

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE AÇÚCARES REDUTORES COM ÁCIDO PÍCRICO PARA USO BIOTECNOLÓGICO

RAPID DETERMINATION OF REDUCING SUGARS WITH PICRIC ACID FOR BIOTECHNOLOGICAL USE

Nilson PENHA-SILVA¹; Alessandra Martinele FONSECA²; Ana Graci BRITO²; Marcia Aguiar de SOUZA-PENHA²; Tales Alexandre Aversi FERREIRA²

RESUMO: A glicose, bem como outros açúcares redutores, reage com o ácido pícrico, por oxirredução, produzindo um composto colorido que exibe uma extinção molar máxima em 530 nm. Como a extinção em 530 nm é linearmente dependente da concentração ou massa de glicose, esta reação também pode ser usada para a quantificação de açúcares redutores. Este trabalho descreve a padronização do método do ácido pícrico para quantificação de açúcar redutor a partir de condições padronizadas para o método da ortotoluidina. As condições aqui descritas para o método têm sido correntemente utilizadas em nosso laboratório em estudos sobre osmorregulação de proteínas. Sob as condições utilizadas, a relação entre a absorvância em 530 nm e a massa de glicose foi linear na faixa de 0 a 1200 µg do açúcar, sendo descrita pela equação de regressão $A_{530} = -0,081 + 0,0031 \mu\text{g de glicose}$. A utilização de ácido benzóico a 0,25% como solvente da glicose produziu dados que se ajustaram à linha de regressão dada pela equação $A_{530} = -0,077 + 0,0030 \mu\text{g de glicose}$. A comparação das inclinações das duas curvas indicou que a utilização do ácido benzóico como conservante da glicose não afetou o padrão de dependência de A_{530} com a massa de glicose ($p < 0,0001$). A utilização de frutose como açúcar redutor produziu um padrão semelhante de dependência. A sensibilidade do método do ácido pícrico mostrou-se semelhante ao da ortotoluidina quando a concentração de ácido pícrico é de 1,0%, podendo ser superior se a concentração de ácido pícrico for de 2,0%, embora nesta concentração haja precipitação de picrato.

UNITERMOS: Determinação de açúcares redutores, Ácido pícrico, Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

A quantificação de glicose no sangue têm um importante papel no diagnóstico de distúrbios metabólicos, como o *diabetes mellitus*, bem como no monitoramento da saúde de seus portadores. O primeiro método para determinação de glicose no sangue foi descrito há mais de 100 anos e desde então vários outros métodos têm sido propostos, tanto de natureza enzimática quanto não enzimática (BURRIN; PRICE, 1985). Os métodos enzimáticos são mais específicos para a quantificação de glicose do que os métodos não enzimáticos de dosagem, sendo mais apropriados para os ensaios clínicos. Entretanto, todos os primeiros métodos de dosagem utilizados eram não enzimáticos (ADDIS; SHEVKY, 1918; BENEDICT, 1919; BENEDICT, 1926; DUBOIS et al., 1956; FOLIN, 1926; FOLIN; WU, 1920; NELSON, 1944; SUMNER, 1924).

Os métodos de dosagem por oxirredução, dentre

todos os métodos não enzimáticos, mostraram ter uma validade limitada quando os objetos das análises eram materiais biológicos como sangue e urina, cuja composição complexa compreende várias substâncias com caráter redutor (HILLER; LINDER; VAN SLYKE, 1925; WIENER, 1995). Além disto, alguns componentes daqueles materiais biológicos por vezes também mostravam reatividade orgânica com o reagente utilizado. Esta situação pode ser bem exemplificada pela reação da creatinina com o ácido pícrico, a qual com certeza prejudica a exatidão da dosagem de glicose com este reagente, embora tenha fundamentado o desenvolvimento de um método de dosagem de creatinina na urina (GREENWALD, 1930; GREENWALD; GROSS, 1924). Além disto, os métodos de dosagem de açúcar por oxirredução demandam um laborioso protocolo de desproteinização (ADDIS; SHEVKY, 1918).

