ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE CARBOIDRATOS EM PRODUTOS DIETÉTICOS *

LYS MARY CANDIDO **

SUELY HARUMI IOSHII***

AGUINALDO JOSÉ DO NASCIMENTO ****

Investigou-se a validade de métodos convencionais para análise de carboidratos (Fehling, fenol-ácido sulfúrico, Somogyi-Nelson, glucose oxidase e Roe) com base no critério de confiabilidade para diferentes matrizes alimentares. Foram analisadas geléias dietéticas e chocolates de diferentes marcas e sabores, coletados no mercado local pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Paraná (Curitiba, PR, Brasil). Os métodos de fenol-ácido sulfúrico e de Roe não requerem hidrólise prévia das amostras devido à presença de ácido sulfúrico e ácido clorídrico, respectivamente, no meio de reação. Os métodos de Somogyi-Nelson e Roe foram os mais influenciados pela matriz alimentar, resultando em valores menores na determinação do conteúdo de carboidratos em chocolates. Sugere-se o método de fenol-ácido sulfúrico como método oficial para análise de carboidratos em produtos dietéticos devido à sua sensibilidade, precisão, e exatidão. Além disso, não requer hidrólise, não é afetado pela matriz alimentar e é de fácil execução.

1 INTRODUÇÃO

Acompanhando a tendência internacional, o mercado de alimentos dietéticos no Brasil experimentou acentuado crescimento na última década, porém, sem as necessárias medidas legislativas. Estes produtos são consumidos por mais de 30 milhões de pessoas, entre as quais um terço de diabéticos e o restante composto por obesos, hipertensos e consumidores por opção (4,5,7,9,10).

* Trabalho apresentado no VIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Porto Alegre, out/1993.

** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Nutrição.

*** Laboratório Central do Paraná, Divisão de Bromatologia e Química.

**** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica.

Em decorrência desta constatação, e da preocupação com a saúde dos consumidores se faz necessário rever a metodologia aplicável à análise de alimentos dietéticos, especialmente no que se refere a carboidratos, incluindo-se neste grupo os mono, di e polissacarídeos, diferenciando-os de açúcares, que incluem os mono e dissacarídeos (2,5,11,13,20).

Um grande número de métodos físicos e químicos pode ser usado para determinar o conteúdo destes compostos. Os métodos físicos incluem polarimetria, refratometria, densitometria e cromatografia, enquanto que os métodos químicos incluem: (i) métodos baseados no poder redutor de alguns açúcares; (ii) desidratação controlada do açúcar a furfural e posterior reação com fenóis, aminas aromáticas ou hidrocarbonetos heterocíclicos; (iii) clivagem por periodato e análise dos fragmentos (cromatografia gasosa); (iv) métodos enzimáticos (1,2,5,6,8,11-23). O método adotado nos laboratórios oficiais de Saúde Pública, é o de Fehling, e em alguns casos, os carboidratos são calculados por diferença (3).

Considerando a variedade de métodos e as peculiaridades dos alimentos dietéticos, determinou-se o conteúdo de carboidratos de diferentes produtos pelos métodos de Fehling (3), fenol sulfúrico (8), Somogyi-Nelson (19,22,23), glucose oxidase (1,15) e Roe (21). A escolha do método a ser sugerido deve basear-se em critérios de confiabilidade (20), expressos em termos de precisão, exatidão, especificidade, linearidade, sensibilidade, e o alcance em termos de diferentes matrizes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Amostras de geléias dietéticas de diferentes sabores e marcas e chocolates dietéticos de diferentes marcas foram coletados pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Paraná (Curitiba, PR).

2.2 CROMATOGRAFIA EM PAPEL

A fim de verificar a presença de açúcares nas amostras foi realizada cromatografia em papel utilizando-se como solvente 1-butanol : ácido acético : água (60 : 15 : 15) ou 1-butanol : acetona : água (40 : 50 : 10) como solvente, e revelação com nitrato de prata (24).

2.3 ANÁLISE DE AÇÚCARES

Extrato aquoso, hidrolisado ou não, foi clarificado (3), e o conteúdo de açúcares analisado pelos métodos de Fehling (3), Somogyi-Nelson (19,22,23), fenol sulfúrico (8), glucose oxidase (1,15) e Roe (21).

