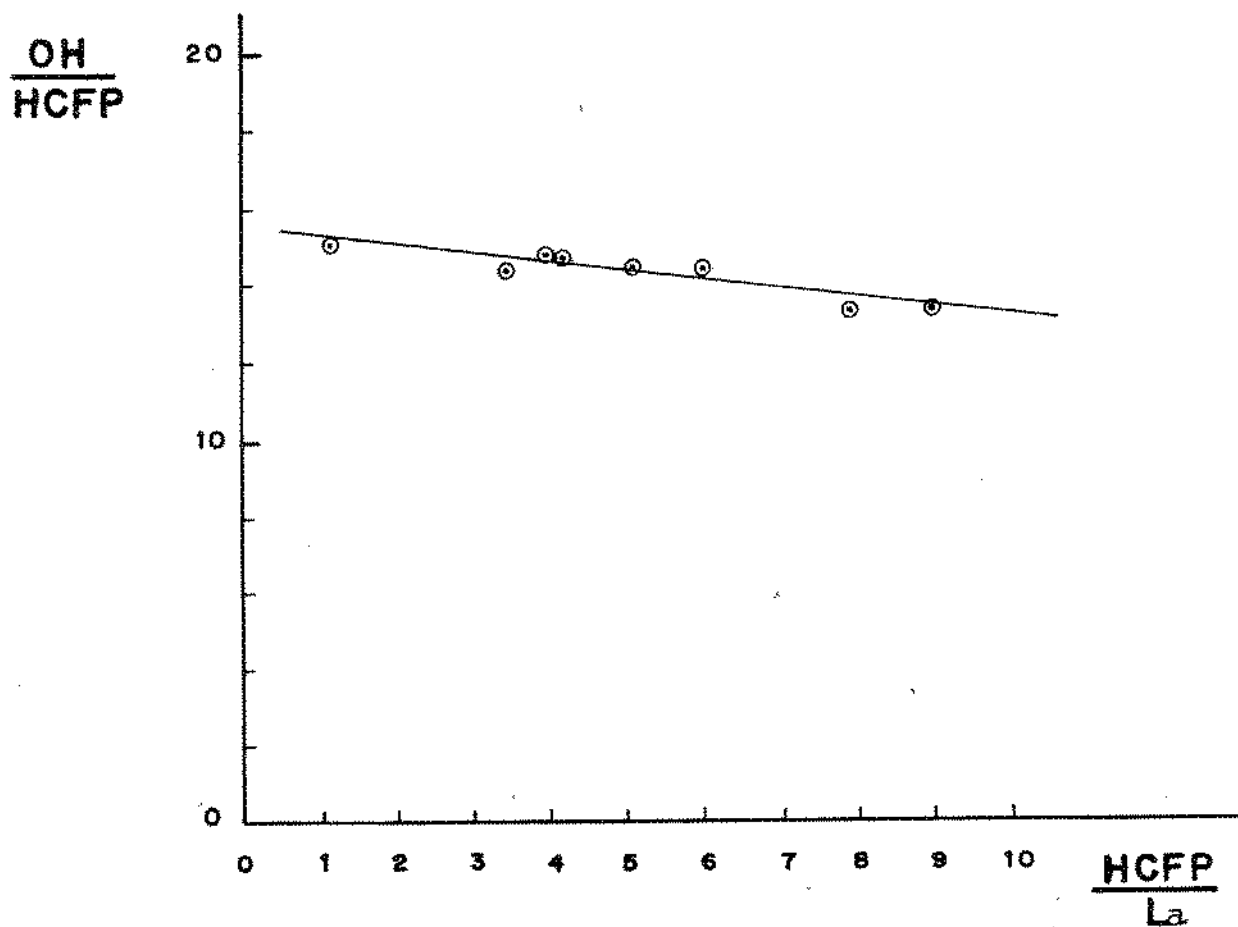


FIG. 9 - Relação OH /HCFP obtida da Fig. 8 para oxidação de lactose.

Cálculo de OH/HCFP obtido dos dados da Fig. 7 na titulação do oxidante com NaOH, levaram à ocorrência de oxidação a partir de OH/HCFP=1,33. É provável que a reação se processe em duas etapas envolvendo reações com 2 e 4 elétrons, com cisão dos dois primeiros átomos de carbono da parte redutora da molécula de lactose

IV-2.2. ESTUDO DA OXIDAÇÃO DE LACTOSE POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

Dados espectrofotométricos de HCFP mostram que na região do visível existe uma banda de absorção a 420 nm, com absorvância molar de $1150 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Na região de U.V. verificam-se bandas de absorção a 317, 302 e 260 nm.

Para ferrocianeto de potássio não se observa qualquer banda de absorção na região visível. Existem absorções a 225 e 217 nm. Espectros de ferricianeto e de ferrocianeto não mostram modificações de comportamento na região do visível, quando em soluções alcalinas. Estas indicações são suficientes para se fazer uso de espectrofotometria como parâmetro de avaliação de oxidação entre o açúcar redutor e soluções de ferricianeto.

Seguindo a metodologia indicada para avaliação espectrofotométrica da oxidação de lactose com HCFP na reação efetuada em banho a 95 °C através do cálculo de mmol de HCFP reagidos, a estequiometria da reação para diferentes valores de OH/HCFP. O gráfico da Fig.10, mostra o comportamento desta oxidação de lactose 5 minutos de aquecimento, quando submetida a concentrações variáveis hidróxido de sódio.