Todas estas desvantagens limitaram o uso dos métodos oxirredutimétricos em ensaios clínicos e estimularam o

¹ Professor titular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

² Pesquisadores associados ao Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia.

desenvolvimento de métodos não oxirredutimétricos, como o método da ortotoluidina. A reação colorimétrica com a ortotoluidina tornou-se com certeza o método não enzimático mais largamente utilizado para dosagem de glicose em materiais biológicos (PASSEY *et al.*, 1977).

Entretanto, os métodos oxirredutimétricos, como a reação com o ácido pícrico, são muito simples e baratos para quantificação de açúcares redutores em materiais biológicos menos complexos do que o sangue e a urina. Nosso interesse em dosar açúcares redutores em produtos de hidrólise de celulose e testar a ocorrência de hidrólise inespecífica de sacarose por proteínas, em estudos sobre osmorregulação de proteínas por açúcares, nos levou a padronizar o método do ácido pícrico em condições muito simples e práticas.

Este trabalho testa o efeito da concentração do ácido pícrico na sensibilidade do método para quantificação tanto de glicose quanto de frutose, e também a validade de utilização de ácido benzóico a 0,25% como conservante do açúcar. O ácido benzóico é utilizado como conservante de glicose nos padrões que acompanham os kits de dosagem de glicose pelo método da ortotoluidina.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados apresentavam alto grau de pureza. O ácido pícrico, a glicose e a frutose foram adquiridos da Sigma Chemical Company, e o carbonato de sódio e o ácido benzóico da Quimis. As soluções utilizadas foram preparadas semanalmente em água desionizada. As pesagens foram executadas em balança analítica Sartorius. As medidas de volume foram feitas com um mesmo grupo de pipetas graduadas ou volumétricas previamente padronizadas. As leituras de absorvância foram feitas num espectrofotômetro Zeiss modelo Spekol. Os cálculos, gráficos e análises de regressão linear foram feitos utilizando o programa Origin 6.0 da Microcal.

Em um experimento típico, foram preparadas quatro soluções primárias: A) Na_2CO_3 a 20% p/v em água desionizada; B) ácido pícrico a 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0% em água desionizada; C) ácido benzóico a 0,25% p/v em água desionizada; e D) solução-estoque de glicose ou frutose a 1,2 g/100 mL em água desionizada ou em ácido benzóico a 0,25%. As soluções de uso de glicose ou frutose foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 g/100 mL de água desionizada ou de ácido benzóico a 0,25%.

No protocolo-padrão, foi preparada uma série de tubos de ensaio, em duplicata. O tubo-controle recebia inicialmente 0,1 mL do solvente (água desionizada ou ácido benzóico a 0,25%), enquanto os demais tubos recebiam 0,1 mL de glicose ou frutose a 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 g/100 mL (em água desionizada ou ácido benzóico a 0,25%). Em

seguida cada tubo recebia 1,5 mL de Na_2CO_3 a 20% e, por fim, 1,5 mL de ácido pícrico (a 0,2; 0,5; 1,0 ou 2,0 %). Após mistura, os tubos foram incubados por 30 minutos em banheira em ebulição, cobertos por esferas de vidro. Após a incubação os tubos foram resfriados, antes do registro da A_{530} contra o tubo-controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros métodos usados para dosagem de açúcar no sangue eram métodos não enzimáticos (BENEDICT, 1926; DUBOIS *et al.*, 1956; FOLIN, 1926; FOLIN; WU, 1920; NELSON, 1944; SUMNER, 1924), que não diferenciam a glicose da frutose ou da galactose, também presentes no sangue. Eles logo foram sendo substituídos por métodos enzimáticos, que são específicos para a glicose, pois empregam enzimas como a glicose-oxidase, a glicocinase ou a glicose-desidrogenase (BURRIN; PRICE, 1985; COOPER; MCDANIEL, 1970; SACKS, 1998; YU; LIU; JU, 2003).

