

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Jennefer Maiara Queiroz

**DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE GLICOSE EM SOLUÇÕES  
DE REIDRATAÇÃO UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

Santa Maria, RS  
2023

Jennefer Maiara Queiroz

**DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE GLICOSE EM SOLUÇÕES DE  
REIDRATAÇÃO UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao  
Curso de Química Bacharelado, da  
Universidade Federal de Santa Maria,  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de **Bacharel em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Santa Maria, RS  
2023

**Jennefer Maiara Queiroz**

**DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE GLICOSE EM SOLUÇÕES DE  
REIDRATAÇÃO UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao  
Curso de Química Bacharelado, da  
Universidade Federal de Santa Maria,  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de **Bacharel em Química**.

Aprovado em 04 de dezembro de 2023.

---

**Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)**  
**Orientador**

---

**Cristian Kelling Pereira, B.el (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2023

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **curso de Química Bacharelado** e ao **Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais (LAQIA)** que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Edson Irineu Müller** pela orientação, disponibilidade, amizade, pelo exemplo de profissional, apoio, ensinamentos e pela oportunidade de iniciação científica.

Ao **Cristian Kelling Pereira** por aceitar participar da banca examinadora e pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Às colegas de iniciação científica e amigas **Eduarda de Mello** e **Isadora Silva Dornelles** pela amizade, convivência e auxílio prestado na realização deste trabalho.

Às amigas de graduação **Ana Luísa Seeger Machado**, **Denise de Pinho Oliveira**, **Kathiane Baumann Kudrna** e **Renata Vieira** pela parceria, pelo convívio, e auxílio.

Aos colegas e professores do **LAQIA/CEPETRO** pelo convívio e colaboração.

À minha família pelo apoio durante a graduação. Em especial a minha mãe **Eliane** pelo incentivo, carinho e suporte durante toda a minha vida.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE GLICOSE EM SOLUÇÕES DE REIDRATAÇÃO UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS

AUTORA: Jennefer Maiara Queiroz  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Os carboidratos são biomoléculas de grande importância para a vida. Além de serem a principal fonte de produção de energia nas células não fotossintéticas, também possuem funções estruturais e de armazenamento de energia. Soluções de hidratação oral são utilizadas para prevenir a desidratação, repondo água e eletrólitos perdidos após vômito ou diarreia aguda. Essas soluções contêm glicose como ingrediente majoritário. Neste trabalho, foi desenvolvido um método colorimétrico para a determinação de glicose utilizando um dispositivo portátil que possui uma câmera endoscópica para a captura de imagens digitais. O tratamento das imagens foi realizado no aplicativo PhotoMetrix. A análise colorimétrica consistiu na perda da coloração azul do reagente Benedict, que contêm íons cobre (II), ao reagir com açúcares redutores. Para definir as condições experimentais ótimas da distância focal da câmera endoscópica (2 a 20 mm) e da intensidade de luz aplicada por um diodo emissor de luz (30 a 180 lx), foi utilizado um planejamento de experimentos do tipo Doehlert, modelo quadrático para duas variáveis. Foram explorados os modos de calibração multivariada pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e calibração univariada utilizando canais individuais e o vetor resultante RGB. O preparo das amostras consistiu na solubilização, clarificação e diluição. As condições de otimização do método foram de distância focal de 9,68 mm e 30 lx de intensidade de luz. O método de regressão que apresentou o menor valor para o erro médio quadrático de previsão (RMSEP) e o melhor coeficiente de correlação foi utilizando o vetor RGB no modo de calibração univariada, tendo como 0,20 g L<sup>-1</sup> e 0,996, respectivamente. A determinação de glicose em duas amostras, uma solução pronta para beber e um pó para preparo, resultou em concentrações de 17,0 ± 0,6 e 23,3 ± 1,8 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. A exatidão do método foi verificada pela comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com o método de referência de titulação de Lane-Eynon. Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos pelo método proposto e de referência. O limite de quantificação foi de 0,17 g L<sup>-1</sup>. O método desenvolvido apresenta vantagens como o baixo consumo de reagentes comparado ao método de referência, além disso, possui baixo custo, facilidade de operação e rapidez no processamento de dados.