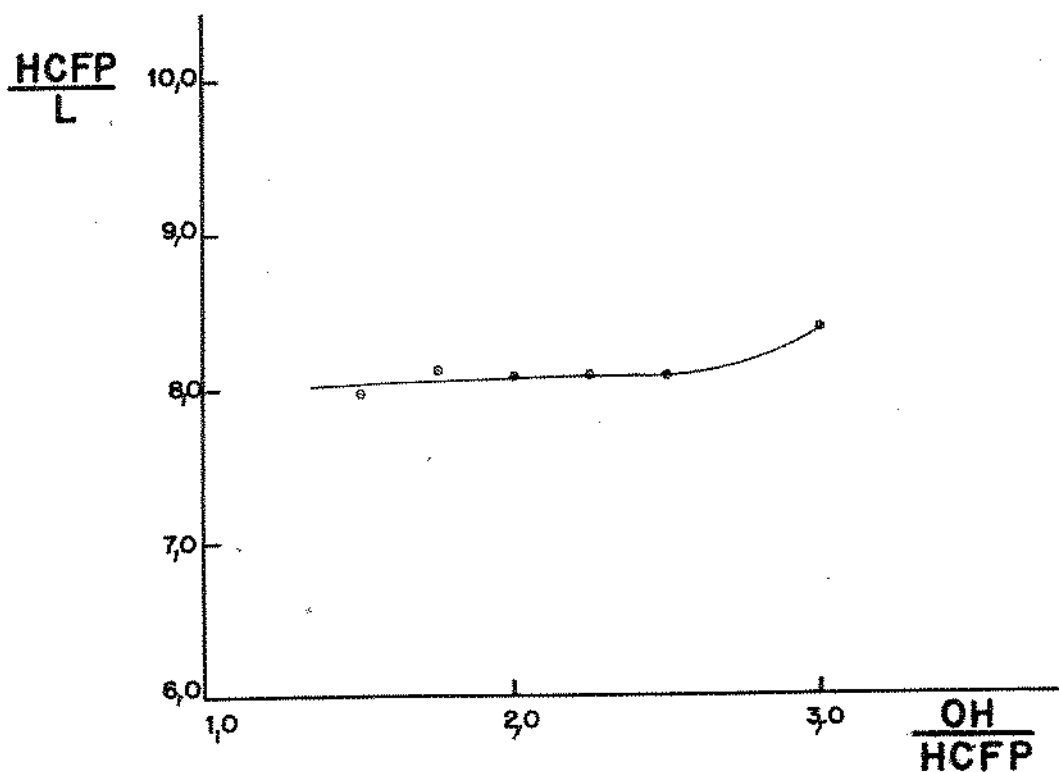
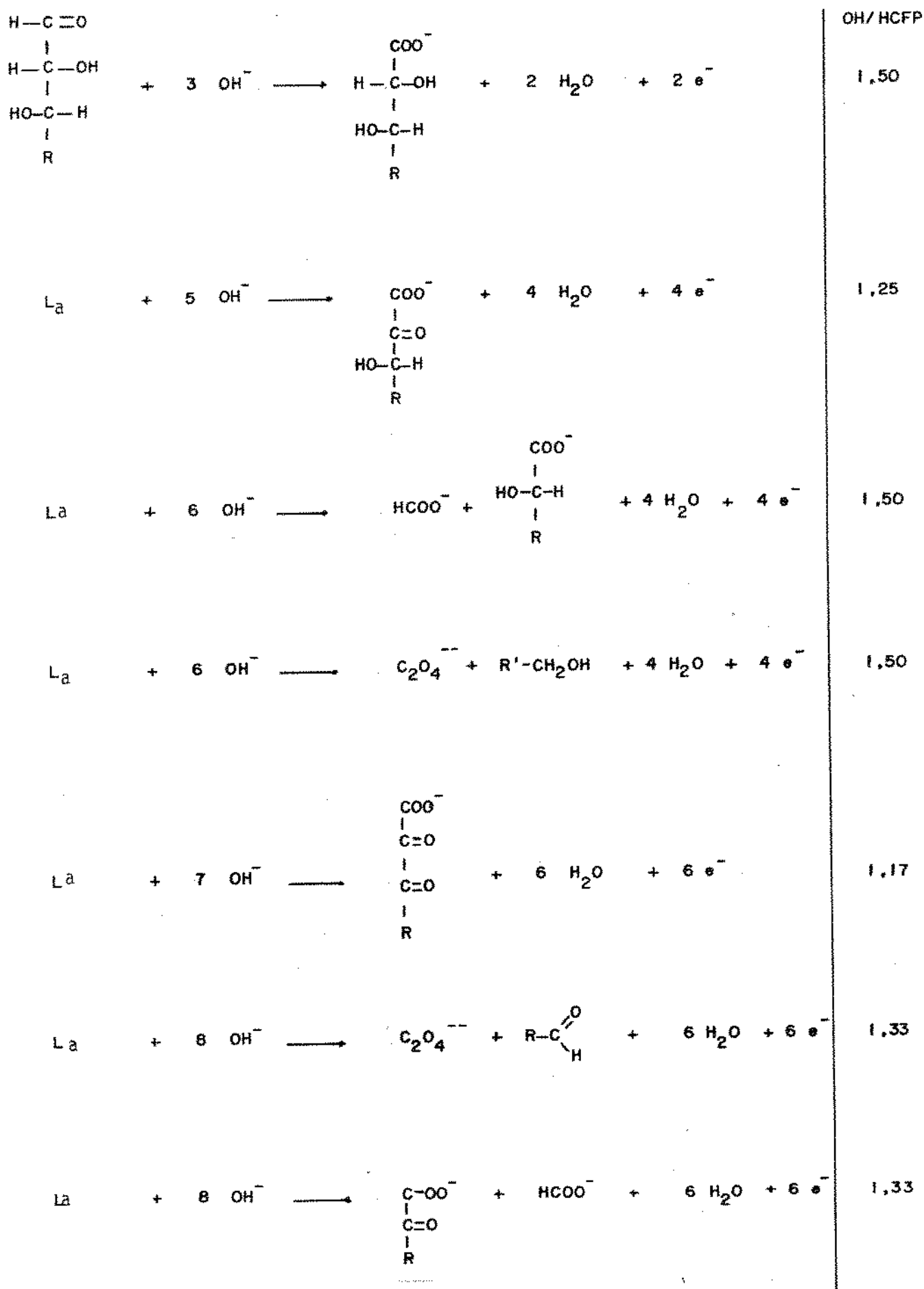


FIG. 10 - Estudo da oxidação de lactose por HCFP em meio alcalino. Reação efetuada a concentração constante de lactose e concentração variável de NaOH. Dados obtidos por medidas de absorbância a 420nm. Tempo de aquecimento = 5 min. Concentração de cobre= 0,0497 mmol

EQUAÇÕES POSSÍVEIS DE OXIDAÇÃO DE LACTOSE
A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO



EQUAÇÕES POSSÍVEIS DE OXIDAÇÃO DE LACTOSE
A VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (cont.)

