

NOTAS CIENTÍFICAS

Método de determinação de açúcares redutores aplicável no sistema de pagamento de cana-de-açúcar⁽¹⁾

Eliza Mitiko Isejima⁽²⁾, José Augusto Brunoro Costa⁽³⁾
e Daniel Ignácio de Souza Junior⁽⁴⁾

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar um método colorimétrico de análise de açúcares redutores (AR) baseado na sua reação com cloreto de trifênil tetrazólio, de rápida execução, que pudesse ser aplicado nas usinas de cana-de-açúcar. Como a pureza do caldo de cana apresenta alta correlação com AR, desenvolveu-se, neste trabalho, uma equação de regressão linear (AR/RJ) que foi comparada com as de São Paulo (AR/SP) e Paraíba (AR/PB). A equação AR/SP, adotada atualmente no Rio de Janeiro, apresentou inclinação muito acentuada em comparação com as demais; isto indica a necessidade de se criar equação própria para cada região produtora de cana-de-açúcar.

Termos para indexação: tecnologia do açúcar, indústria açucareira, colorimetria, método de análise.

Method for determination of reducing sugar applicable on sugarcane payment system

Abstract – This work aimed to evaluate a colorimetric method of reducing sugar (RS) analysis based on its reaction with triphenyl tetrazolium chloride, which is of fast operation and suitable to be applied in the sugarcane mills. As the purity of sugarcane juice presents high correlation with RS, an equation of linear regression (RS/RJ) was developed, and it was compared to other equations developed in São Paulo (RS/SP) and Paraíba (RS/PB). The RS/SP equation, which is currently adopted in Rio de Janeiro, showed a higher downward slope in comparison to the others, indicating the need to create an equation, which is proper to each sugarcane producing region.

Index terms: sugar technology, sugar industry, colorimetry, analytical methods.

Desde a safra de 1998/99, o sistema de pagamento de cana-de-açúcar no Brasil se baseia no conteúdo de açúcares totais recuperáveis (ATR), que são

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 8 de agosto de 2001.

⁽²⁾ Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Centro de Biociências e Biotecnologia, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28015-620 Horto, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: isejima@uenf.br

⁽³⁾ Centro Federal de Educação Tecnológica, Área de Química, Rua Dr. Siqueira, 273, CEP 28030-130 Parque Dom Bosco, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: jabrunoro@uol.com.br

⁽⁴⁾ UENF, Centro de Ciência e Tecnologia. E-mail: disj@uenf.br

constituídos de sacarose e açúcares redutores, frutose e glicose. Em face das dificuldades para análise direta dos açúcares redutores do caldo (AR), adotou-se, para o Estado de São Paulo, uma equação de correlação linear entre os açúcares redutores e a pureza do caldo, em substituição à determinação direta de AR pelo método titulométrico (Lane & Eynon, 1923). Entretanto, de acordo com Fernandes (1999), não se deve empregar a equação quando se desejam resultados mais precisos, já que a regressão é variável, dependendo das condições de cultivo, clima e variedade. Apesar dessas diferenças, as comissões técnicas dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo decidiram adotar essa mesma equação de regressão, por não disporem de série histórica contendo dados consistentes, para elaborar uma equação própria. E, ao contrário do Estado de São Paulo, não facultaram às unidades industriais a determinação direta dos açúcares redutores pelo método titulométrico (Lane & Eynon, 1923) para efeito de pagamento de cana. No Estado da Paraíba, outra equação de regressão linear foi obtida para as variáveis AR e pureza do caldo (Melo & Lima Neto, 1999).

A determinação dos açúcares redutores pelo método titulométrico (Lane & Eynon, 1923) tem sido preterida pelas comissões técnicas de pagamento de cana, por causa da morosidade da técnica. Mesmo depois de ter sido adaptado por Horii & Gonçalves (1991), o método de análise de AR pelo Redutec não é capaz de atender à demanda das indústrias que recebem um grande número de fornecedores, uma vez que em algumas delas é comum realizarem-se cerca de 500 análises por dia. Outros métodos de análise de açúcares redutores têm sido propostos, como o de Somogyi & Nelson, por Amorim et al. (1979). Melo (1982) propõe um método colorimétrico para determinação de açúcar redutor em presença de sacarose. Neste método, a solução açucarada tratada com cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio desenvolve cor, em virtude de sua reação com os açúcares invertidos. Gabriel (1971) descreve um método para localização de enzimas, produtoras de cetoses e aldoses, em gel após eletroforese, com base também na reação de 2,3,5-trifenil tetrazólio com açúcares redutores.

