

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS MORRINHOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ROSANGELA COELHO QUINTANA

TRABALHO DE CURSO
COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO CROMATOGRÁFICO
E TITULOMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES
REDUTORES TOTAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR

Morrinhos
2016

ROSANGELA COELHO QUINTANA

**COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO CROMATOGRÁFICO E
TITULOMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES
REDUTORES TOTAIS EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Curso apresentado ao Curso Superior em Tecnologia em Alimentos do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, para obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos.

Orientador: Msc. Erlon Alves Ribeiro

Morrinhos, Setembro de 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/IF Goiano Campus Morrinhos

Q7c Quintana, Rosangela Coelho.

Comparação entre o método cromatográfico e titulométrico na determinação de açúcares redutores totais em cana-de-açúcar. / Rosangela Coelho Quintana. – Morrinhos, GO: IF Goiano, 2016.

15 f. : il. color.

Orientador: Me. Erlon Alves Ribeiro.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, Tecnologia em Alimentos, 2016.

1. Cana-de-açúcar – Análise físico-química. 2. Análise de açúcares. 3. Sacarose. I. Ribeiro, Erlon Alves. II. Instituto Federal Goiano. Curso de Tecnologia em Alimentos. III. Título

CDU 633.61

ROSANGELA COELHO QUINTANA

**COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO CROMATOGRAFICO E TITULOMÉTRICO
NA DETERMINAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES TOTAIS EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Aprovada em _____ de _____ de _____, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Erlon Alves Ribeiro
Orientador(a)

Alessandra Cristina Tomé
Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos

Fernanda Salamoni Becker
Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado e guiado meus passos até o fim desta caminhada; Ao meu querido filho que foi penalizado pela falta de tempo, disposição e atenção de sua mãe durante esta caminhada. Ao meu esposo pela compreensão e motivação. A minha mãe pelo eterno amor. A minha sogra por cuidar com muito amor do Paulo Otávio

A todos os professores do curso, que procuraram da melhor maneira contribuir para ampliar meus conhecimentos, especialmente ao meu orientador Erlon Alves Ribeiro, que me orientou com atenção e dedicação incentivando-me.

As minhas queridas amigas em especial Alessandra Tomé, Fernanda Gehre, Grazielly Rodrigues, Ludimila, Ranielly, Stephany Ritucci e Sandra. Aos meus colegas de trabalho de turno que me proporcionaram um ambiente de muita alegria.

A todos que me ajudaram ou não a chegar ao fim desta etapa.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Más e daí? Temos que ter perseverança, e acima de tudo, confiança em nós mesmo.”

Marie Curie

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Cana -de- açúcar	5
2.2 Cromatografia	6
3. MATERIAI E MÉTODOS	7
3.1 Titulação no Redutec Método Lane-Eynon	7
3.2 Cromatografia	8
3.3 Análise Estatística	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	13

1. INTRODUÇÃO

A *Saccharum spp* cana-de-açúcar, foi introduzida no período colonial, e se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, mas também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol (CONAB,2010).

A fotossíntese e produção de carboidratos na cana de açúcar estão ligadas a processos de crescimento e amadurecimento. A fotossíntese tem como função a produção de açúcares com cinco e seis átomos de carbono que se combina com a glicose livre, formando sacarose fosfato. Um receptor de fosfato, que pode ser tiamina ou riboflavina, produz a fosforilação da sacarose (CAMARGO,1976).

No decorrer da maturação, a cana-de-açúcar armazena a sacarose a partir da base para o ápice da planta. No terço basal do colmo apresenta uma quantidade mais elevada de açúcar do que o terço médio, e este maior do que o terço apical. Conforme a maturação progride, o teor de sacarose tende a se igualar nas diversas partes dos colmos, quando o ápice apresenta composição similar ao da base (DEUBBER,1988).