						OH/HCFP
La	+ 9 OH ⁻	→	RCOO ⁻ + 2 HCOO ⁻ + 6 H ₂ O + 6 e ⁻			1,50
La	+ 10 OH ⁻	→	2 CO ₃ ²⁻ + RCH ₂ OH + 6 H ₂ O + 8 e ⁻			1,25
La	+ 12 OH ⁻	→	C ₂ O ₄ ²⁻ + CO ₃ ²⁻ + RH + 8 H ₂ O + 8 e ⁻			1,50
La	+ 12 OH ⁻	→	RCOH + 2 CO ₃ ²⁻ + 8 H ₂ O + 8 e ⁻			1,50
La	+ 15 OH ⁻	→	R-COO ⁻ + 2 CO ₃ ²⁻ + 10 H ₂ O + 10 e ⁻			1,50
La	+ 16 OH ⁻	→	3 CO ₃ ²⁻ + RH + 10 H ₂ O + 10 e ⁻			1,60

O valor médio da estequiometria obtido experimentalmente na faixa OH/HCFP 1,5 a 2,5 foi de 8,12 sendo encontrado valor pouco superior para OH/HCFP 3,0.

Um estudo da influência do tempo de aquecimento na estequiometria foi efetuado a nível de OH/HCFP 1,5 e 2,0. Na oxidação de lactose com HCFP durante a 25 minutos de aquecimento, leituras de Absorbância a 420 nm demonstraram, nos dois casos, reações envolvendo 10 elétrons, ou seja, detectou-se proporção HCFP/L 10,0. Absorbância da reação a tempos de aquecimento 30, 45 e 60 minutos, na presença de 0,08 mmol de lactose e 0,994 mmol de HCFP, quando efetuados a OH/HCFP 1,5 forneceram igualmente reações com 10 elétrons.

Considerando a relação entre base e oxidante no valor médio da curva mostrada na Figura ou seja, OH/HCFP 2,25 estudamos para a mesma reação a influência do tempo de aquecimento. (Tabela XVI)

Verificou-se que a reação efetuada a 4 minutos de aquecimento envolve 8 elétrons e a 20 minutos de aquecimento a mesma oxidação se dá com 10 elétrons. O gráfico da fig 11 expressa bem o comportamento desta oxidação. O estudo da oxidação a tempos maiores pode ser visto nas tab. XVII e XVIII a valores 1,3, 1,5 e 2,0 de OH/HCFP. Nota-se que a 30 minutos os resultados são coerentes com os obtidos anteriormente, mas a 60 minutos já se observam discrepâncias, principalmente em valores mais baixos de OH/HCFP. Variações da concentração do açúcar evidenciam que há um ligeiro decréscimo na estequiometria, à medida que se

TABELA XVI

ESTUDO DA OXIDAÇÃO DE LACTOSE POR HCFP EM MEIO ALCALINO
(OH /HCFP 2,25) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE AQUECIMENTO

tempo aquecimento (min)	Absorb.420 corrigida	mmol HCFP	mmol HCFP reagidos	HCFP/La
2,0	0,680	0,8263	0,1677	3,36
4,0	0,485	0,5893	0,4046	8,14
6,0	0,463	0,5626	0,4314	8,68
8,0	0,450	0,5468	0,4472	8,99
10,0	0,450	0,5468	0,4472	8,99
15,0	0,420	0,5104	0,4835	9,73
20,0	0,409	0,4970	0,4970	10,00

concentração de lactose = 0,0497 mmol

volume NaOH 0,0497 M = 5,52 mL

HCFP 0,994 mmol inicial

TABELA XVII

ESTEQUIOMETRIA DA OXIDAÇÃO DE LACTOSE COM HCFP EM FUNÇÃO
DA CONCENTRAÇÃO DO AÇÚCAR OBTIDA DE DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

/HCFP	t. aq (min)	Vol. La (mL) 0,01M	A(420)corr.	mmol HCFP	mmol HCFP reagidos	HCFP/La
,0	30,0	0,0	0,801	-	-	-
,0	30,0	3,0	0,566	0,7024	0,2916	9,72
,0	30,0	4,0	0,481	0,5969	0,3971	9,93
,0	30,0	6,0	0,344	0,4269	0,5671	9,45
,0	30,0	7,0	0,269	0,3338	0,6602	9,43
,0	30,0	8,0	0,181	0,2246	0,7694	9,62
,0	30,0	10,0	0,105	0,1315	0,8625	8,62
,5	60,0	0,0	0,806	-	-	-
,5	60,0	2,0	0,676	0,8337	0,1603	8,02
,5	60,0	4,0	0,461	0,5685	0,4255	10,63
,5	60,0	6,0	0,311	0,3835	0,6105	10,17
,5	60,0	7,0	0,183	0,2257	0,7683	9,60

mol iniciais de HCFP = 0,994

TABELA XVIII
ESTUDO DA VARIAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE LACTOSE COM HCFP
UTILIZANDO OH/HCFP = 1,3

tempo de aquecimento 30 min.			tempo de aquecimento 60 min.		
l. La mL)	A(420) corrigida	HCFP/La	Vol. La (mL)	A(420) corrigida	HCFP/La
0	0,800	-	0,0	0,800	-
0	0,648	9,51	2,0	0,594	12,89
0	0,570	9,60	3,0	0,520	11,68
0	0,500	9,39	4,0	0,437	11,36
0	0,425	9,39	5,0	0,394	10,17
0	0,218	9,11	8,0	0,210	9,23
10,0	0,100	8,76	10,0	0,071	9,13