2.4 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO E REPETIBILIDADE

Os ensaios de recuperação foram realizados utilizando-se açúcares simples (0.8 e 1.6 %) e amido (2 %), hidrolisados em diferentes tempos. Com a finalidade de verificar a interferência da matriz, foram adicionados açúcares simples às amostras de geléias (2 e 4 %), e amido (2 %) às amostras de chocolate (4 %). Para os ensaios de repetibilidade foram realizadas 10 (dez) determinações independentes para geléias e 6 (seis) para chocolates.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através do pacote estatístico SAEG. Os métodos estatísticos utilizados foram: análise de variância (modelo inteiramente casualizado e/ou blocos casualizados) seguidos do Teste de Tukey para ordenação das médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AÇÚCARES SIMPLES

O efeito da hidrólise prévia na determinação de açúcares simples através dos métodos de Fehling, Somogyi-Nelson, fenol sulfúrico, glucose oxidase e Roe está ilustrado na Figura 1. Verifica-se que os métodos de fenol sulfúrico e Roe não requerem hidrólise prévia e que não é necessário tempo de hidrólise superior a 30 min para dosagem de açúcares redutores em geléias dietéticas. Após 30 a 60 min de hidrólise foi verificado escurecimento (escurecimento não enzimático) do meio de reação. Este fato poderia explicar o decréscimo da concentração de glucose observado na Figura 1, quando foi utilizado o método enzimático da glucose oxidase. O método de Roe requer temperatura constante de 80 °C com a finalidade de evitar a interferência da glucose e para que se obtenha adequada padronização da intensidade de cor (21).

A Tabela 1 apresenta os resultados de recuperação de carboidratos obtidos comparativamente pelos métodos em estudo, com e sem hidrólise utilizando glucose, frutose e sacarose como padrão. Os resultados indicam que o índice de recuperação de açúcares é próximo de 100% para todos os métodos, nas amostras hidrolisadas.

Em relação à determinação de frutose pelo método de fenol sulfúrico foi necessário usar frutose (em lugar de glucose) como padrão para curva de calibração. No caso da glucose, os valores obtidos foram aproximadamente 50 % menores, comparados com frutose, mantendo-se constante a concentração de fenol. Os coeficientes angulares foram: padrão de glucose, 3.8, e padrão de frutose, 6.9. DUBOIS et al (8), obtiveram diferenças superiores a 20%, porém, com diferentes

concentrações de fenol e para diferentes tipos de açúcares. A determinação da porção de glucose da sacarose pelo método da glucose oxidase requer hidrólise prévia, e os resultados obtidos foram sempre superiores a 100 %, na presença de sacarose e cerca de 98% em presença de glucose.

FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE HIDRÓLISE DE AÇÚCARES SIMPLES EM DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISE

Os dados foram expressos como porcentagem de açúcares determinados pelos métodos de Fehling (■), Somogyi-Nelson (□), fenol sulfúrico (◆), glucose oxidase (◇) e Roe (▲).

A determinação de frutose pelo método de Roe (Tabela 1) forneceu recuperação média de 100%, mas quando a frutose era determinada a partir da sacarose, este valor se elevou para 123%. Estes resultados sugerem que esteja havendo determinação parcial da glucose. Sendo assim, a determinação de frutose por este método não deve ser efetuada em amostras contendo sacarose, o que não é comum em produtos dietéticos.

3.2 GELÉIAS DIETÉTICAS

A Tabela 2 apresenta os resultados de análise de açúcares em geléias, através dos métodos de Fehling, Somogyi-Nelson, fenol sulfúrico, glucose oxidase e Roe.

Através do teste de Tukey (Tabela 3), verificou-se que o método de Somogyi-Nelson forneceu valores mais elevados que os obtidos pelos outros métodos ($p < 0.05$), e que é afetado pela hidrólise. A análise de variância dos dados da Tabela 2,

não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) entre repetições para o método do fenol sulfúrico, ao contrário dos métodos de Fehling e Somogyi-Nelson (dados não mostrados). Estes resultados demonstram que o método de fenol sulfúrico apresenta melhor repetibilidade.