O processo industrial trabalha com a eficiência na de recuperação do açúcar depende da qualidade da matéria-prima entregue na unidade industrial e de análises precisas e rápidas. A cana-de açúcar utilizada em operações finais da produção agrícola mantém suas características físico-químicas inalteradas por pouco tempo, necessitando, portanto ser processada imediatamente após a sua recepção na unidade industrial, para evitar quedas de rendimento (VIANA,2007).

Para se determinar o teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais em alimentos, existem vários métodos químicos não seletivos que fornecem resultados, com elevado grau de confiabilidade, quando utilizados corretamente após eliminação de interferentes. Outros métodos mais seletivos vêm sendo estudados e aplicados em menor escala como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que identifica uma maior variedade de carboidratos na amostra, por ser mais sensível, além de possuir um tempo de análise pequeno (NETO,2003).

Os métodos químicos clássicos conhecidos para a análise de açúcares redutores (ART) são na sua maioria fundamentados na redução de íons cobre em soluções alcalinas (solução de Fehling), mas também existem aqueles fundamentados em outros tipos de técnica.

Este trabalho foi realizado com o propósito de comparar essas análises afim de suprir a necessidade dos laboratórios de análise de alimentos no que se refere a técnicas na determinação de açúcares redutores (A.R.T), utilizando as metodologias de Cromatografia e Titulométricas em amostras de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana -de- açúcar

De acordo com o segundo levantamento da safra 2016/2017 de cana-de-açúcar, o Brasil deverá produzir 684,77 milhões de toneladas do produto. A estimativa foi divulgada em agosto de 2016, pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). (CONAB, 2016).

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 constituídos de sacarose e açúcares redutores, frutose e glicose (ISEJIMA, 2002).

Os carboidratos atuam basicamente como agentes de sabor (doçura) agentes de escurecimento e agentes formadores de goma, influenciando na textura dos alimentos. Os açúcares redutores totais representa a quantidade total de açúcares da cana (sacarose, glicose e frutose). Açúcares redutores correspondem a quantidade de glicose e de frutose presentes na cana, que afetam diretamente a sua pureza, já que refletem em uma menor eficiência na recuperação da sacarose pela fábrica (MAULE,2001).

A determinação dos açúcares redutores pelo método titulométrico (Lane & Eynon, 1923) tem sido utilizada pelas comissões técnicas de pagamento de cana, por causa da demora da técnica. Após ter sido adaptado por Horii; Gonçalves (1991), o método de análise de AR pelo Redutec, este por sua vez não é capaz de atender à demanda das indústrias que recebem um grande número de fornecedores, uma vez que em algumas delas é comum realizada mais 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.

A eficiência do processo industrial de recuperação do ART depende da qualidade da matéria-prima entregue na unidade industrial. Sabe-se que a cana - de açúcar

submetida às operações finais da produção agrícola mantém suas características físico- químicas inalteradas por pouco tempo, necessitando, portanto ser processada imediatamente após a sua recepção na unidade industrial, para evitar quedas de rendimento que podem ser facilmente comprovada através de análises (VIANA, 2008).

Para quantificar o AR e ART em alimentos existem várias metodologias químicas não seletivas que fornecem resultados, com elevado grau de confiabilidade quando utilizado corretamente. Outro método mais seletivo é cromatografia (CLAE), que identifica uma gama maior de carboidratos na amostra (SILVA, 2003).

2.2 Cromatografia

A cromatografia é uma forma de análise muito importante, por ser facilmente adaptável a diversas moléculas e íons, ser rápida, prática e precisa. Do grego *χρῶμα*: *chroma*, cor e *γραφειν*: *grafein*, grafia, envolve uma série de processos físico-químicos de separação de misturas em função de suas características moleculares e se destaca pela facilidade em efetuar não apenas a separação, mas também identificação e quantificação das espécies químicas, sozinha ou combinada com outros métodos de análise. Possui ainda uma faixa de aplicação ilimitada, podendo ser usada para separação de moléculas menores (HARRIS,2005).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu como aprimoramento da cromatografia líquida clássica devido às dificuldades de se separar alguns compostos com esse método, como corantes polares, isômeros, drogas básicas e seus metabólitos. Este método é capaz de separar e analisar quantitativamente vários compostos da amostra em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (NETO,2003).

