

Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca

Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent

Angela Alves dos Santos^{1,2,‡}, Junior Romeo Deoti^{1,2,‡}, Gabriela Müller¹, Marcelo Goulart Dário¹, Boris Ugarte Stambuk¹, Sérgio Luiz Alves Junior^{2*}

¹ Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Florianópolis/SC - Brasil

² Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, Chapecó/SC - Brasil

[‡] Ambos autores contribuíram igualmente para este manuscrito

*Corresponding Author

Sérgio Luiz Alves Junior, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, Rodovia SC 484, km 2, Bairro Fronteira Sul, CEP: 89815-899, Chapecó/SC - Brasil, e-mail: slalvesjr@uffs.edu.br

Cite as: *Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. Braz. J. Food Technol., v. 20, e2015113, 2017.*

Received: Dec. 28, 2015; Accepted: Dec. 15, 2016

Resumo

O método colorimétrico mais amplamente empregado para a determinação de açúcares redutores utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante. No entanto, essa metodologia clássica demanda grande quantidade de reagente (DNS), amostra e tempo. No intuito de reduzir custo e tempo empregados nos ensaios, adaptamos o método clássico de DNS, realizado em tubos, a um rápido e econômico experimento em microplacas de 96 poços. Os resultados obtidos com essa nova metodologia foram comparados a análises por HPLC em 60 amostras, oriundas de cultivos laboratoriais de leveduras vinícolas, e diferiram em menos de 10%. Assim sendo, esse novo método, que pode ser considerado validado em relação ao método padrão e a análises cromatográficas, revela-se um ensaio rápido e de baixo custo para a determinação de açúcares redutores.

Palavras-chave: Açúcar redutor; Frutose; Glicose; Leitor de microplaca; Levedura.

Summary

The most used colorimetric method for the determination of reducing sugars uses 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) as the oxidizing agent. Nevertheless, this classic method expends significant amounts of the reagent (DNS), sample and time. Aiming to reduce costs and time, we adapted the classic DNS method, assayed in tubes, into a rapid and economic experiment in 96-well microplates. The results obtained with this new method were compared with HPLC analyses in sixty samples, obtained from laboratory cultures of wine yeasts and the data differed by less than 10%. Thus, this new method can be considered to be validated in relation to the standard method and chromatographic analyses, and reveals itself as a rapid and low cost assay for the determination of reducing sugars.

Keywords: Reducing sugar; Fructose; Glucose; Microplate reader; Yeast.

1 Introdução

Açúcares redutores são carboidratos que possuem seu grupo carbonílico livre, capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes em solução alcalina. Essa oxidação ocorre apenas com o monossacarídeo em sua forma linear – que está em equilíbrio com sua estrutura cíclica. Assim, o carbono carbonílico, denominado anomérico quando na estrutura cíclica, é oxidado a um grupo carboxílico. Por outro lado, os

carboidratos cujos carbonos anoméricos estão envolvidos em ligações glicosídicas, sendo incapazes de assumirem a sua forma linear e, portanto, de se oxidarem em solução alcalina, são denominados açúcares não redutores, como exemplo, a sacarose (SILVA et al., 2003; NELSON; COX, 2014).

Dentre os açúcares redutores, duas hexoses particularmente importantes para a indústria, especialmente a de alimentos,



Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca

Santos, A. A. *et al.*

são a glicose e a frutose. Esses carboidratos são dois dos principais monossacarídeos presentes em processos fermentativos, dentre os quais se destacam a produção de vinho, cachaça e etanol combustível (BASSO *et al.*, 2008; STAMBUK *et al.*, 2008; TRONCHONI *et al.*, 2009; BADOTTI *et al.*, 2010; CORTÉS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011; DÁRIO, 2012; DELLA-BIANCA *et al.*, 2013). A glicose e a frutose são monossacarídeos de seis carbonos (hexoses) que se diferenciam pela forma cíclica e pela posição do grupo carbonila presente em suas estruturas. A primeira é classificada como piranose, por apresentar anel com seis carbonos em sua forma cíclica, e como aldose, por seu grupo carbonila apresentar-se como aldeído. A segunda classifica-se como furanose, pois assume a forma cíclica em um anel com cinco carbonos, e como cetose, pois seu grupo carbonila apresenta-se como uma cetona (MORRISON; BOYD, 2011).