Não há dúvida quanto à vantagem dos métodos enzimáticos quando o objetivo é dosar glicose na presença de outras substâncias redutoras. No entanto, quando o propósito é dosar açúcares redutores, os métodos não enzimáticos são muito vantajosos por serem simples e baratos, sendo usados mesmo nos dias atuais com propósitos biotecnológicos (MONTROSS; CROFCHECK, 2004).

A reação de açúcares redutores com o ácido pícrico produz ácido picrâmico, cuja extinção molar máxima em 530 nm é linearmente dependente da massa ou concentração de glicose (ADDIS; SHEVKY, 1918). Na **Figura 1** é apresentada a reta-padrão de glicose dosada pelo método do ácido pícrico a 1% p/v, usando glicose diluída em água e em ácido benzóico a 0,25%, mostrando que a presença de ácido benzóico como conservante da glicose não afeta a reatividade da glicose com o agente cromogênico, ou seja, não interfere na dosagem.

O efeito de concentrações crescentes de ácido pícrico (de 0,2 a 2%) sobre a reta-padrão de glicose está mostrado na **Figura 2**. O aumento da concentração do ácido pícrico até 2% melhora a sensibilidade do método, como pode ser visto pelo aumento da inclinação da reta. Entretanto, em concentrações acima de 1%, o ácido pícrico tende a precipitar no meio da reação.

A **Figura 3** mostra as retas-padrões de glicose e frutose em ácido benzóico a 0,25% após reação com ácido pícrico a 1%. Como pode ser observado, a reatividade do ácido pícrico com ambos os açúcares é idêntica, indicando que o método pode ser utilizado para dosagem desses dois açúcares redutores. Em solução neutra ou fracamente ácida, a forma predominante é o hemiacetal cíclico referido como

piranose. A forma da glicose que contém a carbonila aldeídica livre é altamente instável e está presente em concentrações muito pequenas em solução aquosa. Em pH

alcalino, a glicose forma um derivado 1,2-enediol, que ocorre em equilíbrio com a frutose e a manose, monossacarídeos que também exibem capacidade redutora, como a glicose.

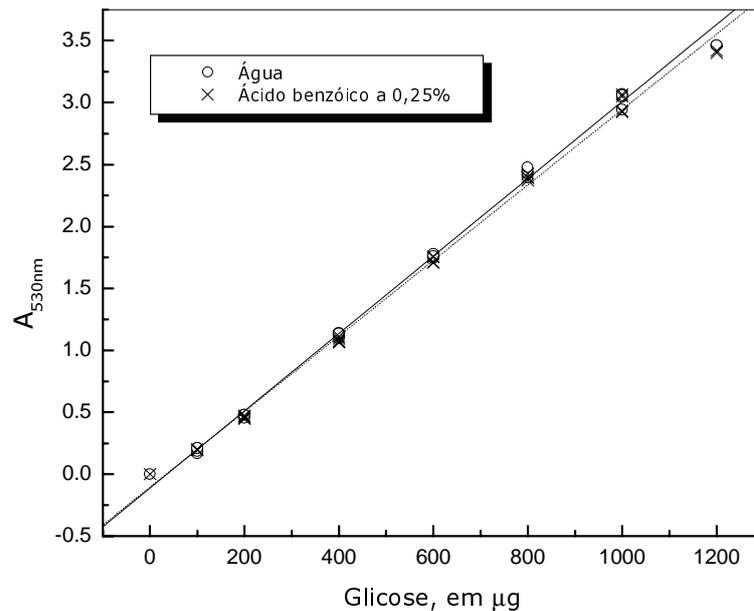


Figura 1. Quantificação de glicose pelo método do ácido pícrico. A linha contínua representa a reta de regressão linear da dosagem de glicose em água (o), dada pela equação $y = -0,113 + 0,00312 x$, com $r^2 = 0,9972$ ($n = 39$; $p < 0,0001$). A linha descontínua representa a reta de regressão para a glicose em ácido benzóico a 0,25% (x), dada pela equação $y = -0,104 + 0,00305 x$, com $r^2 = 0,9966$ ($n = 27$, $p < 0,0001$).