A CLAE separa e detecta amostras em temperatura ambiente. Por essa razão, agências como United States Food and Drug Administration (FDA) adotaram e recomendaram esse método para análises de compostos não voláteis, de alta polaridade e termicamente estáveis. Sendo, portanto um método mais eficiente e versátil que a Cromatografia a Gás (CALDAS,2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas de caldo de cana-de-açúcar, foram analisadas 80 amostras entre os meses de abril a agosto de 2016, coletadas uma vez ao dia a partir do caldo do digestor tanto para a titulação no Redutec (aparelho de titulometria) como para a cromatografia de íons.

A cana-de-açúcar foi desfibrada em forrageira convencional, depois separou-se 1800Kg e colocada na forrageira África do sul por 5 segundos onde as fibras foram, ainda, mais abertas para facilitar a extração dos açúcares. Após a homogeneização foi pesada 500g e colocada em digestor com 500g de água destilada por 60 minutos.

Após término dos 60 minutos o caldo foi peneirado em peneira comum, depois filtrado em algodão. Foi separado 150mL para a titulação no Redutec e 100mL para o cromatógrafo.

3.1 Titulação no Redutec Método Lane-Eynon

Redutec é um aparelho utilização para titular AR e ART, fabricado pela Tecnal

Aos 150mL do cal do digestor foram adicionados 1g de celite e 0,5g de oxalato homogeneizado e filtrado em filtro de papel, deste filtrado foram retirados 10mL do filtrado e adicionado 10mL de ácido clorídrico a 0,5N colocado no micro-ondas para realizar a hidrólise, posteriormente esfriou em temperatura ambiente e adicionou-se 02 gotas de fenolftaleína, neutralizado com hidróxido de sódio 1N, o volume de 100ml do balão foi completado com água destilada. A amostra foi vertetida em bureta de 50 mL para realizar a titulação. No Redutec, aparelho utilizado para realizar a titulometria. Neste foi colocado 10ml de solução de Felhing AB e água destilada até cobrir a ponta do eletrodo. Decorrido um minuto do início da fervura, procede a titulação até a descoloração total do azul e o disparo do redutec quando a mudança de cor para vermelho tijolo.

Os métodos de redução consistem em pesar ou titular a quantidade de óxido de cobre precipitado de uma solução de cobre por um volume conhecido da solução de

glicídios ou medir o volume da solução de glicídios necessários para reduzir completamente um volume conhecido da solução de cobre.

Método volumétrico de Lane-Eynon, que se baseia na redução completa de um volume conhecido do reagente de cobre alcalino (solução de Fehling) a óxido cuproso pelos açúcares redutores. Além disso, a preparação da amostra é complexa e a análise é realizada em diferentes etapas, aumentando o tempo de avaliação e os riscos de propagação de erros (CESCA, 2009). A adição da sacarose na capitalização também pode gerar problemas analíticos, pois se trata de um açúcar não redutor, necessitando-se de pré-tratamento da amostra com hidrólise ácida (ZOECKLEIN et al., 2001).

3.2 Cromatografia

Dos 100mL do caldo digestor foi retirada uma alíquota de 20mL colocado em balão de 100mL e completado com água destilada, foi retirada uma alíquota na qual foi filtrado e injetada no cromatógrafo de íons da marca Ω Metrohm, modelo 930 Compact IC Flex.

Utilizou-se colunas fechadas que contêm partículas muito finas que proporcionam separações muito eficientes, são utilizadas altas pressões para forçar a passagem do solvente e assim diminuir o tempo da análise (HARRIS, 2005).