Em virtude do seu largo emprego na indústria fermentativa, a detecção desses carboidratos nos mostos mostra-se importante não só no início dos processos citados, para se saber o percentual teórico de etanol que pode ser obtido, como também durante e no fim da fermentação, para se avaliar a velocidade de consumo dessas fontes de carbono e o quanto de açúcar deixou de ser fermentado, reduzindo a eficiência do processo e/ou alterando a qualidade do produto final – como a possibilidade de ocorrer refermentação após o engarrafamento de bebidas. Além disso, no caso do vinho, por exemplo, a detecção desses açúcares redutores no produto final pode ser necessária para a classificação da bebida em seca, semiseca ou suave (FERNÁNDEZ-NOVALES *et al.*, 2009; NEGRULESCU *et al.*, 2012). Do mesmo modo, pesquisas realizadas nas áreas de fermentação e de química de carboidratos dependem de uma medição acurada dos níveis desses açúcares, sejam elas direta ou indiretamente ligadas ao interesse da indústria.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é hoje, entre os métodos mais difundidos para quantificação de moléculas, o que garante maior precisão na medida de concentração desses carboidratos em solução. No entanto, um cromatógrafo a líquido e suas colunas ainda estão além das possibilidades de muitos laboratórios. Para contornar essa falta, também são amplamente utilizados métodos colorimétricos para dosagem de açúcares redutores; entre esses métodos, o mais comumente utilizado é o descrito por Miller (1959), que, com ou sem adaptações, detecta esses carboidratos através do reativo DNS, que contém ácido 3,5-dinitrosalicílico como agente oxidante.

O método de DNS foi inicialmente empregado para medir açúcares no sangue e na urina (SUMNER, 1921; SUMNER; SISLER, 1944; GONÇALVES *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012). Mais tarde, Miller (1959) aperfeiçoou o ensaio, de modo que seu protocolo foi o mais empregado por muitos anos, com diversos fins, e o mais citado na literatura. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante

presente no reativo DNS), sob condições alcalinas, reage com o carbono carbonílico de açúcares redutores e se reduz a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto corado cuja absorção máxima de luz se dá a 540 nm (GONÇALVES *et al.*, 2010; NEGRULESCU *et al.*, 2012).

A dosagem de açúcares redutores através de DNS requer, entretanto, mesmo nos protocolos (adaptações) mais econômicos, considerável volume de reagente e, em sua maioria, leituras individuais de amostras em espectrofotômetro, demandando dispêndio significativo de tempo e dinheiro em cada análise (SUMNER, 1921; SUMNER; SISLER, 1944; MILLER, 1959; LEUNG; THORPE, 1984; BREUIL; SADDLER, 1985; SCHWALD *et al.*, 1988; HU *et al.*, 2008; SAQIB; WHITNEY, 2011; DÁRIO, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2012). Assim sendo, no intuito de diminuir os custos com a dosagem desses carboidratos e acelerar a análise de amostras em processos produtivos e/ou laboratórios de pesquisa, adaptamos a referida metodologia para leitura em microplacas de 96 poços. O presente manuscrito apresenta, portanto, um novo método de Dosagem de Açúcares Redutores que demanda menos amostra e reduz significativamente a quantidade de reagente e de tempo empregados nas análises. Os testes foram realizados com amostras provenientes de crescimentos celulares de leveduras em meios de cultura contendo glicose ou frutose como fontes de carbono.

2 Material e métodos

2.1 Crescimento celular

Foram realizados ensaios de crescimento celular com cinco linhagens de leveduras diferentes, previamente isoladas de produções de vinho colonial não comerciais (de pequenos produtores) da região oeste do Estado de Santa Catarina. Cada linhagem de levedura, após pré-cultivo de 48 h, foi cultivada por 34 h em frasco Erlenmeyer (a 28 °C sob agitação de 145 rpm) contendo meio sintético líquido (0,67% de base nitrogenada) com 2% de glicose ou 2% de frutose como fonte de carbono. Ao longo de cada cultivo, seis amostras foram coletadas em tempos pré-determinados (0,0, 9,5, 15,5, 20,5, 22,5 e 34,0 horas de incubação) e centrifugadas, e seus sobrenadantes foram utilizados para a determinação do consumo de glicose ou frutose pelas leveduras. Tendo sido avaliadas 5 linhagens, cada uma delas em 2 condições diferentes (meio com glicose ou frutose como fonte de carbono), tivemos um total de 60 amostras, que tiveram sua concentração de açúcar dosada por HPLC e pelo novo método de DNS proposto no item 2.2.

2.2 Dosagem de glicose e frutose

A dosagem de glicose e frutose consumidas durante o crescimento celular foi realizada através de um novo método colorimétrico, objeto deste manuscrito, adaptado do descrito por Miller (1959). Nesse novo método, em vez de em tubos, a reação se processou em microplacas de

Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca

Santos, A. A. et al.