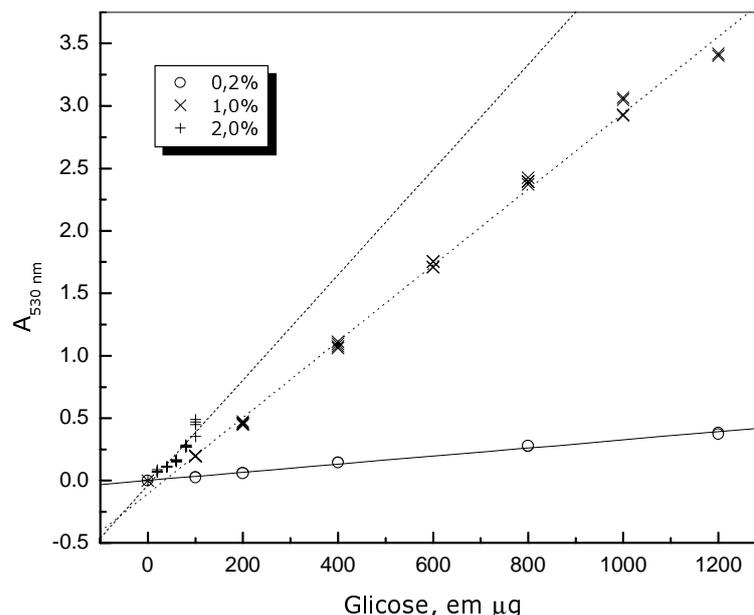


Figura 2. Efeito de concentrações crescentes de ácido pícrico sobre a reta-padrão de glicose em água desionizada. Com ácido pícrico a 0,2%, a equação é $y = 0,00149 + 0,00032 x$ ($r^2 = 0,9932$, $n = 12$, $p < 0,0001$). Com ácido pícrico a 1,0%, a equação é $y = -0,1044 + 0,00305 x$ ($r^2 = 0,9966$, $n = 27$, $p < 0,0001$). Com ácido pícrico a 2,0%, a equação é $y = -0,0366 + 0,00421 x$ ($r^2 = 0,8961$, $n = 22$, $p < 0,0001$).

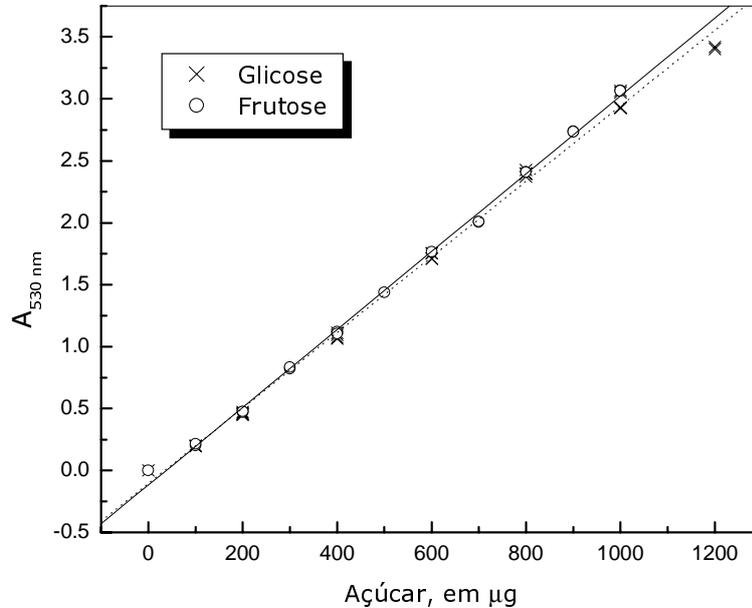


Figura 3. Comparação das retas-padrões de glicose e frutose, com as soluções de ambos os açúcares em ácido benzóico a 0,25% e o ácido pícrico a 1,0% p/v. A linha de regressão para a curva da frutose (o) é dada pela equação $y = -0,118 + 0,00314 x$, com $r^2 = 0,9982$ ($n = 21$, $p < 0,0001$). A reta de regressão para a glicose (x) é $y = -0,104 + 0,00305 x$, com $r^2 = 0,9966$ ($n = 27$; $p < 0,0001$).