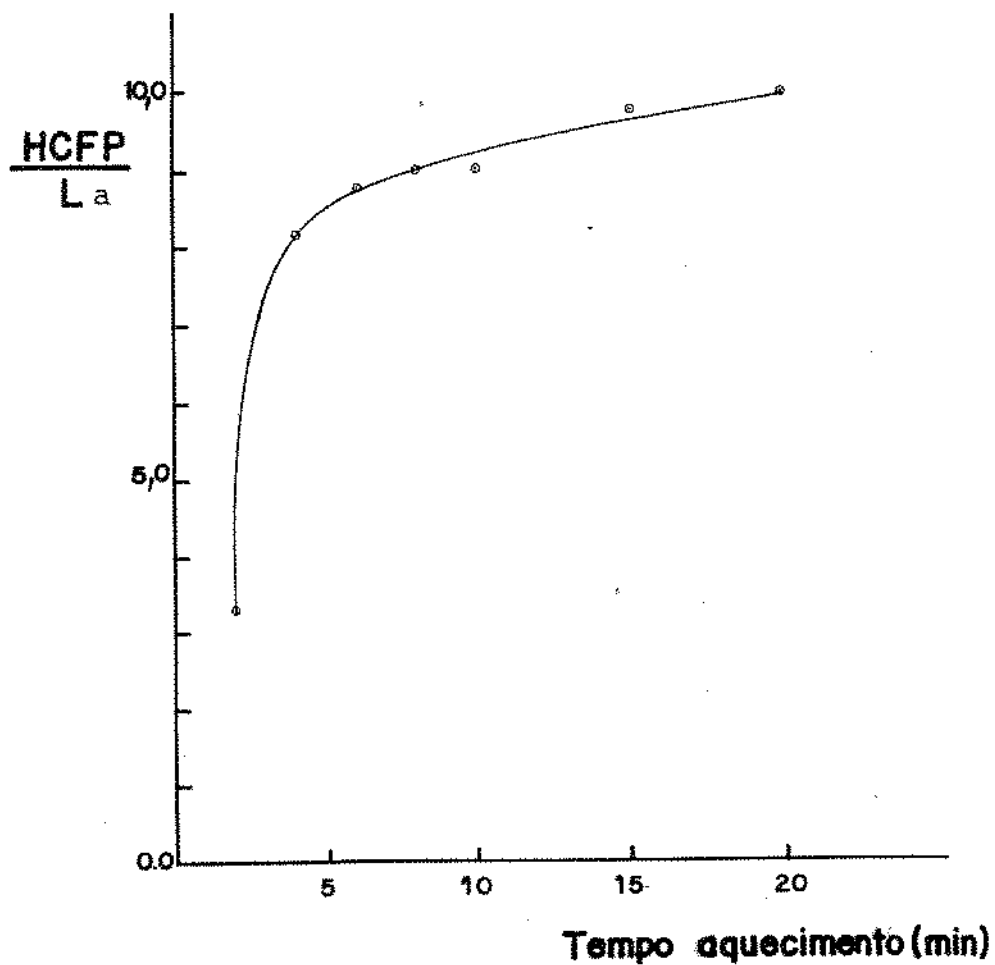


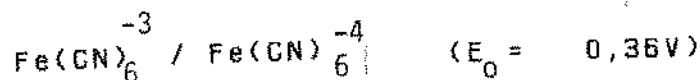
FIG 11 - Avaliação do comportamento estequiométrico da oxidação de lactose por HCFP (OH /HCFP 2,25) em função do tempo de aquecimento.
Dados obtidos de observações espectrofotométricas

aumenta a concentração de açúcar. Soluções contendo 5 vezes mais lactose que a concentração inicial já apresentam desvios consideráveis. O tempo de aquecimento de 60 minutos escapa ao controle de oxidação, apresentando valores completamente diferentes para concentrações baixas de hidróxido de sódio.

A avaliação deste comportamento, pode estar relacionado com oxidação posterior de sub produtos do açúcar, presentes em solução. Efetuou-se um estudo do poder de oxidação de alguns compostos. Para tanto, foi processadas oxidação de 0,25 mmol de compostos que, em sua estrutura, apresentavam grupos funcionais semelhantes àqueles que provavelmente existam.

Oxalato, formiato, lactato, piruvato, glicerol, sorbitol, manitol, tartarato e sacarose foram objeto de estudo, segundo metodologia descrita no ítem III-4.2.3. Em meio alcalino de concentração pré-estabelecida, segundo equações químicas, reagiu-se 0,25 mmol destes compostos com 0,994 mmol de HCFP. As soluções aquosas foram submetidas a tempos de aquecimento de 10 e 30 minutos em banho maria a 95 °C. Através de medidas espectrofotométricas a 420 nm, calculamos o número de mol de oxidante consumidos na reação e em seguida o poder redutor (Tab XIX).

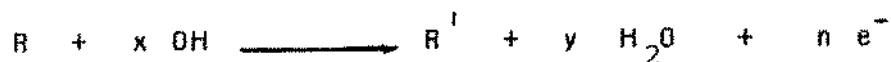
Oxalato e formiato são prováveis produtos de oxidação de açúcares. O valor do potencial normal de oxidação do pares



mostram que o ácido oxálico deve atuar como agente redutor

TABELA XIX

OXIDAÇÃO DE VÁRIOS COMPOSTOS COM FERRICIANETO DE POTÁSSIO

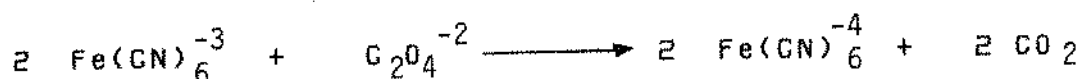


COMPOSTO (ON)	FÓRMULA DO COMPOSTO (R)	tempo de aquecimento			
		10 min.		30 min.	
		OH HCFP	HCFP R	OH HCFP	HCFP R
malato	$C_2^0_4$	3,0	0	2,0	0
formiato	$HC00^-$	4,0	0	1,3	0
citato	$H_3C-CH(OH)COO^-$	1,3	0	4,1	0
ruvato	$H_3C-CO-COO^-$	2,0	1,96	1,3	1,71
glicerol	$HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$	2,0	0,08	1,3	0
orbitol	$HO-CH_2-(CHOH)_4-CH_2OH$	2,0	1,24	1,3	0,72
initol	$HO-CH_2-(CHOH)_4-CH_2OH$	1,3	1,74	1,3	2,58
tartrato	$^-OOC-(CH_2OH)_2-COO^-$	1,3	0	1,3	0,32
sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	2,0	0,23	1,3	0,70

Condições: 0,25 mmol redutor + 0,994 mmol $Fe(CN)_6^{3-}$ aquecidos a 100°C
por 10 e 30 min. Dados obtidos a 420 nm, $\epsilon = 0,794$.

com respeito ao íon ferricianeto.