96 poços (de fundo chato – TPP), conforme o seguinte protocolo: em cada poço das microplacas foram adicionados 25 µL de amostra (conforme a necessidade, diluídas 20, 10 ou 2 vezes com água destilada, de modo que sua leitura ficasse dentro da curva de calibração) e 25 µL do reativo DNS (1% ácido 3,5-dinitrosalicílico e 30% tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 mol/L de NaOH), os quais foram pipetados com micropipetas multicanal de 8 ou 12 canais. As curvas de calibração, com cinco concentrações de glicose ou frutose (0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 2,0 g/L), foram montadas em todas as microplacas lidas. Depois de pipetados amostras e reativo, as microplacas foram seladas com filme plástico (AccuClear Sealing Film, T796400, E&K Scientific) e levadas a banho fervente por 5 minutos. Em seguida foram resfriadas em gelo, o filme plástico que as selava foi retirado e 330 µL de água foram adicionados. As microplacas foram, por fim, levadas ao Leitor de Microplacas (BioTek ELx800) e as amostras foram lidas a 490 nm (com um feixe emitido por vez no centro de cada poço). As concentrações, em g/L de glicose ou frutose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorvância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel. Apenas para efeito de comparação, duas curvas de calibração foram obtidas pelo método clássico (tradicional), também com 5 concentrações diferentes de glicose ou frutose (0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 2,0 g/L), da seguinte forma: em cada tubo, foram adicionados 1,0 mL de amostra de concentração definida e 1,0 mL do reativo DNS (1% ácido 3,5-dinitrosalicílico e 30% tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 mol/L NaOH). Em seguida, os tubos foram aquecidos em banho fervente por 5 minutos e, posteriormente, resfriados no gelo. Por fim, foram adicionados 7,5 mL de água a cada tubo e as absorvâncias foram lidas, individualmente, a 540 nm.

Com vistas a validar a metodologia de dosagem de açúcares redutores em microplaca, as mesmas amostras foram utilizadas para a dosagem de glicose e frutose através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), nas seguintes condições: coluna HyperREZ XP ácido orgânico (Thermo Scientific), fase móvel com água, taxa de fluxo de 0,3 mL/min durante 25 min, temperatura da coluna de 20 °C e detecção através de índice de refração (IR-2031 plus, Jasco). As curvas de calibração em HPLC foram estabelecidas utilizando 4 concentrações diferentes de glicose ou frutose (2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 g/L).

Todas as medidas foram realizadas em duplicata e os dados obtidos foram comparados estatisticamente por meio do teste t-pareado.

2.3 Cálculo de sensibilidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade dos métodos empregados neste manuscrito foi medida pelo coeficiente angular das respectivas retas de calibração e a linearidade, pelo coeficiente de

correlação. Os limites de detecção (LOD – Equação 1) e os limites de quantificação (LOQ – Equação 2) dos métodos foram calculados por meio das duas equações subsequentes (LONG; WINEFORDNER, 1983; CURRIE, 1999; AMARANTE JUNIOR et al., 2001; BRITO et al., 2003; GONÇALVES et al., 2010):

$$\text{LOD} = \frac{(3 \times \text{SB})}{m} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{(10 \times \text{SB})}{m} \quad (2)$$

Nessas equações, *SB* corresponde ao desvio padrão das concentrações do analito para a linha de base do método e *m* corresponde à sua sensibilidade.

3 Resultados e discussão

Em todos os experimentos realizados pelo novo método em microplacas, o coeficiente de determinação (R^2) foi sempre maior do que 0,99, conforme pode ser visto nos exemplos apresentados na Figura 1, que mostra também, para efeitos de comparação, duas curvas de calibração obtidas pelo método clássico (Figuras 1C e D).

No intuito de validar o presente método de DNS em microplaca, as dosagens de glicose e frutose realizadas por meio dele foram confrontadas com a quantificação de ambos açúcares, nas mesmas amostras, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Em 60 amostras, com concentrações de açúcar que variaram entre 0 g e 20 g/L, os valores obtidos em microplacas diferiram em menos de 10% daqueles obtidos através da análise por HPLC (Figuras 2 e 3). Nessa comparação, ao empregarmos o teste estatístico t-pareado, independentemente para as amostras com glicose e com frutose, obtivemos, respectivamente, os valores de $p = 0,40$ e $p = 0,28$. Ambos os valores garantem que as medidas efetuadas por DNS em microplaca e por HPLC são significativamente iguais ($p > 0,05$), o que valida, portanto, o método aqui apresentado.

Os gráficos das Figuras 2 e 3 representam o consumo de glicose (Figura 2) e frutose (Figura 3) durante o crescimento celular de cinco diferentes linhagens de leveduras isoladas de mosto de vinho colonial de diferentes produtores da região oeste do Estado de Santa Catarina (cujos dados de caracterização bioquímica serão publicados em breve). Cada linhagem foi cultivada em meios sintéticos líquidos contendo glicose ou frutose como fonte de carbono. Cada ponto no plano cartesiano representa a concentração de açúcar restante no meio de cultura no momento (tempo) em que a amostra foi coletada durante o crescimento celular.