A **Figura 4** compara as retas-padrões de glicose em ácido benzóico a 0,25% pelos métodos da ortotoluidina e do ácido pícrico. Elas não apresentam diferenças signifi-

cantes entre si ($p < 0,01$), de acordo com método clássico descrito na literatura (LARK; CRAVEN; BOSWORTH, 1968).

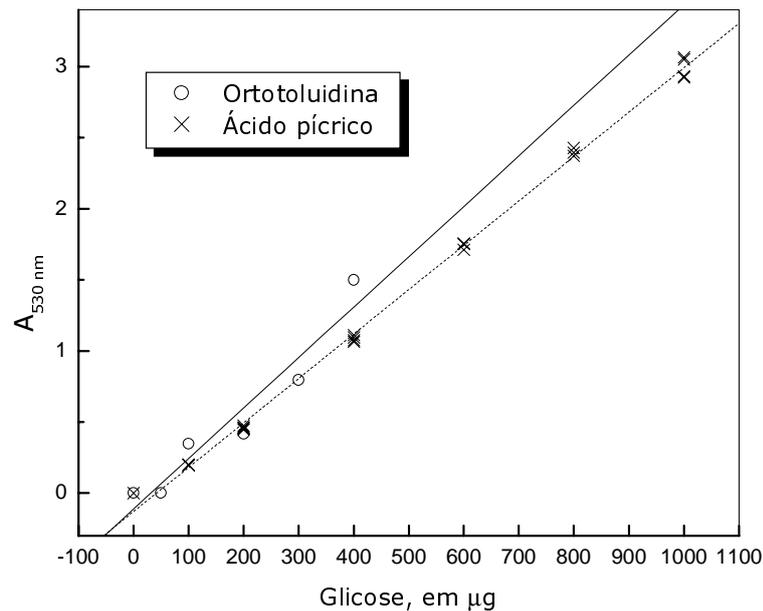


Figura 4. Comparação das retas-padrões de glicose pelos métodos da ortotoluidina e do ácido pícrico, com ácido pícrico a 1,0% p/v. A reta-padrão pela ortotoluidina (o) é dada pela equação $y = -0,110 + 0,00355 x$, com $r^2 = 0,9251$ ($n = 6$, $p = 0,00216$), enquanto a reta-padrão pelo ácido pícrico (x) é dada por $y = -0,0130 + 0,00312 x$, com $r^2 = 0,9980$ ($n = 25$, $p < 0,0001$).

A ortotoluidina é específica para aldoses, com as quais se condensa sob aquecimento na presença de ácido acético (BURRIN; PRICE, 1985; COOPER; MCDANIEL, 1970; SACKS, 1998). Embora esse método exiba extensa linearidade (PASSEY *et al.*, 1977), ele apresenta um inconveniente sério, que é a carcinogenicidade atribuída à ortotoluidina (BURRIN; PRICE, 1985). O ácido pícrico, que reage com qualquer açúcar redutor, não apresenta propriedades carcinogênicas, sendo inclusive usado sob a forma de sais em várias formulações farmacêuticas.

CONCLUSÕES

1) A utilização de ácido benzóico a 0,25% como solvente da glicose não interfere na dosagem de glicose pelo método do ácido pícrico; 2) a utilização de ácido pícrico a 1,0% aumenta a sensibilidade do método; 3) a reta-padrão de glicose não difere significativamente da reta-padrão de frutose por este método; 4) a utilização de ácido pícrico a 1% possibilita a obtenção de uma sensibilidade equivalente a do método da ortotoluidina; 5) a utilização de ácido pícrico a 2% aumenta a sensibilidade deste método em relação ao método da ortotoluidina, embora a reação ocorra com alguma precipitação do reagente.