TABELA 1 - RECUPERAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM FUNÇÃO DA HIDRÓLISE E DOS MÉTODOS DE ANÁLISE

AÇÚCAR**	MÉTODOS							
	FEHLING		SOMOGYI-NELSON	FENOL-SULFÚRICO	G. OXIDASE	ROE		
	md.	ampl.	md.	ampl.	md.	ampl.	md.	ampl.
GLUCOSE	87.1	(86 - 90)	88	97.4 (94 - 101)	97.7 (90 - 105)	-		
FRUTOSE	91.3	(89 - 94)	97.5 (97 - 102)	100.2 (87 - 113)	-		100	(92 - 108)
SACAROSE	0		0	97.8 (97 - 99)	0		123*	(120-126)

COM HIDRÓLISE ***

FEHLING		SOMOGYI-NELSON		FENOL-SULFÚRICO		G. OXIDASE		ROE	
AÇÚCAR	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.	md. ampl.
GLUCOSE	94.3 (87 - 109)	87.4 (77 - 106)	95.3 (87 - 108)	94.2 (88 - 109)	-				
FRUTOSE	87.5 (83 - 98)	100.1 (93 - 109)	98.3 (87 - 106)	-	98.5 (95 - 100)				
SACAROSE	96.8 (94 - 100)	97.5 (90 - 100)	99.1 (96 - 102)	112* (102 - 118)	111,2* (102 - 118)				

md. = média; ampl. = amplitude de variação dos dados

* Dados correspondentes às porções de glucose ou frutose da molécula de sacarose.

** Porcentagem de recuperação de açúcares adicionados em concentração final de 0.8 e 1.6%.

*** Média dos valores obtidos após 30, 60 e 90 min de hidrólise.

TABELA 2 - DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES EM GELÉIAS EM FUNÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISE

Geléia	MÉTODOS											
	FEHLING			SOMOGYI-NELSON			FENOL-SULFÚRICO			ROE		
	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)
1	7.03	0.57	8.15	8.72	0.71	8.16	6.92	0.61	8.84	11.36	1.25	11.04
2	8.47	0.33	3.93	10.65	0.69	6.52	8.03	0.47	5.84	13.67	0.31	2.26
3	2.67	0.21	7.79	3.73	0.31	8.21	3.41	0.25	7.23	3.76	0.37	9.88
4	5.71	0.38	6.68	6.93	0.71	10.25	6.62	0.35	5.97	7.81	0.26	3.28
5	1.78	0.11	6.37	2.43	0.24	10.03	2.27	0.22	9.5	2.76	0.3	10.74
6	2.59	0.08	3.11	3.25	0.25	7.64	3.23	0.25	7.64	3.27	0.1	2.96
7	2.46	0.16	6.44	2.98	0.27	9.06	3.09	0.28	9.06	2.89	0.31	10.78

COM HIDRÓLISE *

Geléia	FEHLING			SOMOGYI-NELSON			FENOL-SULFÚRICO		
	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)
1	8.31	0.23	2.8	11.51	0.34	2.95	6.32	0.14	2.3
2	9.85	0.4	4.11	12.04	0.54	4.48	7.59	0.23	3.07
3	2.59	0.17	6.51	3.85	0.17	4.5	3.33	0.11	3.4
4	4.91	0.18	3.75	6.63	0.4	6.12	6.24	0.29	4.59
5	1.8	0.05	2.84	2.8	0.28	10.06	2.31	0.2	8.7
6	2.26	0.21	9.55	3.43	0.28	8.08	2.75	0.27	10.00
7	2.16	0.03	1.28	2.98	0.21	7.15	2.43	0.18	7.57

md. = média; os dados foram expressos em porcentagem de açúcar na geléia.

dp. = desvio padrão.

CV = coeficiente de variação.

* Os dados com hidrólise foram obtidos em 30, 60 e 90 min de incubação.