O desenvolvimento de CO₂ na mistura de reação foi demonstrado por um ensaio eletroquímico com eletrodo de membrana P502 (Orion), por PORRO et al (1981), segundo equação:



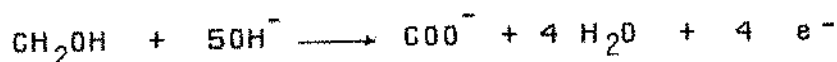
Porém nas condições utilizadas, o poder redutor do ácido oxálico mostrou-se nulo. Ensaio semelhante realizado a 60 minutos de aquecimento e OH/HCFP 1,3 levaram-nos ao mesmo resultado para oxalato e formiato.

PORRO et al. (1981) utilizaram OH/HCFP=33, ou seja um meio alcalino 25 vezes maior que o aqui empregado.

Conforme ficou demonstrado, a concentração da base tem uma influência decisiva sobre o comportamento da oxidação. Isto indica que é perfeitamente possível que na proporção de hidróxido por nós empregada, realmente seja improvável o prosseguimento da oxidação do íon oxalato e formiato.

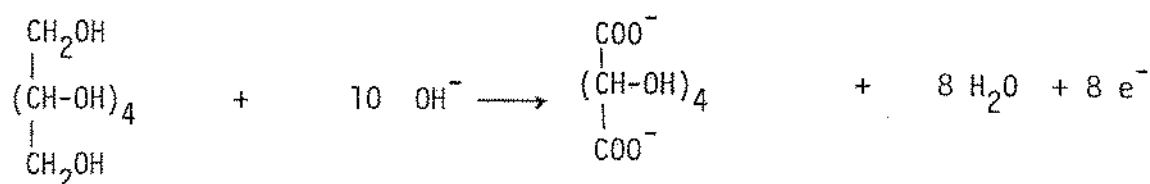
Os resultados obtidos para lactato, indicam que, nas condições experimentais, não é possível oxidá-lo. O íon piruvato é o mais suscetível à oxidação, apresenta o maior poder redutor entre os compostos estudados, com cisão do primeiro átomo de carbono.

Sorbitol e Manitol também apresentaram poder redutor. Estes foram incluídos com vistas à verificação do comportamento do CH OH no decorrer da oxidação. A equação abaixo mostra que um grupamento alcoólico terminal oxida-se envolvendo 4 elétrons.



Na prática, a proporção oxidante/redutor foi inferior à esperada teoricamente.

Para dois grupos CH OH no manitol, a equação justificável seria:



A proporção necessária OH/HCFP = 1,25 foi cumprida na prática, havendo indicação de que a ocorrência de oxidação destes dois compostos leva à obtenção de subprodutos, onde grupo alcoólico terminal deve estar ausente.

Para comparar resultados obtidos com ácido láctico, testamos tartarato. O grupo alfa hidroxílico do tartarato é oxidado muito lentamente, com ou sem descarboxilação.

Visto que a sacarose é um açúcar não redutor e contém CH OH, testamos sacarose, sendo verificado que esta sofre ligeira oxidação.

Entre os produtos finais de oxidação de lactose com HCFP seria viável se encontrar oxalato, formiato e lactato, que não apresentaram poder redutor nas condições descritas.

V - CONCLUSÕES

-É possível, pela modificação proposta no método de Lane-Eynon torná-lo estequiométrico, controlando a intensidade do meio alcalino no reagente de oxidação.

-O uso de solução oxidante como solução titulante na dosagem de açúcares redutores por íons cúpricos evita constante mudança de bureta entre as dosagens, a necessidade de grande quantidade de amostra e o método é sensível para teores entre 9,0 e 50 mg de açúcar redutor.

-A estequiometria da oxidação de aldoses é de 4 átomos de cobre para 1 átomo de açúcar. Para a lactose é de 6:1.

-Solução de cobre:tartarato:hidróxido de sódio na proporção de 1:2:3 satisfazem estequiometria, estabilidade e reprodutibilidade para oxidação de glicose, frutose, manose, galactose e açúcar invertido. Concentrações de sacarose presentes em níveis duas vezes superiores aos teores mínimos estudados ($1,0 \times 10^{-5}$ mol glicose) não apresentam alterações sensíveis na estequiometria.

-Para determinação específica de lactose, a mistura oxidante ideal é cobre:tartarato:hidróxido de sódio = 1:4:3.

-Estudos com eletrodos de cobre/calomelano e cobre/cobre indicam resultados promissores para definição do ponto de equivalência nas reações com íons cúpricos. Técnicas

automáticas de titulações potenciométricas pelo método proposto são indicadas pelo fato da oxidação ocorrer muito lentamente.

-Entre os subprodutos da oxidação de glicose e frutose por ação de íons cúpricos encontramos ácido glicólico, ácido fórmico e ácido láctico.

-A oxidação de lactose com ferricianeto de potássio em meio alcalino é extremamente forte e dados espectrofotométricos indicam uma tendência da oxidação não chegar a um patamar.

-A oxidação de açúcares redutores através de titulação com solução de ferricianeto de potássio em condições rígidas de controle de meio alcalino pode ser indicada, sendo possível monitorá-la através de titulação potenciométrica utilizando eletrodos de tungstênio e platina.