Na CLAE emprega-se um coluna fechada, reaproveitável; portanto, até centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, ou seja, ela sofre uma perda de carga. Por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400bars) que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada facilmente, resultando em operações mais reproduzíveis, que tornam as análises executadas por CLAE mais precisas. Vários tipos de detectores, que podem ser colocados na saída da coluna, proporcionam uma identificação e quantificação contínua dos componentes da amostra. A análise quantitativa pela CLAE pode atingir uma precisão superior a + 0.5%. Finalmente, separações em escala preparativa de miligramas de amostras são relativamente fáceis (CALDAS,2015).

3.3 Análise Estatística

Os resultados foram comparados dentro de cada categoria e calculados os erros relativos. Os resultados dos teores de açúcares totais obtidos pelas duas técnicas/métodos (cromatografia e titulometria) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se a amostra como causa de variação, e teste de Tukey em nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), utilizando o ASSISTAT 7.7 beta 20016.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para valores de açúcares redutores, açúcares redutores totais e sacarose, das amostras de cana-de-açúcar, encontram-se na Figura 1. Observa-se que a média dos teores de açúcares redutores nas amostras de cana-de-açúcar, não apresentaram diferenças significativas entre os dois métodos empregados.

Segue figura que mostra a média dos resultados obtidos de cada metodologia.

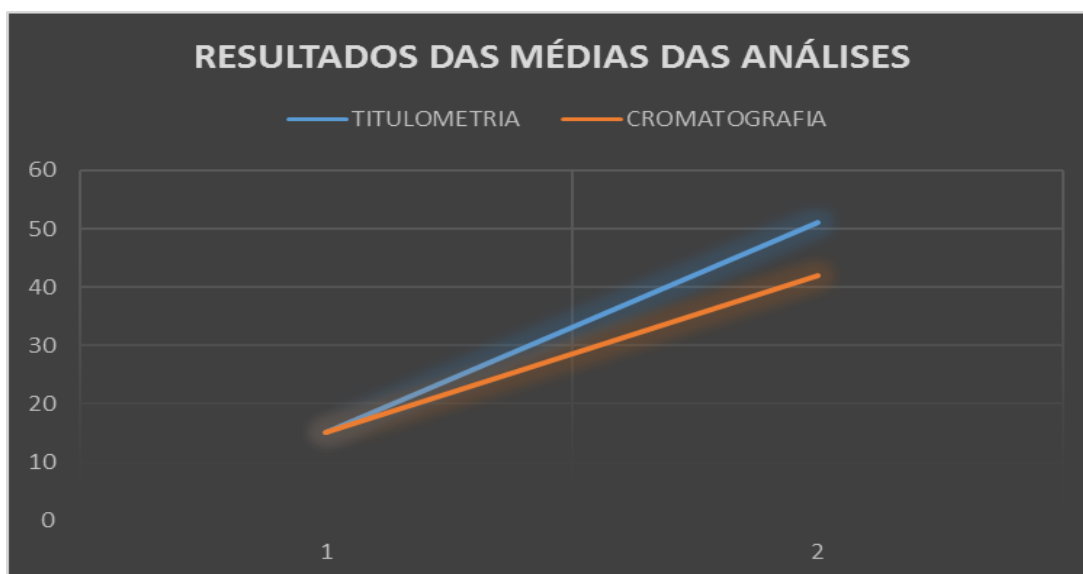


Figura1. Resultado das médias das duas análises

Após a aplicação do Teste de Tukey pode-se comparar qual das duas metodologias era melhor para obtenção de açúcares redutores. Segue os resultados dos testes realizados utilizando-se a ferramenta ASSISTAT 7.7 beta, 2016 como programa estatístico.

TITULOMÉTRIA	15.51 ^a %
CROMATOGRÁFIA	15.42 ^a %

Tabela 1. Médias de tratamentos de titulometria e cromatografia de açúcares redutores.

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade.