**Palavras-chaves:** Colorimetria por imagem digital. Calibração univariada. Calibração multivariada. Dispositivo portátil. PhotoMetrix.

## ABSTRACT

### COLORIMETRIC DETERMINATION OF GLUCOSE IN REHYDRATION SOLUTIONS USING DIGITAL IMAGES

AUTHOR: Jennefer Maiara Queiroz  
ADVISOR: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Carbohydrates are very important biomolecules for life. As well as being the main source of energy production in non-photosynthetic cells, they also have structural and energy storage functions. Oral rehydration solutions are used to prevent dehydration by replenishing water and electrolytes lost after vomiting or acute diarrhea. These solutions contain glucose as the main ingredient. In this work, a colorimetric method for determining glucose was developed using a portable device that has an endoscopic camera for capturing digital images. The images were processed using the PhotoMetrix application. The colorimetric analysis consisted of the loss of the blue color of the Benedict's reagent, which contains copper (II) ions, when reacting with reducing sugars. To define the optimum experimental conditions for the focal length of the endoscopy camera (2 to 20 mm) and the light intensity applied by a light-emitting diode (30 to 180 lx), a Doehlert-type design of experiments was used, with a quadratic model for two variables. Multivariate calibration using the partial least squares (PLS) method and univariate calibration using individual channels and the resulting RGB vector were explored. Sample preparation consisted of solubilization, clarification and dilution. The method's optimization conditions were a focal length of 9.68 mm and 30 lx of light intensity. The regression method that showed the lowest value for the root mean square error of prediction (RMSEP) and the best correlation coefficient was using the RGB vector in the univariate calibration mode, with  $0.20 \text{ g L}^{-1}$  and 0.996, respectively. The determination of glucose in two samples, a ready-to-drink solution and a powder for preparation, resulted in concentrations of  $17.0 \pm 0.6$  and  $23.3 \pm 1.8 \text{ g L}^{-1}$  respectively. The accuracy of the method was verified by comparing the results obtained by the proposed method with the Lane-Eynon titration reference method. No significant differences were observed between the results obtained by the proposed and the reference method. The limit of quantification was  $0.17 \text{ g L}^{-1}$ . The method developed has advantages such as low reagent consumption compared to the reference method, as well as low cost, ease of operation and fast data processing.