- Na oxidação de açúcares redutores com solução de ferricianeto é possível visualizar a viragem com mais precisão através do uso de 2,6 diclorofenolindofenol sódico como indicador.

VI -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINCIBURU, H.A.(1969) . "Contribucion a la determinación de lactosa en leche: adaptación del método colorimétrico de Somogyi-Nelson." *La Indústria Lechera*, 51: 303-305
- ALEIXO, L.M. & GODINHO, O.E.S. (1985) . " Uso do eletrodo de cobre metálico em potenciometria e titulação potenciométrica. *Química Nova*, 8: 113-115
- AVIGAD, G. (1976) . "Determination of aldoses and other aldehydes with a hydrazine-fluorescamine reagent". *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides*, 3:307-313.
- BACCAN, N; ANDRADE, J.C., GODINHO, O.E.S & BARONE, J.S. (1979) . "Química Analítica Quantitativa Elementar" Cap. 1 Editora Edgard Blucher-SP.
- BAUDINO, O.M. & MARONE, C.B. (1983). "Some applications of 4-(5-Bromo-2-pyridylazo)1,3- diamino-benzene as a metallochromic indicator". *An. Asoc. Quím. Argent.* 71:299-306 em C.A. 99: 191075
- BERTRAND, M.G. (1906) . "Le dosage de sucres reducteurs". *Bull. Soc. Chem. (Fr)* 35:1285-1299.
- BLOM, J. & ROSTED, C. O. (1947) . "On the determination of reducing sugars". *Acta Chem. Scand.*, 1:32-53.

- BOSSET, J.O.; BLANC, B. & PLATTNER, E. (1976). "Le dosage du lactose et de ses produits d'hydrolyse dans le lait et dans quelques produits laitiers : methodes et appareillages tirés de la litterature parue entre 1964 et 1974". Trav. Chim. Aliment. Hyg., 67:488-514.
- BROWN, H.T., MORRIS, G.H. & MILLAR, J.H. (1897) . "V- Experimental Methods employed in the Examination of the products of starch-hydrolysis by diastase. (Section IV- Determination of Cupric reducing power)". J.Chem. Soc., 71: 72-114.
- GOALSTAD, S.E. (1946) . "An eletrometric method for the estimation of sucrose and reducing sugars". J. Soc. Chem. Ind., 65:230 - 232.
- COLLINS, J.R. (1953) . "The Iodometric determination of mannose and other aldoses". Anal. Chim. Acta, 9:500-506.
- DIAMANDIS, E.P. & HADJIOANNOU, T.P. (1982). "Continuous-flow determination of reducing sugars and sucrose in natural and industrial products with periodate oxidation and a periodate-sensitive flow-through electrode". Analyst, 107 : 1471-1478.
- DREYWOOD, R. (1946). "Qualitative test for carbohydrate material". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18:499.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956). "Colorimetric method for determination of Sugars and related substances". Anal. Chem., 28: 350 - 356.

- FLASCHKA, H.A. (1964). "EDTA titrations". Cap. 11, 2nd ed. Pergamon Press.
- FLEURY, P. & LANGE, J. (1932). "Sur l'oxydation des acides alcools et de sucres par l'acide periodique". *Comp. Rend.*, 195:1395 - 1397.
- FOLIN, O. & WU, H. (1919). "A system of blood analysis". *J. Biol. Chem.*, 38:81.
- FOLIN, O. (1928). "A new blood sugar method". *J. Biol. Chem.*, 77: 421-430.
- FORIST, A.A. & SPECK Jr. J.C. (1955). "Cerimetric Determination of Sugars". *Anal. Chem.* 27:1166.
- FORSEE, JR., W.T. (1938). "Determination of sugars in plant materials". *Anal. Chem.*, 10:411-412.
- FRAMPTON, V.L.; FOLEY, L.P.; SMITH, L.L.; MALONE, J.G. (1951). "Quantitative application of the Killiani Reaction". *Anal. Chem.*, 23: 1244-1247.
- GOLDENBERG, F.V. & SPOERRI, P.E. (1959). "Colorimetric determination of dicarboxylic acid derivatives as hydroxamic acids". *Anal. Chem.*, 31: 1735-1737.
- GRANT, W.M. (1948). "Colorimetric determination of formic acid based on reduction to formaldehyde". *Anal. Chem.* 20:267-269.
- GRASSET, V. & OERTEL, H. (1975). "Determination of reducing sugars in potato research using p-hydroxybenzoic acid hydrazide". *Assoc. Potato Res.*, 5: 8.
- em C.A. 84: 149369.

- GUAGNINI, O.A. & VONESCH, E.E. (1959) . "Estudios sobre ácidos hidroxámicos. IX. Microreconocimiento y valoración de ácido fórmico y formiatos inorgánicos. Su aplicación a productos alimenticios". *Mikrochimica Acta.*, 3: 373-379.
- HAGEDORN , H.C. & JENSEN, N.B. (1923) . "Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid" .*Biochem. Z.*, 135: 46-58.
- HANGOS-MAHR & PUNGOR, E. (1984) . "Determination of reducing sugars by the segmented-flow method". *Anal.Chem. Symp. Ser.*, 18: 307-318 em C.A.101:3413.
- HAWKINS, J. A. & VAN SLYKE, D. (1929) . "A time method for determination of reducing sugars, and its application to analysis of blood and urine ". *J.Biol.Chem.*, 81: 459-467.
- HENNART, G. (1965) . "Applications de la chelatometrie- XVI: Emploi du complexe cuivrique de l'E.D.T.A. pour le dosage volumetrique du glucose ". *Talanta*, 12: 420 - 423.
- HILDRETH, A.C. & BROWN G.B. (1942) . "Modification of a Lane-Eynon method for sugar determination". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 25:775-779.
- HODGE, J.E. & HOFREITER, B.T. (1962) . Determination of reducing sugars and carbohydrates .in "Methods in Carbohydrate Chemistry", 2nd Ed., Vol. 1. Academic Press p. 380-394.