O novo método também foi validado pela análise da sua sensibilidade, da sua linearidade e dos seus limites de detecção e quantificação. Como pode ser verificado na

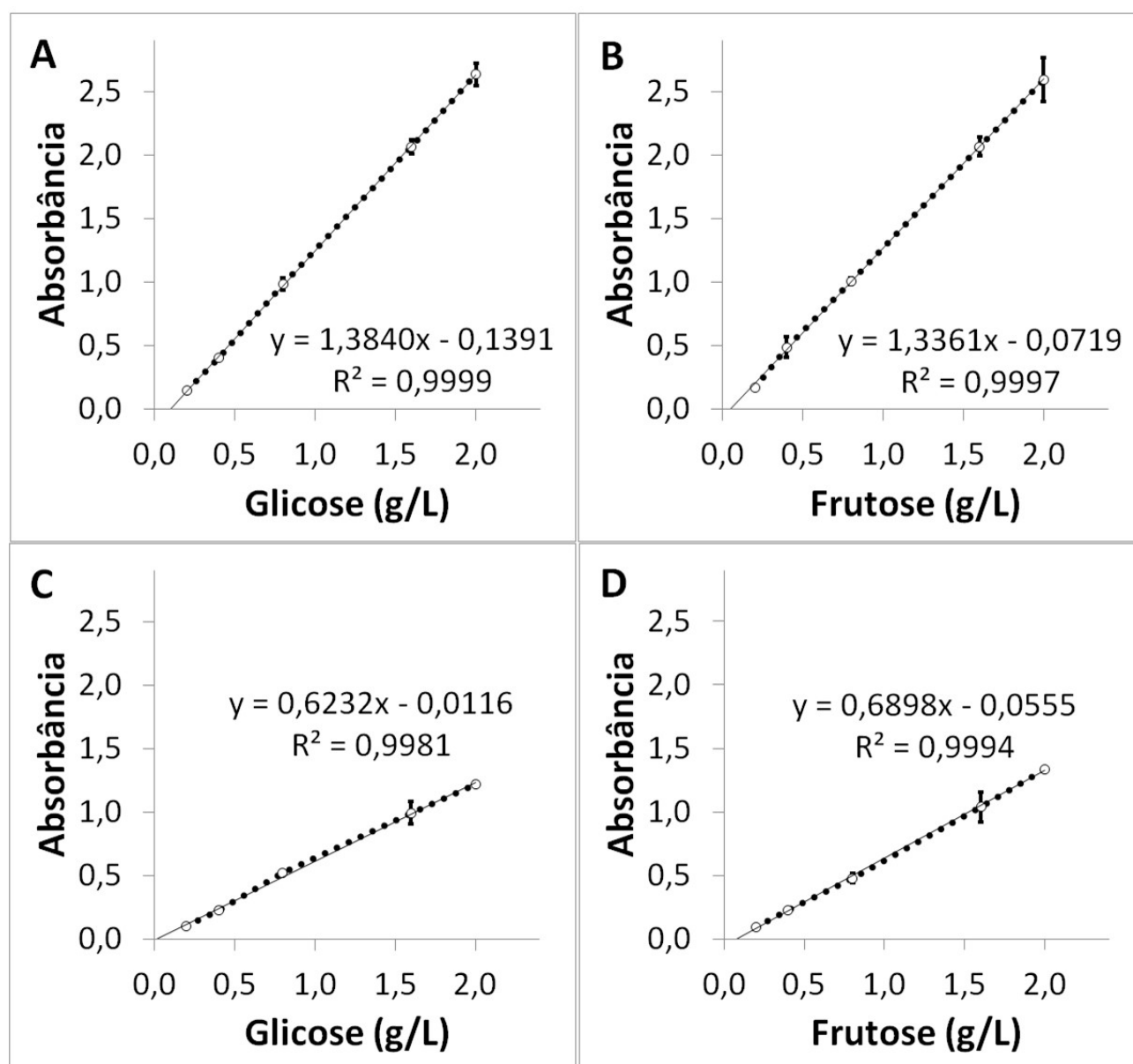
Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplacaSantos, A. A. *et al.*

Figura 1. Curvas de calibração com glicose (A, C) e frutose (B, D) pelo método proposto em microplacas (A, B) e pelo método clássico (tradicional) em tubos e com leitura individual em espectrofotômetro (C, D).

Tabela 1, os valores indicam forte linearidade para todos os métodos avaliados. Quanto à sensibilidade, o novo método demonstra um valor maior que o método tradicional, o que indica ser ele mais sensível. Recentemente, Gonçalves *et al.* (2010) também desenvolveram uma adaptação semelhante ao método de DNS e calcularam esses mesmos quatro parâmetros. Em comparação ao demonstrado por esses autores, nosso método apresentou-se mais sensível e mais linear, com limites de detecção e quantificação inferiores.