**Keywords:** Digital image colorimetry. Univariate calibration. Multivariate calibration. Portable device. PhotoMetrix.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclização da glicose.....	14
<b>Figura 2</b> - Exemplos de açúcares redutor e não redutor .....	15
<b>Figura 3</b> - Representação tridimensional do modelo de cores RGB.....	20
<b>Figura 4</b> - Sistema miniaturizado para análises colorimétricas utilizando o aplicativo PhotoMetrix .....	22
<b>Figura 5</b> - Dispositivo portátil utilizado para controlar as condições experimentais durante a captura de imagem para a determinação de glicose por análise colorimétrica .....	25
<b>Figura 6</b> - Fluxograma dos procedimentos realizados e parâmetros avaliados.....	30
<b>Figura 7</b> - Avaliação do tempo de reação de oxirredução entre o reagente de Benedict e a glicose. Em minutos. ....	34
<b>Figura 8</b> - Gráfico de probabilidade normal dos coeficientes.....	37
<b>Figura 9</b> - Superfície de resposta gerada pelo planejamento DOE .....	38
<b>Figura 10</b> - Curva de calibração de 0,25 a 5 g L <sup>-1</sup> de glicose .....	39
<b>Figura 11</b> - (A) Valores de RMSECV em função do número de fatores e (B) curva de calibração nas condições experimentais indicadas pelo ponto de mínima intensidade .....	40
<b>Figura 12</b> - (A) Valores de RMSECV em função do número de fatores e (B) curva de calibração nas condições experimentais indicadas pelo ponto de máxima intensidade .....	41
<b>Figura 13</b> - Curva de calibração do vetor R.....	42
<b>Figura 14</b> - Curva de calibração utilizando o vetor RGB no modo de calibração univariada.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Níveis reais e codificados para cada variável afim de obter a melhor condição experimental na aquisição das imagens digitais .....	28
<b>Tabela 2</b> - Ensaios gerados pelo planejamento DOE .....	29
<b>Tabela 3</b> - Determinação de glicose nas amostras por titulometria de Lane Eynon	33
<b>Tabela 4</b> – Respostas dos ensaios do Planejamento DOE originados da captura dos frascos contendo o precipitado de $\text{Cu}_2\text{O}$ .....	35
<b>Tabela 5</b> - Análise de variância do planejamento DOE utilizando o modelo quadrático das capturas de imagem dos frascos contendo o precipitado de $\text{Cu}_2\text{O}$ .	36
<b>Tabela 6</b> – Respostas dos ensaios do Planejamento DOE originados da captura dos frascos contendo apenas o sobrenadante .....	36
<b>Tabela 7</b> - Análise de variância do planejamento DOE utilizando o modelo quadrático das capturas de imagem dos frascos contendo apenas o sobrenadante .....	37
<b>Tabela 8</b> – Resultado das condições de ponto máximo e ponto mínimo através da ferramenta Solver .....	39
<b>Tabela 9</b> - Avaliação da capacidade preditiva utilizando PLS nas condições do ponto mínimo .....	40
<b>Tabela 10</b> - Capacidade preditiva utilizando PLS nas condições do ponto máximo .	41
<b>Tabela 11</b> - Equações de reta e coeficientes de correlação obtidos pelo modo de calibração univariada pelo método de regressão linear simples .....	42
<b>Tabela 12</b> - Capacidade preditiva utilizando o vetor R no modo de calibração univariada.....	43
<b>Tabela 13</b> - Capacidade preditiva utilizando o vetor RGB no modo de calibração univariada.....	43
<b>Tabela 14</b> - Concentração de glicose nas amostras obtidos pelo método proposto utilizando o PhotoMetrix e pelo método de referência de titulação de Lane-Eynon. Resultados em $\text{g L}^{-1}$ .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
CCD	Dispositivos de carga acoplada (do inglês, <i>Charge Coupled Device</i> )
DOE	Doehlert
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, <i>Ethilenediaminetetraacetic acid</i> )
GRG	Gradação Reduzida Generalizada (do inglês, <i>Generalized Reduced Gradation</i> )
HCA	Análise de agrupamento hierárquico (do inglês, <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Cromatography</i> )
HSV	Matiz, saturação e valor (do inglês, <i>Hue, Saturation and Value</i> )
LED	Diodo emissor de luz (do inglês, <i>light-emitting diode</i> )
MCY	Magenta, ciano e amarelo (do inglês, <i>Magenta, Cian and Yellow</i> )
MQ	Média quadrática
nGL	Número de graus de liberdade
PCA	Análise de componentes principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i> )
PLA	Ácido polilático (do inglês, <i>polylactic acid</i> )
PLS	Mínimos quadrados parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares</i> )
RGB	Vermelho, verde e azul (do inglês, <i>Red, Green and Blue</i> )
RMSEC	Erro quadrático médio de calibração (do inglês, <i>Root Mean Square Error of Calibration</i> )
RMSECV	Erro quadrático médio de validação cruzada (do inglês, <i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> )
RMSEP	Erro quadrático médio de predição (do inglês, <i>Root Mean Square Error of Prediction</i> )
SQ	Soma quadrática