No presente trabalho, uma adaptação do método de Gabriel (1971) foi desenvolvida para possibilitar análises quantitativas de açúcares redutores, visando sua aplicação na determinação desses compostos em caldo de cana-de-açúcar. Nesse método, que denominamos TTC, sessenta amostras de caldo clarificado podem ser analisadas simultaneamente, por meio de microplacas e uma leitora de microplacas. Depois de tratado com o reagente cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio em meio alcalino, a amostra é aquecida por 3 min a 100°C, e o conteúdo de AR é quantificado espectrofotometricamente. As principais vantagens deste método sobre o tradicional (Lane & Eynon, 1923) são: facilidade, simplicidade e rapidez no preparo do reagente, rapidez na análise e a possibilidade de analisar simultaneamente um grande número de amostras.

O objetivo deste trabalho foi testar o método do TTC, avaliando a sua aplicabilidade nas usinas de açúcar para efeito de pagamento de cana.

Os resultados analíticos de açúcares redutores do caldo obtidos foram correlacionados com os respectivos valores de pureza, obtendo-se uma equa-

ção de regressão linear que foi comparada com as equações originadas em São Paulo e Paraíba.

O ensaio foi conduzido a partir de amostras coletadas no laboratório de pagamento de cana na Usina Santa Cruz, localizada no Município de Campos dos Goytacazes, no Norte Fluminense. Os valores de brix do caldo e pol do caldo clarificado com subacetato de chumbo, usados na determinação da pureza do caldo, foram coletados diretamente dos boletins de análise do laboratório de pagamento de cana. Uma alíquota do caldo clarificado de 103 amostras foi coletada em frasco de 1,5 mL e levada em banho de gelo para o Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, onde foi analisada pelo método colorimétrico (TTC).

Para a determinação do AR pelo método do cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), as amostras dos caldos clarificados foram diluídas 20 vezes, e analisadas em triplicata. Cinquenta microlitros das amostras diluídas foram colocados na microplaca tipo MaxiSorp (Nunc) de 96 poços, seguido por 200 μ L do reagente de TTC (0,05% de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio dissolvido em NaOH 0,5N). A microplaca foi tampada e aquecida em banho-maria a 100°C, por 3 min, para o desenvolvimento da cor. A absorbância foi determinada em leitora de microplacas Dynatech a 550 nm. Soluções de 0,5 mg/mL de frutose e glicose foram misturadas na proporção 1:1 para obtenção da curva-padrão de AR; alta correlação linear ($R^2 = 0,9981$) entre a densidade óptica e a quantidade de AR foi obtida na faixa de 8 a 18 μ g de AR.

Das 103 amostras de caldo, vinte e três foram analisadas no laboratório industrial da Usina pelo método titulométrico (Lane & Eynon, 1923). Os resultados foram comparados com os obtidos pelo método do TTC.

A Figura 1 apresenta a dispersão dos valores de AR determinados pelos métodos TTC e Lane & Eynon (1923), obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2 = 0,80$. Esse valor pode ser considerado satisfatório, tendo em vista que se trata de comparação entre métodos distintos, colorimétrico e

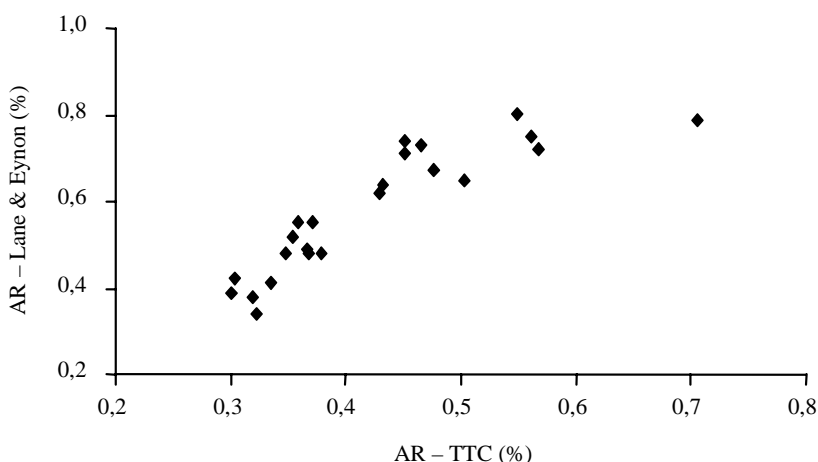


Figura 1. Dispersão entre os açúcares redutores (AR) do caldo de cana-de-açúcar determinados pelos métodos de Lane & Eynon e cloreto de trifênil tetrazólio (TTC), com $R^2 = 0,80$.