Com base no método volumétrico de Lane-Eynon, foi possível determinar o teor de açúcares redutores totais nas amostras e determinar que a titulação e cromatografia são métodos eficientes para determinar açúcares redutores totais.

A vantagem da cromatografia líquida de alta eficiência é que o circuito é fechado, podendo ser utilizada inúmeras vezes. Comparando resultados de cromatografia Caldas et al, (2015) também encontrou resultados seguros e rápidos utilizando o cromatógrafo. As colunas utilizadas são bastante eficientes, mas oferecem resistência à vazão da fase móvel necessitando a aplicação de sistemas de bombas de alta pressão, que fazem com que a velocidade da eluição aumente. As análises são mais precisas, pois a vazão da fase móvel é facilmente controlada. No entanto o custo com relação a cromatografia líquida ainda é maior.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora tenham ocorrido variações nos valores das médias de variação, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de significância. Isso indica que qualquer um dos métodos avaliados podem ser usados na quantificação de açúcares redutores totais em cana-de-açúcar para obtenção de resultados seguros.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de íons é um método de análise muito eficiente no entanto, o preço do equipamento ainda constitui uma barreira para aquisição de muitas instituições e empresas privadas.

A grande vantagem das técnicas cromatográficas está na capacidade de realizar separações e análises quantitativas de um grande número de compostos presentes em vários tipos de amostra, em uma escala de tempo relativamente pequena, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AMAORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; MORAES, M.J.R. Determinação de ART e AR em caldo, mosto, vinho e meis pelo método colorimétrico de Somogy e Nelson In: **CONGRESSO NACIONAL DA STAB**. Maceió: STAB, 1979. v. 1, p.94-97.

CALDAS, B.S.; CONSTANTINO, L.V.; SILVA, C.H.G.A. MADEIRA, T.B.; NIXDORF, S. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica** 2015; 7(1): 53-63.

CESCA, M. Comparação interlaboratorial de análises físico-químicas do vinho. 2009. 38 p. Monografia (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves.

CAMARGO, P. N. Fisiología de la caña de azúcar. México: Comisión Nacional de la Industria Azucareira/ Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar, 1976. 59p.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Balanço agronegócio. **Importações Brasileiras**. 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2010.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Balanço agronegócio. **Importações Brasileiras**. 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 17 de Agosto 2016.

DEUBER, R. Maturação da cana-de-açúcar na região sudeste do Brasil: In: SEMINÁRIO E TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4. Piracicaba, 1988. p. 33- 40.

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

HARRIS, D C. **Análise Química Quantitativa**. V. 6. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005. 876p.

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

ISEJIMA, E.M.; COSTA, J.A.B.; JUNIOR, D.I.S. Método de determinação de açúcares redutores aplicável no sistema de pagamento de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p.729-734, 2002.

LANE,H.;EYNON,L.Determination of reducing sugar by means of Fehling solution with methylene blue as internal indicator. **Journal of the Society of Chemistry Industry**, London, v.42, p. 32T-37T ,1923.

MAULE, R. F.; MAZZA, A. J.; MARTINS JÚNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.2, p.295-301, 2001.

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

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro, RJ, 2003

SILVA,R.N.; PASQUAL, M.; PEREIRA, F.J.; SOARES, J.D.R. **Comparação de método para a determinação de açúcares redutores e totais em mel**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 23, n.3, p.337-341, 2003.

VIANA, R. S.; ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M., RIBEIRO, J.F. **Efeito da aplicação de maturadores químicos na cultura da cana-de-açúcar (Saccharum spp.)**. Maringá, v. 30, n. 1, p. 65-71, 2008.

VIANA, R. S. Aplicação de maturadores químicos no final de safra, associada à eliminação de soqueira em área de reforma do canavial. 2007. 46 f. Dissertação(Trabalho de Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ZOECKLEIN, B. W.; FULSEGANG, K. C.; GUMP, B. H. E.; NURY, F. S. Análisis y producción de vino. **Zaragoza**: Editorial Acribia, 2001.