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
2.1	AÇÚCARES.....	13
<b>2.1.1</b>	<b>Classificação</b> .....	<b>13</b>
2.1.1.1	Açúcares redutores .....	14
2.1.1.2	Açúcares não-redutores .....	15
2.2	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES. ....	15
<b>2.2.1</b>	<b>Refratometria</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Polarimetria</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Titulometria</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Espectrofotometria</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.5</b>	<b>HPLC</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Reação de Benedict</b> .....	<b>18</b>
2.3	IMAGENS DIGITAIS.....	19
<b>2.3.1</b>	<b>Quimiometria</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Photometrix</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1	REAGENTES.....	24
3.2	AMOSTRAS.....	24
3.3	INSTRUMENTAÇÃO.....	24
3.4	PROCEDIMENTOS.....	26
<b>3.4.1</b>	<b>Preparo de amostra</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Método de referência</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Método colorimétrico</b> .....	<b>27</b>
3.4.3.1	Otimização.....	28
3.4.3.2	Determinação de glicose nas amostras.....	30

3.4.4	<b>Validação</b> .....	30
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	32
4.1	DETERMINAÇÃO DE GLICOSE PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA	33
4.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	33
4.2.1	<b>Avaliação do tempo</b> .....	34
4.2.2	<b>Planejamento Dohler</b> .....	34
4.2.2.1	Captura de imagem com o precipitado.....	34
4.2.2.2	Captura de imagem do sobrenadante .....	36
4.2.3	<b>Definição do método de calibração</b> .....	39
4.2.3.1	Calibração multivariada utilizando PLS .....	39
4.2.3.2	Calibração univariada utilizando canais individuais.....	41
4.2.3.3	Calibração univariada utilizando o vetor RGB .....	43
4.3	DETERMINAÇÃO DE GLICOSE NAS AMOSTRAS.....	44
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

Soluções de reidratação oral podem ser encontradas em farmácias. São recomendadas em casos de vômito ou diarreia aguda, possuindo grande quantidade de glicose e sais a fim de repor eletrólitos.

O controle de qualidade é de fundamental importância em setores industriais para garantir a qualidade do produto e sua durabilidade. Além disso, é imprescindível que o produto de fato apresente os componentes e concentrações descritas na tabela de informação nutricional.

O uso de imagens digitais vem destacando-se na área de alimentos e bebidas (BENEDETTI *et al.*, 2015; TEIXEIRA e SANTOS, 2022; YOU *et al.*, 2023) em virtude das vantagens de simplicidade de análise, baixo custo e possibilidade de portabilidade. O método reconhecido como oficial pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para a determinação de açúcares em bebidas é a titulação de Lane Eynon (BRASIL, 2005), também conhecida por titulação de Fehling. Algumas desvantagens são observadas por esse método, como elevado consumo de reagente, tempo de aquecimento, instabilidade do Reagente de Fehling e ponto final da titulação grosseiro.

Outros métodos analíticos bem estabelecidos também podem ser utilizados para a determinação de glicose, como HPLC, espectrofotometria, entre outros. Esses proporcionam um resultado mais exato, no entanto, são de custo elevado.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método colorimétrico para a determinação de glicose empregando o uso de imagens digitais como alternativa aos métodos convencionais. A captura das imagens foi feita no interior de um dispositivo portátil que permitiu o controle das condições experimentais de distância focal da câmera e intensidade de luz, parâmetros dos quais foi realizado um estudo para verificar qual a condição ótima de análise.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Inicialmente, esta revisão irá abordar aspectos gerais sobre os açúcares. Em seguida, serão apresentados o método oficial e outras técnicas analíticas utilizadas para a determinação de açúcares totais. Por fim, serão introduzidos os fundamentos da análise colorimétrica através de imagens digitais e os métodos quimiométricos utilizados no tratamento de dados.*

## 2.1 AÇÚCARES

Carboidratos, ou comumente chamados de açúcares, são compostos poli-hidroxilados contendo a função aldeído ou cetona, ou substâncias que gere esses compostos ao sofrer hidrólise (SOLOMONS *et al.*, 2018). A estrutura molecular com grupos hidroxilas gera centros quirais que originam diversos estereoisômeros de açúcares. A estereoquímica é de grande importância em processos biológicos envolvendo enzimas que possuem alto grau de especificidade (NELSON e COX, 2019).