TABELA 3 - EFEITO DA HIDRÓLISE NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM GELÉIAS - CLASSIFICAÇÃO DAS MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

Métodos	md.	±	dp.	comparações
SOMOGYI-NELSON (sem hidrólise)	6.18	±	0.31	A
SOMOGYI-NELSON (com hidrólise)	5.54	±	0.45	B
FENOL-SULFÚRICO (com hidrólise)	4.55	±	0.18	C
FEHLING (sem hidrólise)	4.43	±	0.21	C
FENOL-SULFÚRICO (sem hidrólise)	4.41	±	0.35	C
FEHLING (com hidrólise)	4.40	±	0.26	C

md. = média. As médias indicadas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

dp. = desvio padrão.

A interferência da matriz alimentar sobre os resultados obtidos pelos diferentes métodos é apresentada na Figura 2. Estes resultados sugerem que os métodos de Roe e Somogyi-Nelson sofrem maior interferência da matriz.

MONTEGOMERY (18), relatou que α - e β - ceto ácidos, aldeídos e cetonas interferem na determinação de carboidratos pelo método do fenol sulfúrico. Uma vez que este método não forneceu valores mais elevados que os outros métodos (Tabela 2), pode-se inferir que estas substâncias não causam interferências na análise de geléias dietéticas de frutas.

Por outro lado, na expedição de um laudo de análise, independente do método empregado, além dos interferentes, deve-se levar em consideração os açúcares das frutas como matéria-prima e em que proporção as frutas são incorporadas na formulação, para se avaliar se as geléias dietéticas não são efetivamente adicionadas de açúcares, conforme preconizado na legislação de Alimentos Dietéticos do Estado do Paraná (5).

FIGURA 2 - INTERFERÊNCIA DA MATRIZ (GELÉIAS DIETÉTICAS) SOBRE OS DIFERENTES MÉTODOS DE DOSAGEM DE AÇÚCARES

FE= Fehling; SN= Somogyi-Nelson; G= glucose oxidase; FS= fenol sulfúrico; FR= Roe.
Com geléia (□); Sem geléia (■).

3.3 CHOCOLATES DIETÉTICOS

A Tabela 4 mostra os resultados da análise de açúcares em chocolates de diferentes marcas pelos métodos em estudo. O teste estatístico de Tukey (Tabela 5), indica que não existe diferença entre os métodos com hidrólise, e à exceção do método de fenol sulfúrico, os outros mostraram diferença quando a amostra foi previamente hidrolisada. Os métodos de fenol sulfúrico, e o de Roe não requerem hidrólise prévia

devido à presença de ácido sulfúrico e ácido clorídrico, respectivamente, no meio de reação.

TABELA 4 - DOSAGEM DE AÇÚCARES EM CHOCOLATE PELOS MÉTODOS EM ESTUDO

MÉTODOS												
FEHLING				SOMOGYI-NELSON			FENOL-SULFÚRICO			ROE		
CHO	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)
1	6.86	0.15	2.17	2.43	0.04	1.46	19.73	0.07	0.36	0.8	0.02	2.67
2	13.5	0	0	11.48	0	0	15.14	0.03	0.19	16.28	0.02	0.13
3	7	0.16	2.22	8.03	0.01	0.18	9.85	0.05	0.5	10.52	0.09	0.87
4	12.05	0	0	9.19	0.01	0.15	18.96	0.09	0.5	0.78	0	0
5	6.43	0	0	5.15	0.04	0.82	11.4	0.15	1.3	0.97	0.01	0.73
6	10.15	0.11	1.11	7.95	0.08	0.98	14.56	0.08	0.53	0.21	0	1.67
7	12.7	0.61	4.79	11.38	0.04	0.31	15.09	0.1	0.66	3.44	0.01	0.41
8	7.63	0.06	0.83	6.7	0.03	0.42	12.3	0.15	1.21	0.23	0	0

COM HIDRÓLISE *

CHO	FEHLING			SOMOGYI-NELSON			FENOL-SULFÚRICO		
	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)	md.	dp.	CV(%)
1	25,48	0,68	2,66	22,22	0,11	0,51	23,1	0,15	0,64
2	21,09	0	0	18,67	1,13	6,06	13,92	0,04	0,3
3	30,68	0	0	16,06	0,04	0,03	27,14	0	0
4	19,6	1,2	6,13	17,52	0,11	0,65	16,55	0,15	0,9
5	12,74	0,34	2,66	11,52	0,01	0,12	13,38	0,17	1,27
6	12,5	0	0	11,19	0	0	13,4	0,1	0,74
7	13,37	0,18	1,38	13,2	0,19	1,45	15,64	0	0
8	10,82	0,62	5,69	8,95	0	0	12,19	0	0

CHO = amostras de chocolates.

md. = média; os dados foram expressos em percentagem de açúcar no chocolate.

dp. = desvio padrão.