Embora os protocolos mais antigos demandem grandes volumes de reagente para a dosagem de açúcares redutores em cada amostra, que pode chegar a 4,0 mL de DNS (MILLER, 1959; SUMNER, 1921; SUMNER; SISLER, 1944; LEUNG; THORPE, 1984; BREUIL; SADDLER, 1985;

SCHWALD *et al.*, 1988), nos últimos anos vários grupos de pesquisa vêm propondo adaptações da reação com DNS a microplacas. Com exceção do protocolo padronizado por Gonçalves *et al.* (2010), entretanto, todos os demais protocolos em microplaca demandam de 2,4 a 6,8 vezes mais reagente por amostra analisada em comparação ao método proposto (DECKER *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2004, 2005; KING *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010; RAMADA *et al.*, 2010; NEGRULESCU *et al.*, 2012; WOOD *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014). O protocolo de Gonçalves *et al.* (2010), por outro lado, embora utilize os mesmos 25 μ L de DNS empregados em nosso método, demanda o dobro de tempo de incubação destinado à reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalisílico pelo açúcar (para geração da

Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca

Santos, A. A. et al.

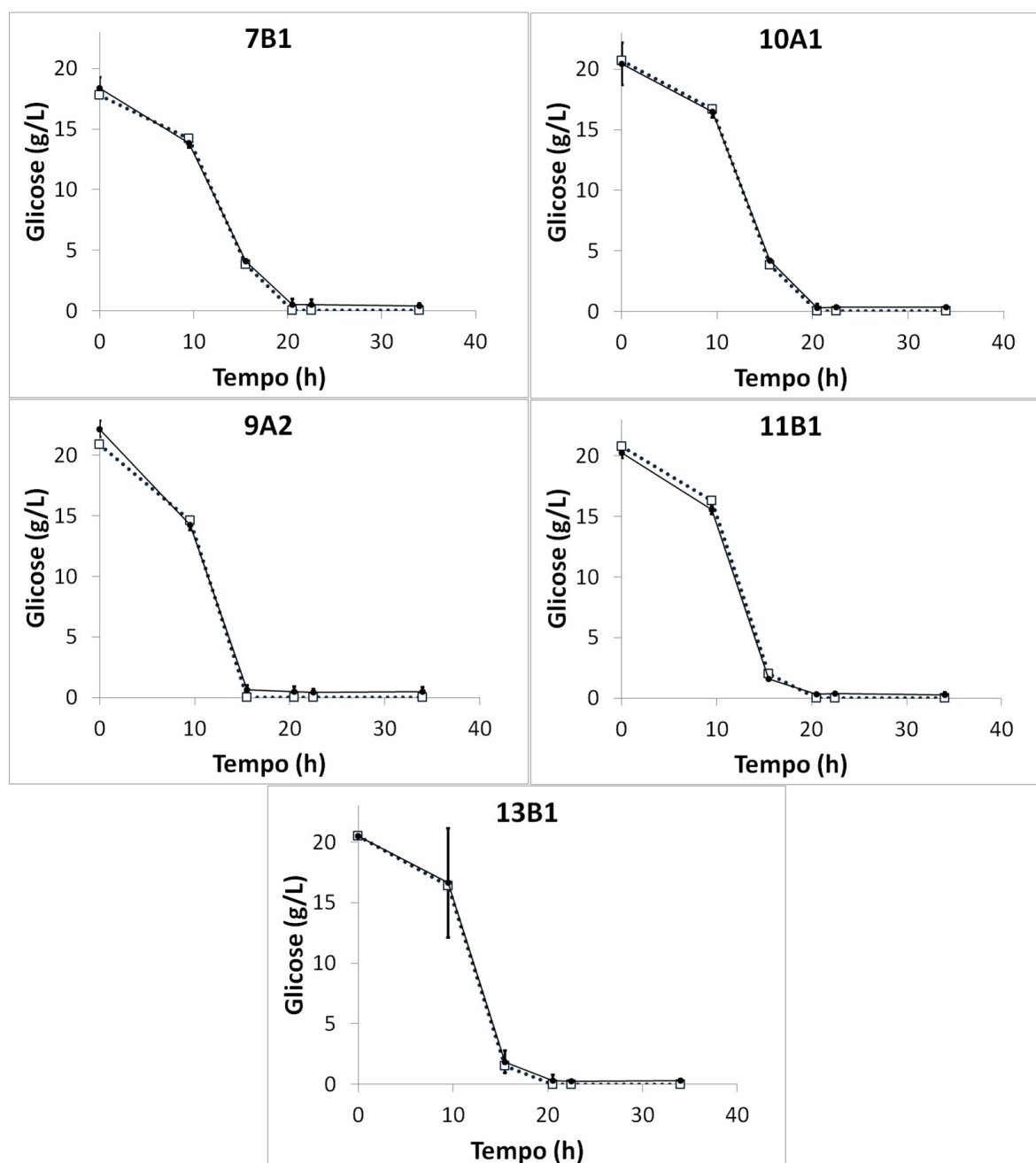


Figura 2. Determinação das concentrações de glicose em amostras coletadas ao longo do crescimento celular de diferentes linhagens de leveduras de vinho colonial, através do método proposto em microplaca (●) e através de HPLC (□). Os códigos das linhagens são apresentados na parte superior central de cada gráfico. As barras de erro correspondem aos desvios padrões das duplicatas feitas em microplaca.

cor), haja vista que aqueles autores procederam à reação em estufas em vez de em banho fervente, o qual permite transferência de calor mais eficiente. Uma comparação entre o uso de reagentes e o tempo de incubação em cada método é apresentada na Tabela 2.

Vale salientar que o tempo de incubação é crítico, especialmente nos ensaios em microplaca, para a manutenção da concentração das amostras, haja vista a

evaporação que pode ocorrer na temperatura em que a reação acontece (WOOD et al., 2012). Assim sendo, um curto intervalo de tempo e o uso de filmes para selar as microplacas são essenciais para a precisão das medidas.

Outra vantagem do novo método apresentado sobre a maioria dos demais é o uso de apenas uma microplaca para cada 96 amostras. Na maior parte dos protocolos, a reação, por conta da quantidade de DNS empregado e

Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca

Santos, A. A. et al.