Os carboidratos são produzidos no processo de fotossíntese através da conversão de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O utilizando energia solar como fonte de energia, resultando em biomoléculas com fórmula empírica (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> (SOLOMONS *et al.*, 2018).

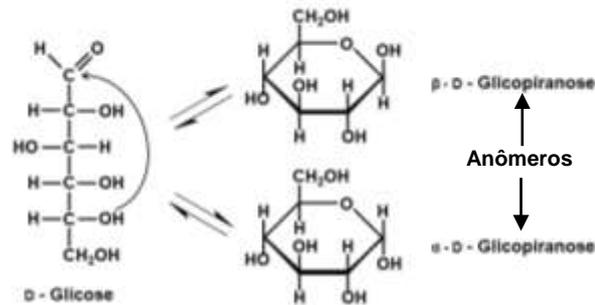
A oxidação dos carboidratos é a principal via de produção de energia na maioria das células não fotossintéticas, processo denominado glicólise. Além disso os carboidratos atuam como fonte de armazenamento de energia e como elementos estruturais em paredes celulares bacterianas e vegetais (NELSON e COX, 2019; VOLLHARDT e SCHORE, 2013).

### 2.1.1 Classificação

Os carboidratos são classificados por tamanho de cadeia, como monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. A palavra “sacarídeo” é derivada do grego *sakcharon*, que significa “açúcar” (NELSON e COX, 2019).

Monossacarídeos ou açúcares simples são as unidades básicas dos carboidratos. Tendem a formar estruturas cíclicas em soluções aquosas quando formados por cinco ou mais carbonos, através da reação intramolecular entre os grupamentos álcool e aldeído ou álcool e cetona, formando hemiacetais ou hemicetais, respectivamente (NELSON e COX, 2019; VOLLHARDT e SCHORE, 2013). Por exemplo, na Figura 1 é ilustrado a ciclização da glicose. O álcool pode ser adicionado à carbonila por duas faces, podendo haver a formação das configurações  $\alpha$  e  $\beta$ . Formas isoméricas de monossacarídeos que diferem apenas na configuração do átomo de carbono hemiacetal ou hemicetal são denominados anomeros e o átomo de carbono é chamado de carbono anomérico (NELSON e COX, 2019).

**Figura 1** - Ciclização da glicose



Fonte: Autoral, 2023.

Oligossacarídeos são cadeias curtas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídica, em que o grupo álcool de um resíduo de açúcar reage com o carbono anomérico de outro, ambos na forma cíclica, resultando em uma função acetal ou cetal. (VOLLHARDT e SCHORE, 2013). Os dissacarídeos são mais comuns, por exemplo, a sacarose é composta por D-glicose e D-frutose (NELSON e COX, 2019; SOLOMONS *et al.*, 2018).

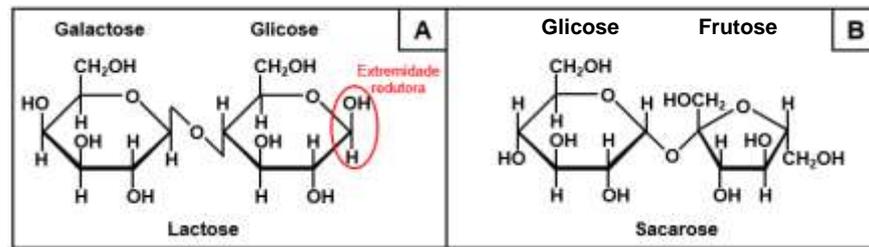
Polissacarídeos são polímeros de açúcares com mais de vinte unidades de monossacarídeos, como por exemplo, o amido e a celulose (NELSON e COX, 2019).