- HOFFMAN, W. S. (1937) . "A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine". J. Biol. Chem., 120: 51.
- HONDA, S.; TAKAHASHI, M.; NISHIMURA, Y.; KAKEHI, K.; GANNON, S. (1981) . "Sensitive ultraviolet monitoring of aldoses in automated borate complex anion-exchange chromatography with 2-cyanoacetamide". Anal. Biochem., 118: 162-167.
- JACKSON, R.F. & McDONALD, E.J. (1942). "Contamination of cuprous oxide in reducing sugar analysis". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 25: 988-989.
- JAKOBS, G., SOLEM, E.E.K.J., HALVORSEN, K., JELLUM, E. (1977). Investigation of the metabolic pattern in maple syrup urine by means of glass capillary gas chromatography and mass spectrometry . Chromatography, 143: 31-38.
- JANSHEKAR, H. & MOR, J.R. (1977) . "Automated determination of sugar in molasses". Anal. Chim. Acta, 90: 201-207.
- KOLTHOFF, I.M. & ELVING, P.J. (1961) . "Treatise on Analytical Chemistry" - Part II. Interscience, New York. p 215
- KOLTHOFF, I.M. & TANAKA, N. (1954) . "Rotated and stationary platinum wire electrodes". Anal. Chem., 26: 632-636
- KOLTHOFF, I.M.; SANDELL, E.B.; MEEHAN, E.J.; BRUCKENSTEIN, S. (1969) . "Quantitative Chemical Analysis" - 4th Ed., Mac Millan Company, New York, p 184.

- KRAUSE, E.W. (1977) . "Rapid eletrochemical determination of reducing saccharides". Z. Zuckerind, 27: 85-86.
em C.A. 86: 191603.
- LAITINEN, H.A. & HARRIS, W.E. (1975) . "Chemical Analysis".
2nd Ed., Mc Graw-Hill, Kogakusha, p 374.
- LANE, J. H. & EYNON, L. (1923) . "Determination of reducing sugars by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator". J. Soc. Chem. Ind., 42: 32T-37T.
- _____ (1925) . "Preparation of Fehling's solution for the volumetric determination of reducing sugars". J. Soc. Chem. Ind., 44: 150T-152T.
- _____ (1927) . "Determination of sucrose in dried beetroot cossettes". J. Soc. Chem. Ind. 46: 177T-178T.
- _____ (1931) . "The determination of small proportions of invert sugar in raw sugars". J. Soc. Chem. Ind., 50: 85T-86T.
- LATIMER, W.M. (1952) . "The oxidation states of the elements and their potentials in aqueous solutions"
2nd Ed., Prentice Hall, Inc., New York, p 185.
- LEHRFELD, J. (1985) . "Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids and aldoses". Anal. Chem., 57: 345-348.
- LUFF G. & SCHOORL, N. (1931) . Handboek Methoden van Onderzoek bij die Java-Suikerindustrie, p 378.
- Mc DONALD, E. J. (1948) . "Report on reducing sugars". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 31: 196-199 .

- Mc DONALD, E. J. (1949) . "Report on reducing sugars".
J. Assoc. Off. Anal. Chem. , 32:188-189.
- Mc DONALD, E.J. (1952) . "Report on reducing sugar methods of analysis". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 35: 648-650.
- Mc DONALD, E.J. (1953) . "Report on reducing sugar methods". J. Assoc. Off. Anal. Chem, 36: 259-260.
- Mc DONALD, E.J. (1955) . "Report on reducing sugars". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 38: 594-597.
- Mc DONALD, E.J. (1957) . "Report on reducing sugars". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 40: 320-321.
- Mc DONALD, E.J. & TURCOTTE, A.L. (1947). " Further studies on Ofner's methods for the determination of invert sugar". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 30: 124 - 130.
- MALAPRADE, M.L. (1928) . "Oxydation de quelques polyalcools par l'acide periodique. Applications."Comp.Rend., 186: 382-384.
- MARTINS, M.R. & CAPELATO, M.D.(1985). "Eletrodos indicadores de aço inoxidável". Resumos do 2 Encontro de Química Analítica, RJ, p 96.
- MASDOM, M. & TOWNSHEND A. (1985) . "Simultaneous determination of sucrose and glucose in mixtures by flow injection analysis with immobilized enzymes". Anal. Chim. Acta., 171: 185-194.
- MEITES, L. (1963) . "Handbook of Analytical Chemistry"- Mc Graw-Hill, New York, USA.

- MEUR, S.K.; RAO, V.S.; DE, K.B. (1977) . "Spectrophotometric estimation of reducing sugars by variation of pH". Fresenius' Z. Anal. Chem., 283: 195-197.
- MIKAMI H. & ISHIDA, Y. (1982) . "Post-column fluorometric detection of reducing-sugars in HPLC using arginine". Bunseki Kagaku: 32:E207-E210 em C.A. 99: 63599
- MILLER, G.L. & BURTON, A.L. (1959) . "Spectrophotometric determination of aldoses by an iodometric procedure". Anal. Chem., 31: 1790-1793.
- MORRIS, D.L. (1948). "The quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent". Science, 107: 254 -255.
- MUNSON, L.S. & WALKER, P.H. (1906) . "The unification of reducing sugar methods". J. Am. Chem. Soc., 28: 663-686.
- NARASARAJU, T.S.B.; RAO, V.L.N.; SINGH, R.P. (1971) . "Indirect titrimetric determination of glucose using Fehling's solution and EDTA". Z. Anal. Chem., 253:37-38.
- NELSON, N. (1944) . "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". . Biol. Chem., 153: 75-378.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1980). 13 th Ed., William Horwitz Editor, Washington, D.C.
- OFNER, R. (1934). Z. Zuckerind Cech. Repub. 59:52 , apud Mc DONALD ,E.J. & TURCOTTE, A.L. (1947). "Further studies on Ofner's method for the determination of invert sugar". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 30: 124-130.