CV = coeficiente de variação.

* Os dados de hidrólises foram obtidos em 30, 60 e 90 min de incubação.

TABELA 5 - EFEITO DA HIDRÓLISE NA DOSAGEM DE AÇÚCARES EM CHOCOLATES - CLASSIFICAÇÃO DAS MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

Métodos	md.	±	dp.	Comparações
FEHLING (com hidrólise)	18,28	±	0,38	A
FENOL-SULFÚRICO (com hidrólise)	16,91	±	0,09	A
FENOL-SULFÚRICO (sem hidrólise)	14,90	±	0,09	A

... continua

continuação ...

SOMOGYI-NELSON (com hidrólise)	14.80	±	0.20	A
FEHLING (sem hidrólise)	8.93	±	0.15	B
SOMOGYI-NELSON (sem hidrólise)	7.79	±	0.03	B
ROE (frutose) (sem hidrólise)	4.15	±	0.03	C

md. = média; as médias indicadas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

dp. = desvio padrão.

O método de Somogyi-Nelson proporcionou valores menores na determinação de carboidratos em chocolates (Tabelas 4, 5). Estes resultados estão de acordo com os ensaios de recuperação quando o amido foi adicionado à matriz (Tabela 6). Por outro lado, o método de Somogyi-Nelson forneceu valores mais elevados na presença de geléias (Figura 2).

3.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS

A Figura 3 apresenta gráficos de correlação obtidos com os métodos de Fehling, Somogyi-Nelson, e fenol sulfúrico. Os coeficientes de correlação para estes métodos foram sempre superiores a 0.9. A correlação para o método de Somogyi-Nelson versus o de Fehling (0.99) foi próxima de 1. Quando a correlação foi analisada entre os métodos de Fehling e fenol sulfúrico obteve-se melhores resultados para concentrações de açúcares inferiores a 7 % ($r = 0.96$). Este efeito pode ser explicado pela diferença de sensibilidade entre os dois métodos.

FIGURA 3 - GRÁFICO DE DISPERSÃO PARA DIFERENTES MÉTODOS DE DOSAGEM DE AÇÚCARES EM GELEIAS

Os dados foram expressos em porcentagem de açúcar analisados pelos métodos de Fehling, Somogyi-Nelson, e fenol- sulfúrico.

TABELA 6 - RECUPERAÇÃO DE AMIDO ISOLADAMENTE E EM MISTURA COM CHOCOLATE

	Tempo de Hidrólise (min)	Métodos		
		Fehling	Somogyi-Nelson	Fenol-sulfúrico
AMIDO	0	-	-	100
	60	68	34	90
	120	69	53	91
MISTURA*	0	21	10	102
	60	75	39	97
	120	73	48	101

Os dados foram expressos em porcentagem de açúcar.

* A mistura foi obtida com 5 g de amido e 10 g de chocolates.

4 CONCLUSÃO

A determinação de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico em alimentos dietéticos contendo frutose, deve ser efetuada utilizando-se frutose para a elaboração da curva de calibração, e, para alimentos contendo sacarose, a curva de calibração deverá ser realizada utilizando-se sacarose como padrão.

O método de Somogyi-Nelson apresenta maior correlação com o método de Fehling, porém não é recomendado por ser mais sujeito a interferências do material em análise.

O método de fenol-sulfúrico é mais sensível, preciso, exato e não sofre interferência da matriz. Além disso, não requer hidrólise prévia, é economicamente acessível e de fácil execução. Portanto, recomenda-se seu emprego como método oficial para a análise de carboidratos em alimentos dietéticos.