Os açúcares também podem ser classificados de acordo com o grupo funcional. Moléculas poli-hidroxiladas que contêm um grupo aldeído são denominadas aldoses e quando a estrutura possui um grupo cetona são denominadas cetoses (SOLOMONS *et al.*, 2018). Por fim, os açúcares são classificados em redutores e não redutores.

#### 2.1.1.1 Açúcares redutores

Açúcares redutores são aqueles que possuem o carbono anomérico livre, possibilitando a oxidação à um grupo carboxila por espécies oxidantes, como por exemplo, o íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ). A redução ocorre apenas na forma linear, a qual está em equilíbrio com a forma cíclica. Todos os monossacarídeos e demais dissacarídeos que possuem uma extremidade redutora (possuem um carbono anomérico livre) são considerados açúcares redutores, como por exemplo, a lactose (dissacarídeo formado através da ligação glicosídica entre a β-D-galactose e β-D-glicose) possui o carbono anomérico do resíduo de glicose disponível para a oxidação (Figura 2-A) (NELSON e COX, 2019).

**Figura 2** - Exemplos de açúcar redutor (A) e não redutor (B).



Fonte: Autoral, 2023.

### 2.1.1.2 Açúcares não-redutores

Quando a ligação glicosídica envolve o carbono anomérico de ambos os resíduos, o carboidrato é caracterizado como açúcar não-redutor, pois a interconversão entre as formas lineares e cíclicas não é possível. A sacarose, por exemplo, que é um dissacarídeo de glicose e frutose, não apresenta carbono anomérico livre (Figura 2-B). No entanto, as ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas em meio ácido, resultando na liberação dos monossacarídeos (NELSON e COX, 2019).

## 2.2 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

As técnicas analíticas para a determinação quantitativa de carboidratos são diversas, tais como, a polarimetria (HOAREAU *et al.*, 2010; MORGANO *et al.*, 2002), refratometria (CALDAS *et al.*, 2015; SHORE e SARGENT, 1981), titulação (SILVA *et al.*, 2003), espectrofotometria (SILVA *et al.*, 2003; KEJLA *et al.*, 2023; HATANAKA e NOBARA, 1980), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), entre outras.

### 2.2.1 Refratometria

Método físico que consiste na medida da quantidade de sólidos solúveis de uma amostra. O método é indireto, não é seletivo e não pode ser utilizado para a distinção de açúcares. Adequado para medidas rotineiras no controle industrial para a quantificação de açúcar total (SHORE e SARGENT, 1981).

O princípio da técnica é a mudança na direção de um feixe de luz ao trocar o meio. O refratômetro é responsável por medir o desvio, fornecendo o índice de refração. Os resultados são comparados com um padrão e expressos em grau Brix (°Bx) (SIQUEIRA, 2019).

### 2.2.2 Polarimetria

A técnica permite a análise de compostos ópticamente ativos. Um feixe de luz plano-polarizada ao passar através da amostra, resulta na rotação do plano de polarização devido a interação com os compostos quirais (SOLOMONS *et al.*, 2018).

O feixe de luz é constituído por dois campos perpendiculares entre si, campo elétrico e campo magnético. A luz comum tem oscilações do campo elétrico em todos os planos possíveis. Ao passar através de um polarizador, é originada a luz plano-polarizada, que oscila em apenas um plano (SOLOMONS *et al.*, 2018).

O grau de polarização depende do número de moléculas quirais no percurso óptico. A Lei de Biot (Equação 1) pode ser utilizada para determinar a concentração ou atividade óptica de um composto, em que  $[\alpha]_{\lambda}^t$  é a rotação específica de uma substância,  $l$  é o comprimento do tubo,  $c$  é a concentração em  $\text{g mL}^{-1}$  e  $\alpha$  é a rotação observada (SOLOMONS *et al.*, 2018)

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^t \times l \times c \quad (1)$$

Polarímetros automáticos fornecem resultados suficientemente precisos em relação ao instrumento normal e muitas vezes podem operar com soluções mais coloridas, isso pode ser útil na análise de melão. No entanto a técnica apresenta interferências quando estão presentes outras substâncias ópticamente ativas (SHORE e SARGENT, 1981).