- PALANIVEL, A. & RIYAZUDDIN, P. (1984) . " Indirect Potentiometric determination of reducing sugars". Curr. Sci., 53: 647-649.
- PALLA, G. (1981) . "C-18 reversed-phase liquid chromatographic determination of invert sugar, sucrose and raffinose". Anal. Chem., 53: 1966-1967.
- PAPASTATHOPOULOS, D.S.; NIKOLELIS, D.P.; HADJIOANNOU, T.P. (1977) . "Determination of reducing sugars in honey, marmalades and fruit Juices using a copper ion-selective electrode". Analyst, 102: 852-857.
- PASQUINI, C., SILVA, G.L.J.P., AMORIM, H.V., ZAGO, E.A.; FURLANETO, F. (1985). "Determinação de açúcar redutor em caldo de cana por análise por injeção em fluxo e detecção refratométrica.
Resumos do III ENQA, pag 64
- PIERCE, W.C.; SAWYER, D.T.; HAENISCH, E.L. (1958) . "Quantitative Analysis" 4th. Ed. John Wiley & Sons. Inc. N.Y. USA.
- PIGMAN, W.W. & WOLFROM, M.L. (1960) . "Advances in Carbohydrate Chemistry " - Vol. 3. Academic Press Inc., N.Y.
- PORRO, M.; VITI, S.; ANTONI, G.; NERI, P. (1981) . "Modifications of the Park-Johnson ferricyanide submicro-methods for the assay of reducing groups in carbohydrates". Anal. Biochem., 118: 301-306.
- RAJAKYLÄ, E. (1981). "Separation and determination of some organic acids and their sodium salts by high performance liquid chromatography ". J. Chromatogr., 218: 695-701.

- REINEFELD, E.; BLIESENER, K.M.; VAN MALLAND, H.; REICHE L, G. (1976) . "Contribution to the determination of invert sugar in technical sugar Juices. Part 1. New photometric method with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole as a color reagent". Zucker, 29: 308-316 em C.A. : 86 a 8560
- ROBIN, J.P. & TOLLIER, M.T. (1981) . "Automatic assay of reducing sugars using tetrazolium blue. Application of gel-permeation chromatography". Sci. Aliments., 1: 233-246.
- RODELLA, A.A. (1979) . "Determinação de açúcares por entalpiometria de injeção direta". Tese Mestrado apresentada ao Instituto de Química - UNICAMP.
- ROSS, J.W. & SHAIN, I. (1956) . "Oxidation of platinum electrodes in potentiometric redox titrations". Anal. Chem., 28:548-551.
- RUPPOLT, W. (1976) . "2,6 Dichlorophenolindophenol as reagent for reducing sugars". Prax. Naturwiss. Chem., 25: 293-294.
- SANDELL, A. (1974) . "Stable reagent for the determination of reducing sugars". Prax. Naturwiss., 23: 186-187.
- SATTLER, L. & ZERBAN, F. W. (1948) . " The Dreywood an-throne reaction as affected by carbohydrate structure". Science, 108: 207.
- SHAHINE, S. & MAHMOUD, R. (1980) . "Indirect spectrophotometric determination of reducing sugars and ascorbic

- acid using phenolphthalin as reagent". *Mikrochim. Acta*, 1: 119-122.
- SHARMA, N.N. (1956) . "Gerate oxidimetry IV. Oxidation of carbohydrates". *Anal. Chim. Acta*, 14: 423-426.
- SKELL, P.S. & CRIST, J.G. (1954) . "A rapid gasometric method of analysis for "reducing " sugars and other carbonyl compounds". *Nature*, 173: 401.
- SMITH, R.P. (1952) . "Report on sugars in baked products". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 35:682-686.
- SMITH, M.J. & MANAHAN, S.E. (1973). "Copper determination in water by standard addition potentiometry". *Anal. Chem.*, 45: 836.
- SOLIMAN, K. & BELAL, S.A. (1974). "Application of argentimetric titration in semimicrodetermination of some reducing sugars". *J. Drug Res.*, 6: 1-5.
- SOLONIEWICZ, R. & TEODORCZYK, M. (1977) . "New color reaction for the determination of reducing sugars". *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 283: 304 em *C.A.* 86:182674 e *Analytical Abstracts* 33: 6C17.
- SOLONIEWICZ, R. & TEODORCZYK, M. (1982) . "Spectrophotometric determination of reducing sugars with aromatic nitrocompounds". *Mikrochim. Acta*, 1: 105-114 em *C.A.* 96: 79173.
- SOMOGYI, M. (1945) . "A new reagent for the determination of sugars". *J. Biol. Chem.*, 160: 61-68.
- STREET, H.V. (1958). "Determination of glucose in biological fluids with ethylenediaminetetracetic Acid". *Analyst*, 83: 628-634.

- SULAIMAN ,S.T. & AMIN,D. (1983). "Indirect amplification method for determining aldoses by differential pulse polarography". IRAQI J. Sci. 23: 20- 27 em C.A. 99: 186765.
- THOMAS,W. & DUTCHER, R.A. (1924) . "The colorimetric determination of carbohydrates in plants by the picric acid reduction method I. The estimation of reducing sugars and sucrose". J.Am. Chem. Soc., 46: 1662-1669.
- VETTER, K.J. & SCHULTZE, J.W. (1972) . "The kinetics of the electrochemical formation and reduction of monomolecular oxide layers on platinum in 0,5 M sulfuric acid. Part I. Potentiostatic pulse measurements". J. Electroanal. Chem., 34: 131-139.
- WAGER, H. (1954) . "An improved copper reduction method for the micro-determination of reducing sugars". Analyst, 79: 34-38.
- WATANABE, N. & INQUE, M. (1983) . "Amperometric detection of reducing carbohydrates in liquid chromatography". Anal. Chem., 55: 1016-1019.
- WINTER, P.K. & MOYER, H.V. (1953). "The assymetry of the ferrous iron-dichromate titrations curve". J. Am. Chem. Soc., 57: 1402-1403.
- WNUKOWSKI, M. (1984) . "Cane sugar invert analysis by HPLC utilizing a post column derivatization reaction". Inst. Sugar J., 86: 170-175