ABSTRACT

Using conventional methods for carbohydrate analysis (Fehling, phenol-sulphuric acid, Somogyi-Nelson, glucose oxidase, and Roe) it was investigated the validity of these methods based on their criteria of reliability, for different dietetic food matrices. Those analysed were dietetic jellies and chocolates of different brands and tastes, collected at a local market by the "Secretaria de Vigilância Sanitária do Paraná (Curitiba, PR, Brasil)". The phenol-sulphuric acid and the Roe methods do not require a prior hydrolysis treatment of the samples due to the presence of sulphuric and hydrochloric acids in the reaction medium, respectively. The Somogyi-Nelson and Roe methods were more influenced by the jelly matrix, and gave lower carbohydrate contents in chocolates. It was suggested the use of the phenol-sulphuric acid as an official method for carbohydrate analysis of dietetic products due to its sensitivity, precision, accuracy. It does not require a hydrolysis step, is not affected by the food matrix, and is also relatively easy to carry out.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BARTON, R. R. A specific method for quantitative determination of glucose. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 14, n. 2, p. 258-260, Feb. 1966.
- 2 BIRCH, G. G. **Analysis of food carbohydrate**. London : Elsevier, 1985. 311 p.
- 3 BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Departamento Nacional de Produção e Defesa Animal. **Manual de Físico-Química**. Brasília : MARA, 1993. p. 44-45, 52-55. (Minuta).

- 4 BYRNE, Maureen (ed.) South America sees the "lite". **Chilton's Food Engineering International**, Radnor, v. 18, n. 4, p. 107-109, Sept. 1993.
- 5 CÂNDIDO, L.M., CAMPOS, A.M. **Dietéticos : Aditivos e Ingredientes**. São Paulo : Varela, 1995. In press.
- 6 CHURMS, S.C. (ed.). **CRC Handbook of Chromatography - Carbohydrates**. Boca Raton : CRC Press, 1989. p. 175-198.
- 7 COITINHO, D. C. et al. **Condições nutricionais da população brasileira : adultos e idosos**. Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição. Brasília : Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição, 1991. 39 p.
- 8 DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Easton, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.
- 9 FORMULATING light foods. **Chilton's Food Engineering International**, Radnor, v. 18, n. 3, p. 13-14, June 1993.
- 10 GUIA brasileiro de alimentos e bebidas dietéticas. São Paulo : Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos, 1992. 154 p.
- 11 HART, F.L., FISHER, H.J. **Análisis Moderno de los Alimentos**. 2 ed. Zaragoza : Acribia, 1991. 619 p.
- 12 HODGE, J.E., HOFREITER, B.T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 1, p. 380 - 394, 1962.
- 13 HORWITZ, William (ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15.ed. Arlington : AOAC, 1990.
- 14 HOUGH, L.J.; JONAS, J.K.N. Chromatography on paper. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 1, p. 21 - 30, 1962.
- 15 HUGGET, A. St. G., NIXON, N. A. Enzymic determination of blood glucose. **Biochemical Journal**, London, v. 66, n.1, p. 12, 1957.
- 16 KOWKABANY, G.N. Paper chromatography of carbohydrate and related compounds. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 9, p. 304-344, 1954.

- 17 MILLER, L. G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.
- 18 MONTGOMERY, R. Further studies of the phenol-sulfuric acid reagent for carbohydrates. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 48, p. 591 - 593, 1961.
- 19 NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi-Nelson methods for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 375-380, 1944.
- 20 POMERANZ, Yeshajahu; MELOAN, Cliftone. **Food analysis: theory and practice**. 2. ed. New York : Van Nostrand Reinhold, 1987. p. 636 - 690.
- 21 ROE, Joseph H. A colorimetric method for determination of fructose in blood and urine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 107, n. 1, p. 15-22, 1934.
- 22 SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.
- 23 SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 195, p. 19-23, 1952.
- 24 TREVELIAN, W.E., Procter, D.P.; Harrison, J.J. Detection of sugar in paper chromatograms. **Nature**, London, v. 166, p. 444-445, 1950.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Daniel Altino de Jesus por sua cooperação técnica.