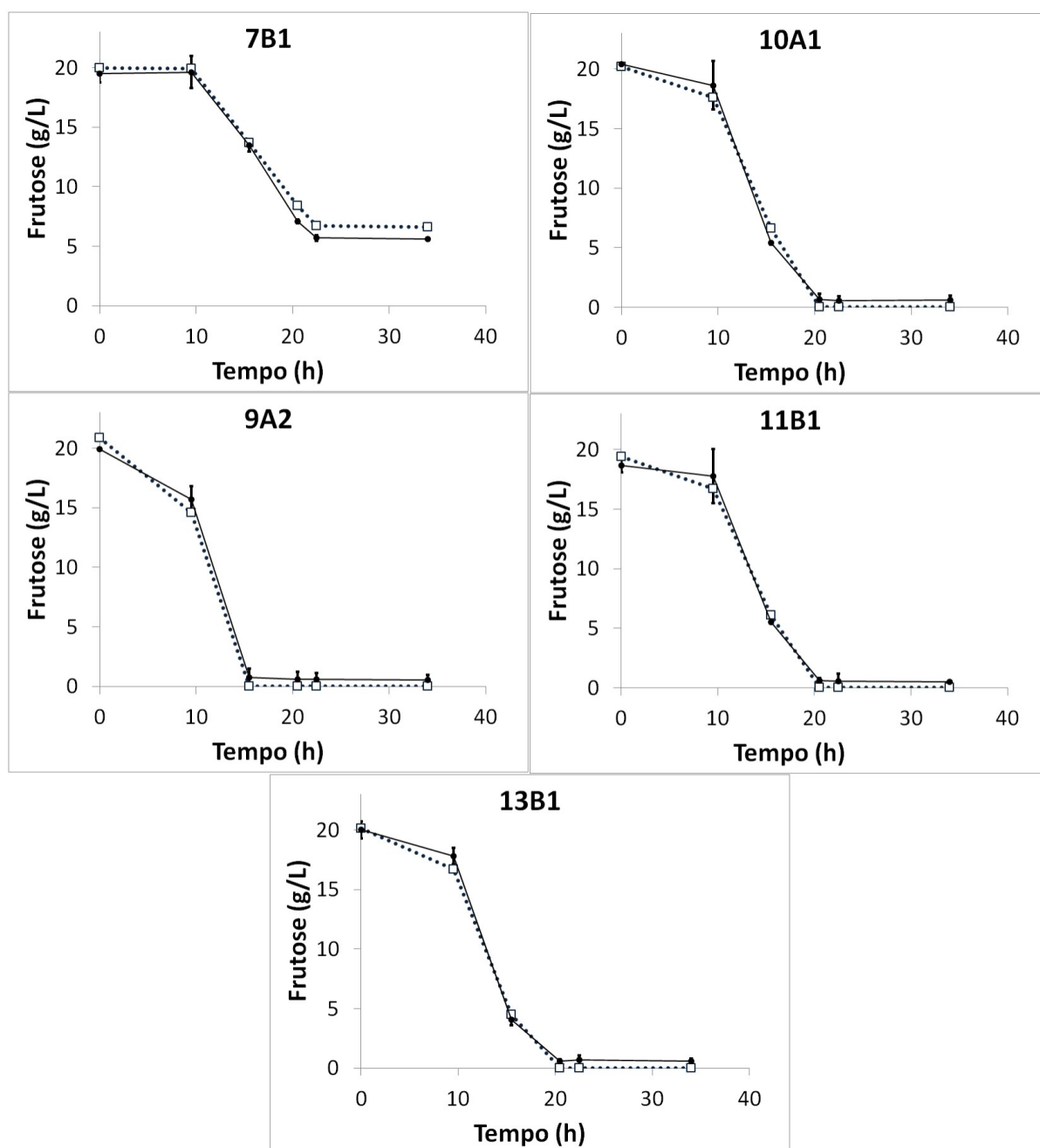


Figura 3. Determinação das concentrações de frutose em amostras coletadas ao longo do crescimento celular de diferentes linhagens de leveduras de vinho colonial, através do método proposto em microplaca (●) e através de HPLC (□). Os códigos das linhagens são apresentados na parte superior central de cada gráfico. As barras de erro correspondem aos desvios padrões das duplicatas feitas em microplaca.

da limitação de volume em cada poço, é processada em uma microplaca e posteriormente transferida a outra, para adição de água e leitura subsequente (DECKER et al., 2003; XIAO et al., 2004, 2005; KING et al., 2009; NAVARRO et al., 2010; RAMADA et al., 2010; WOOD et al., 2012), conforme pode ser visto na Tabela 2. Nesse sentido, este novo método apresenta mais uma economia frente aos demais – metade do número de microplacas por 96 amostras analisadas.

É reconhecida a acurácia das análises por HPLC. Contudo, é sabido também que essas análises têm maior custo que as realizadas por métodos colorimétricos. Uma vez que os resultados obtidos apresentaram valores validados por HPLC, este novo método colorimétrico apresenta-se como uma excelente alternativa para laboratórios que não podem contar com (ou manter) um cromatógrafo a líquido. Ademais, graças à possibilidade

Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca

Santos, A. A. et al.

Tabela 1. Parâmetros de validação parcial para linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, calculados para o método em microplaca, para o método tradicional e para o método por HPLC.

	Sensibilidade		Linearidade		Limite de detecção (g/L)		Limite de quantificação (g/L)	
	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose
Método DNS microplaca	1,3840	1,3361	0,9999	0,9998	0,0390	0,0741	0,1301	0,2470
Método DNS tradicional	0,6232	0,6898	0,9990	0,9996	-	-	-	-
Método HPLC	$2,4105 \times 10^5$	$2,5012 \times 10^5$	0,9999	0,9999	$2,6832 \times 10^{-8}$	$3,1520 \times 10^{-8}$	$8,9414 \times 10^{-8}$	$1,0502 \times 10^{-7}$

Tabela 2. Quantidade de reagente e de microplacas utilizados em diferentes métodos de dosagens de açúcares redutores com DNS em microescala*.

Referência	Quantidade de DNS por poço (µL)	Nº de microplacas**	Tempo de incubação na reação (min)***
Decker et al. (2003)	150	2	10
Xiao et al. (2004)	120	2	5
Xiao et al. (2005)	60	2	5
King et al. (2009)	120	2	5
Gonçalves et al. (2010)	25	1	10
Navarro et al. (2010)	60	2	10
Ramada et al. (2010)	100	2	5
Negulescu et al. (2012)	100	1	4
Wood et al. (2012)	171	2	1
Kim et al. (2014)	160	1	10
Novo método proposto	25	1	5

*Considerou-se como microescala os ensaios realizados em microplacas de 96 poços – nos métodos que utilizam tubos, a dosagem requer quantidade de DNS que varia de 150,0 µL a 4.000,0 µL (SUMNER, 1921; SUMNER; SISLER, 1944; MILLER, 1959; LEUNG; THORPE, 1984; BREUIL; SADDLER, 1985; SCHWALD et al., 1988; HU et al., 2008; SAQIB; WHITNEY, 2011; DÁRIO, 2012; TEIXEIRA et al., 2012); **Para um ensaio com 96 leituras; ***Corresponde ao tempo destinado à redução do ácido 3,5-dinitrosalisílico pelo açúcar, para geração da cor.

de pipetagem com micropipetas multicanais (possibilitando a adição dos reagentes a 8 ou 12 poços da microplaca simultaneamente) e da rápida leitura feita pelos leitores de microplacas (aproximadamente 100 segundos, apresentando imediatamente os valores de absorvância em planilhas do Microsoft® Excel), o tempo de realização do ensaio por meio do novo método o torna ainda mais atrativo.