titulométrico. Em análises quantitativas de carboidratos, o colorimétrico é usualmente empregado pela praticidade e confiabilidade (McCready et al., 1950; Dubois et al., 1956; Jermyn, 1956; Hodge & Hofreiter, 1962). Por outro lado, a reação de Fehling, que consiste num método titulométrico e no qual se baseia o método de Lane & Eynon (1923) foi originalmente desenvolvida para realizar análises qualitativas, mais do que quantitativas (Nelson & Cox, 2000) e algumas inconveniências do método sob aspecto operacional que geraria alguns erros de determinação foram enumeradas por Zago et al. (1992).

A Figura 2 mostra os valores de AR dos dois métodos plotados em razão dos respectivos valores de pureza do caldo de cana. Os valores de AR obtidos pelos dois métodos variaram de maneira bastante semelhante, em função da pureza do caldo. Nota-se que os valores de AR determinados pelo método de Lane & Eynon (1923) foram superiores aos de TTC, em todas as amostras analisadas. Essa diferença possivelmente deve-se ao fato de o primeiro método ter sido empregado em caldo cru, e o segundo, em caldo clarificado, uma vez que o processo de clarificação causa certa perda de todos os compostos contidos no caldo. O caldo cru, que se oxida rapidamente, interfere no método do TTC, que é colorimétrico. Além disso, como a pol é determinada no caldo clarificado, optou-se por fazer o mesmo para quantificação do açúcar redutor pelo método do TTC.

Houve correlação linear negativa entre o AR, analisado pelos dois métodos, e a pureza do caldo (Pz). Os valores elevados de pureza são característicos da Região Norte Fluminense, apesar de terem sido obtidos no mês de outubro. Com os dados, obteve-se a equação de regressão linear entre os teores de açúcares redutores (AR) e a pureza do caldo (Pz): $AR = 4,5193 - 0,04457 Pz + 0,1325 D$, onde $D = 0$ para TTC e $D = 1$ para Lane & Eynon (1923). A equação permite que o conteúdo de AR, determinado pelo método de TTC,

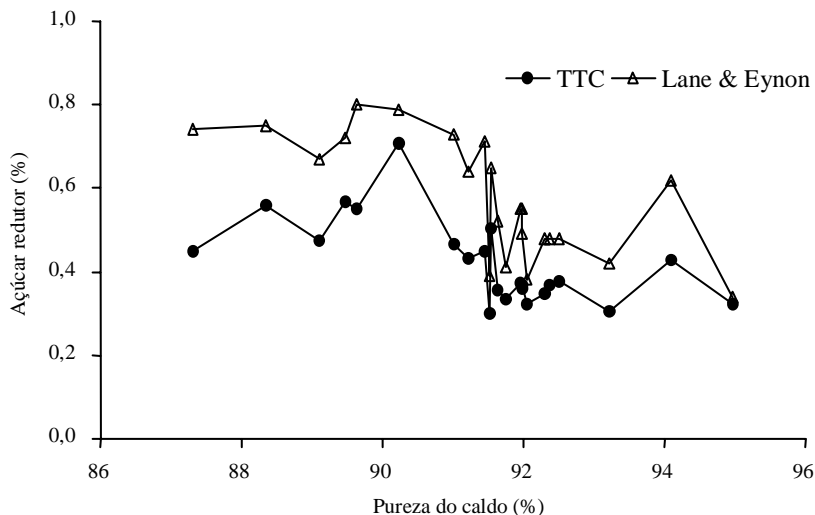


Figura 2. Porcentagem de açúcares redutores do caldo de cana-de-açúcar analisado pelos métodos de cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) e de Lane & Eynon, em razão da pureza do caldo.

seja corrigido para o valor que seria obtido pelo método de Lane & Eynon (1923).

A relação entre a pureza do caldo (Pz) e o açúcar redutor (AR) foi linear nas três localidades: São Paulo ($AR/SP = 9,9408 - 0,1049 Pz$, $R^2 = 0,92$), Paraíba ($AR/PB = 3,4372 - 0,028 Pz$, $R^2 = 0,91$) e Rio de Janeiro ($AR/RJ = 4,5193 - 0,04457 Pz$, $R^2 = 0,47$). O valor do coeficiente de determinação da equação AR/RJ é significativo a 1%. O seu valor inferior aos das equações AR/SP e AR/PB deve-se ao fato de ter sido obtido a partir de dados individuais, enquanto os últimos foram determinados a partir de valores médios.