### 2.2.3 Titulometria

O método de Lane-Eynon faz o uso do Reagente de Fehling, uma solução alcalina de sulfato de cobre em tampão de tartarato de sódio e potássio. A reação de oxirredução entre o cobre(II) e os açúcares redutores necessita de meio básico e

aquecimento (Equação 2), o tartarato tem a função de complexar o cobre para evitar sua precipitação na forma de hidróxido de cobre(II). Para essa titulação, inicialmente, a capacidade oxidante do reagente é padronizada com uma solução padrão de glicose.



Inicialmente, a solução é azul devido a presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Ao iniciar a titulação, há a formação de precipitado vermelho de  $\text{Cu}_2\text{O}$  e perda da coloração azul da solução. Próximo ao ponto final é adicionado o indicador azul de metileno para facilitar a visualização da mudança de coloração, qualquer excesso de açúcar reduz o indicador, tornando-o incolor. O ponto final da titulação é indicado pela mudança de coloração brusca para vermelho tijolo intenso. (LANE e EYNON, 1923).

O método requer prática do analista, pois o ponto final da titulação é grosseiro. Além disso, a titulação deve ser realizada em ebulição para evitar que o  $\text{Cu(I)}$  do óxido cuproso seja oxidado pelo oxigênio presente no ar e forme  $\text{Cu(II)}$  (SCHLESNER *et al.*, 2022). A titulação deve ser realizada em três minutos no máximo, para evitar a decomposição do açúcar, devido ao aquecimento prolongado. Além disso, o reagente de Fehling é instável, decompondo-se com o tempo. O método é amplamente utilizado e reconhecido como método oficial para a determinação de açúcares em bebidas (BRASIL, 2005; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Outros métodos titulométricos indiretos podem ser utilizados para a determinação de açúcares redutores, como o método Luff Schoolr e método complexométrico com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, do inglês, *Ethilenediaminetetraacetic acid*) (SILVA *et al.*, 2003).

#### 2.2.4 Espectrofotometria

Entre os métodos espectrofotométricos incluem-se o método ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), Antrona, Fenol-Sulfúrico e Somogyi-Nelson.

O ADNS é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico por açúcares redutores. A equivalência entre o ADNS e a quantidade de açúcar não é exata e diferentes açúcares produzem diferentes intensidade na cor. A quantificação é feita monitorando o comprimento de onda de 540 nm (SILVA *et al.*, 2003).

O método de Antrona baseia-se na desidratação dos carboidratos pela ação do ácido sulfúrico, produzindo furfural ou hidroximetilfurfural. Essas substâncias reagem com a antrona resultando em um produto de coloração azul, que é quantificado em 620 nm (KEJLA *et al.*, 2023).

Semelhante ao método de Antrona, o método Fenol-Sulfúrico envolve a desidratação do açúcar. Neste caso a antrona é substituída por fenol, esse irá reagir com os produtos da desidratação produzindo um composto de coloração amarela, que absorve em 490 nm (SILVA *et al.*, 2003; KEJLA *et al.*, 2023).

Por fim, a metodologia de Somogyi-Nelson baseia-se na transformação dos açúcares em enedióis em meio alcalino, reduzindo o íon cúprico a cuproso. O Cu(II) é oxidado pela adição de arsênio-molibdídico, formando óxido molibidênico de coloração azul. A quantificação é feita em 510 nm (SILVA *et al.*, 2003; HATANAKA e NOBARA, 1980).