ABSTRACT: Glucose, as well as other reducing sugars, reacts with picric acid, by oxirredution, producing a colored compound that shows a maximal molar extinction at 530 nm. Since extinction at 530 nm is linearly dependent with the concentration or mass of glucose, that reaction can be used for quantification of reducing sugars. This paper describes the standardization of the picric acid method from conditions described for orthotoluidine method. Conditions here described for the method have been currently used in our laboratory in studies about osmorregulation of proteins. Under the used conditions, the relation between A_{530} and the glucose mass was linear at the range of 0 to 1200 μg of sugar, being described by the equation $A_{530} = -0,081 + 0,0031 \mu\text{g glucose}$. Utilization of benzoic acid at 0,25% w/v as solvent for glucose produced data fitted by the equation $A_{530} = -0,077 + 0,0030 \mu\text{g of glucose}$. Comparison of both lines indicated that utilization of benzoic acid as glucose preservative didn't affect the dependence of A_{530} with glucose mass ($p < 0.01$). Utilization of fructose as reducing sugar produced the same pattern of dependence. The sensibility of the picric acid method showed to be similar to the orthotoluidine one, when picric acid concentration is 1,0%, becoming even superior if picric acid concentration is 2,0%, although the picrate precipitates at this concentration.

Financial support: PROPP-UFU and CNPq.

UNITERMS: Determination of reducing sugars, Picric acid, Biotechnology

REFERÊNCIAS

- ADDIS, T.; SHEVKY, A. E. A modification of the picrate method for blood sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 35, n. 1, p. 53-59, July 1918.
- BENEDICT, S. R. Note on the determination of blood sugar by the modified picric acid method. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 37, n. 4, p. 503-504, Apr. 1919.
- BENEDICT, S. R. The estimation of sugar in blood and normal urine. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 759-767, June 1926.
- BURRIN, J. M.; PRICE, C. P. Measurement of blood glucose. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 22, n. 4, p. 327-342, July 1985.
- COOPER, G. R.; MCDANIEL, V. The determination of glucose by the orthotoluidine method. In: MACDONALD, R. P. (Ed.). **Standard methods of clinical chemistry**. New York: Academic, 1970. v. 6, p. 159-170.
- DUBOIS, M.; 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, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

FOLIN, O. The determination of sugar in blood and in normal urine. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 67, n. 2, p. 357-370, Feb. 1926.

FOLIN, O.; WU, H. A simplified and improved method for determination of sugar. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 41, n. 3, p. 367-374, Mar. 1920.

GREENWALD, I. The chemistry of Jaffe's reaction for creatinine. VI. A compound of picric acid with two molecules of creatinine. Its combinations with acid and alkali. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 86, n. 1, p. 333-343, Mar. 1930.

GREENWALD, I; GROSS, J. The chemistry of Jaffe's reaction for creatinine. A red tautomer of creatinine picrate. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 601-612, Apr. 1924.

HILLER, A.; LINDER, G. C.; VAN SLYKE, D. D. The reducing substances of the blood. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 64, n. 3, p. 625-638, July 1925.

LARK, P. D.; CRAVEN, B. R.; BOSWORTH, R. C. L. **The handling of chemical data**. Oxford: Pergamon, 1968. 379 p.

MONTROSS, M. D.; CROFCHECK, C. L. Effect of stover fraction and storage method on glucose production during enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, New York, v. 92, n. 3, p. 269-274, May 2004.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, n. 2, p. 375-380, May 1944.

PASSEY, R. B.; GILLUM, R. L.; FULLER, J. B.; URRY, F. M.; GILES, M. L. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). **Clinical Chemistry**, Washington, v. 23, n. 1, p. 131-139, Jan. 1977.

SACKS, D. B. Glicídeos. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. (Eds.). **Tietz fundamentos de química clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 341-363.

SUMNER, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 62, n. 2, p. 287-290, Dec. 1924.

WIENER, K. Whole blood glucose: what are we actually measuring? **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 32, n. 1, p. 1-8, Jan. 1995.

YU, J.; LIU, S.; JU, H. Glucose sensor for flow injection analysis of serum glucose based on immobilization of glucose oxidase in titania sol-gel membrane. **Biosensors and Bioelectronics**, Barking, v. 19, n. 4, p. 401-409, Dec. 2003.