O método apresentado neste trabalho também pode ser empregado para a determinação de outros açúcares redutores – experimentos realizados com xilose apresentaram a mesma eficiência (dados não apresentados).

4 Conclusão

O método padronizado através do presente trabalho se mostra validado, revelando-se um protocolo rápido, confiável e de baixo custo para a quantificação de açúcares redutores, com diversos propósitos. A economia é percebida também após cada ensaio, haja vista que,

em virtude do pequeno volume de reagente empregado, ele gera pouco resíduo a ser tratado.

Agradecimentos

Este trabalho contou com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processos n. 480054/2011-8 e n. 454215/2014-2). A. A. dos Santos e J. R. Deoti receberam bolsas de Iniciação Científica (PRO-ICT/UFGS) de editais internos da Universidade Federal da Fronteira Sul. Agradecemos também o apoio do Dr. Rafael Trevisan nas análises estatísticas.

Referências

AMARANTE JUNIOR, O. P.; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R.; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de Pesquisas**, São Paulo, v. 12, p. 116-131, 2001.

Dosagem de açúcares redutores com o reagente DNS em microplaca

Santos, A. A. *et al.*

- BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 205-213, 2010. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2010130300027>.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 7, p. 327-332, 1985.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; RIVAS, B.; TORRADO, A. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Fermentation kinetics and chemical characterisation of vino tostado, a traditional sweet wine from Galicia (NW Spain). **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 1, p. 121-131, 2010. PMID:20355022. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3794>.
- CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, n. 2, p. 127-134, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00105-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00105-1).
- DÁRIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- DECKER, S. R.; ADNEY, W. S.; JENNINGS, E.; VINZANT, T. B.; HIMMEL, M. E. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 105-108, p. 689-703, 2003.
- DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 979-991, 2013.
- FERNÁNDEZ-NOVALES, J.; LÓPEZ, M. I.; SÁNCHEZ, M. T.; MORALES, J.; GONZÁLEZ-CABALLERO, V. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. **Food Research International**, Ottawa, v. 42, p. 285-291, 2009.
- GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, London, v. 2, p. 2046-2048, 2010.
- HU, R.; LIN, L.; LIU, T.; OUYANG, P.; HE, B.; LIU, S. Reducing sugar content in hemicellulose hydrolysate by DNS method: a revisit. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, Santa Clarita, v. 2, n. 2, p. 156-161, 2008. <http://dx.doi.org/10.1166/jbmb.2008.306>.
- KIM, J. J.; KWON, Y. K.; KIM, J. H.; HEO, S. J.; LEE, Y.; LEE, S. J.; SHIM, W. B.; JUNG, W. K.; HYUN, J. H.; KWON, K. K.; KANG, D. H.; OH, C. Effective microwell plate-based screening for microbes producing cellulose and xylanase and its application. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 1559-1565, 2014. PMID:25085570. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1405.05052>.
- KING, B. C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 102, n. 4, p. 1033-1044, 2009.
- LEUNG, D. W. M.; THORPE, T. A. Interference by EDTA and calcium ions of the 3,5-dinitrosalicylate reducing sugar assay. **Phytochemistry**, London, v. 23, n. 12, p. 2949-2950, 1984.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 55, p. 712A-724A, 1983.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química orgânica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2011. 1510 p.
- NAVARRO, D.; COUTURIER, M.; DA SILVA, G. G.; BERRIN, J. G.; ROUAU, X.; ASTHER, M.; BIGNON, C. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. **Microbial Cell Factories**, London, v. 9, n. 1, p. 58, 2010. PMID:20637080. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-9-58>.
- NEGRULESCU, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.
- RAMADA, M. H. S.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Optimized microplate β -1,3-*glucanase* assay system for *Trichoderma* spp. screening. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 6-10, 2010. PMID:20096308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.010>.
- SANTOS, R. O.; CADETE, R. M.; BADOTTI, F.; MOURO, A.; WALLHEIM, D. O.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic

Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplacaSantos, A. A. *et al.*

Rain Forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 99, n. 3, p. 635-642, 2011.

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, p. 4748-4750, 2011.

SCHWALD, W.; CHAN, M.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, p. 398-403, 1988.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. A. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Dehli, v. 67, p. 918-926, 2008.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 47, p. 5-9, 1921.

SUMNER, J. B.; SISLER, E. B. A simple method for blood sugar. **Archives of Biochemistry**, New York, v. 4, p. 333-336, 1944.

TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. S. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 363, p. 33-37, 2012.

TRONCHONI, J.; GAMERO, A.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 237-243, 2009. PMID:19632733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004>.

WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; RYDEN, P.; BANCROFT, I.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 44, p. 117-121, 2012.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based caborxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 342, p. 176-178, 2005.