As equações AR/SP e AR/PB apresentam divergências significativas com relação a valores extremos de pureza do caldo. Ambas foram obtidas a partir de 16 mil pares de dados. Em São Paulo, o trabalho foi conduzido utilizando amostras de cana limpa e recém-cortada durante experimentos de variedades de cana. Na Paraíba, ao contrário, as amostras de cana foram coletadas diretamente dos carregamentos no momento da entrega nas usinas pelos fornecedores.

A equação AR/SP, por apresentar maior inclinação (0,1049) do que a AR/PB (0,028) e a AR/RJ (0,04457), é a que exerce maior influência, quando aplicada para apuração do preço da cana: quando o valor da pureza do caldo for baixo, o valor de AR será o mais alto; por outro lado, quando a pureza do caldo for elevada, o valor de AR será o mais baixo. Ainda por essa equação de AR/SP, verifica-se que quando a pureza atinge o valor 94,76%, o valor de AR se iguala a zero, e, a partir daí, torna-se negativo com o incremento da pureza. Segundo Stupiello (2000), os menores valores de AR do caldo podem chegar a 0,15%, dependendo das condições de cultivo. No ensaio realizado, duas amostras apresentaram valores de pureza superiores a 94,76% e, conseqüentemente, os valores dos açúcares totais recuperáveis, ATR, calculados para essas duas amostras, ficaram decrescidos dos valores negativos de AR da cana (ARC), obtidos de acordo com a expressão: $ATR = 9,26288 PC + 8,8 ARC$ (Consecana, 2000).

Conclui-se que a operacionalidade do método TTC viabiliza o desenvolvimento de equações apropriadas para cada região produtora de cana-de-açúcar.

O método proposto possibilita a determinação direta de AR em pesquisas que envolvam precisão analítica.

A equação AR/SP não é apropriada para ser usada na Região Norte Fluminense.

Agradecimentos

A Gilmar Tavares Azeredo, gerente industrial, Eraldo Miguel Félix Schwartz, químico industrial, e Édio Costa, analista químico da Usina Santa Cruz; a Maxoel Barros Costa, aluno de Biologia da UENF, pelo auxílio técnico nas análises de AR; a Tarcisio Thiebaut, da UENF, pelo auxílio na análise estatística.

Referências

AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; MORAES, M. J. R. Determinação de ART e AR em caldo, mosto, vinho e méis pelo método colorimétrico de Somogyi e Nelson. In: CON-

GRESSO NACIONAL DA STAB, 1., 1979, Maceió. **Anais...** Maceió: STAB, 1979. v. 1, p. 94-97.

CONSECANA (Piracicaba, SP). **Manual de instruções**. 2. ed. Piracicaba: Opinião, 2000. 92 p.

DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

FERNANDES, A. C. Estimativa do teor de açúcares redutores do caldo em função da pureza. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 17, n. 6, p. 34-35, jul./ago. 1999.

GABRIEL, O. Locating enzymes on gels. In: JAKOBY, W. B. (Ed.). **Enzyme purification and related techniques**. New York: Academic, 1971. v. 1, p. 578-604. (Methods in Enzymology, 22).

HODGE, J. E.; HOFREITER, B. T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. v. 1, p. 380-394.

HORII, J.; GONÇALVES, R. H. Um método alternativo para determinação de AR e ART. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, n. 2, p. 45-47, nov./dez. 1991.

JERMYN, M. A. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature**, London, v. 177, p. 38-39, 1956.

LANE, H.; EYNON, L. Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. **Journal of the Society of Chemistry Industry**, London, v. 42, p. 32T-37T, 1923.

McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MELO, F. A. D.; LIMA NETO, J. R. Correlação entre os açúcares redutores livres e a pureza em carregamentos de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: STAB, 1999. p. 207-209.

MELO, R. C. Determinação de açúcar redutor em presença de sacarose. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 26-31, mar. 1982.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carbohydrates and glycobiology. In: _____. **Lehninger principles of biochemistry**. 3. ed. New York: Worth, 2000. p. 293-324.

STUPIELLO, J. P. Relação açúcares redutores/cinzas. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 10, nov./dez. 2000.

ZAGO, E. A.; SILVA, L. F. L. F.; AMORIM, H. V. Novo método de hidrólise e determinação potenciométrica para açúcares redutores e açúcares redutores totais. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, n. 2, p. 40-42, mar./abr. 1992.