### **2.2.5 HPLC**

Diferentemente dos outros métodos citados, a cromatografia é uma técnica mais seletiva, permitindo a separação, identificação e quantificação individual dos carboidratos presentes na amostra. A aplicação é ampla, podendo ser utilizados detectores de índice de refração (CALDAS *et al.* 2003; DUARTE *et al.*, 2015), espectrometria de massas (PISMENNÕI *et al.*, 2021), amperométrico (SÁ *et al.*, 2020), entre outros. A desvantagem da HPLC é a metodologia mais complexa e o custo elevado.

### **2.2.6 Reação de Benedict**

O Reagente de Benedict é uma variação do Reagente de Fehling. O princípio da técnica é semelhante, envolvendo a redução de íons cúprico por açúcares redutores (HERNÁNDEZ-LOPES *et al.*, 2020). Mas neste caso, o sulfato de cobre é adicionado à uma solução de carbonato de sódio e citrato de sódio em substituição a solução alcalina de tartarato de sódio e potássio. O Reagente de Benedict tem mais estabilidade comparado ao Reagente de Fehling quando submetido à aquecimento e exposto a luz (BENEDICT, 1908).

Anteriormente, o teste era utilizado para a determinação semiquantitativa de açúcares. O reagente apresenta variações na coloração de acordo com a concentração de açúcares redutores. Variando de azul intenso, passando para tons de verde, amarelo e por fim, vermelho. A descoloração do reagente é proporcional a quantidade de açúcar redutor presente na amostra, ou seja, a concentração remanescente de Cu(II) é inversamente proporcional a concentração de açúcar, podendo ser quantificado por colorimetria (TEIXEIRA e SANTOS, 2022).

### 2.3 IMAGENS DIGITAIS

Com o avanço da tecnologia, o uso de imagens digitais vem se destacando como método alternativo em análises químicas. A metodologia se baseia em duas etapas, a aquisição da imagem e a digitalização (MARQUES e NETO, 1999).

A aquisição das imagens requer o uso de dispositivos eletrônicos, como câmeras fotográficas, *scanners*, *smartphones*, dentre outros, para realizar a conversão da imagem real tridimensional em uma imagem analógica. A conversão da energia luminosa em sinal elétrico é feita, geralmente, por dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês, *charge coupled device*) (MARQUES e NETO, 1999; SOLOMON e BRECKON, 2011).

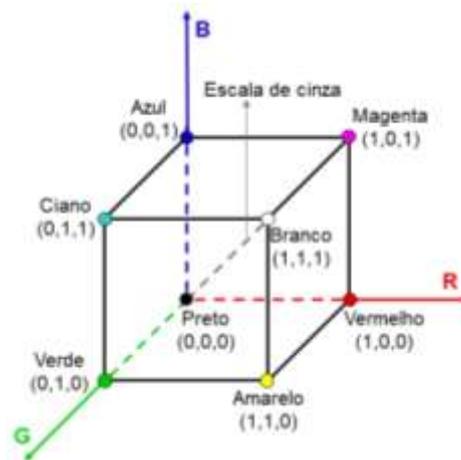
A digitalização é o processamento da imagem analógica, resultando em valores numéricos que representam os *pixels*. Pixel é a menor componente de uma imagem digital e cada pixel possui apenas um valor numérico, associado a intensidade de cor naquele ponto em relação ao modelo colorimétrico utilizado. Quanto maior a quantidade de pixels, melhor a resolução da imagem digital. No entanto, os elevados números de pixels implicam em maior custo de digitalização e armazenamento (MARQUES e NETO, 1999; SOLOMON e BRECKON, 2011).

No modelo de cores RGB (do inglês *Red, Green and Blue*) são utilizados três canais principais para a geração de uma cor. As cores de RGB são denominadas cores primárias, pois a partir da combinação das cores vermelha, verde e azul podem ser obtidas outras cores (MARQUES e NETO, 1999; SOLOMON e BRECKON, 2011).

O espaço de cores RGB pode ser representado geometricamente na forma de um cubo 3D com eixos R, G e B (Figura 3). Cada eixo tem o intervalo de 0 a 1. A cor preta indica a ausência total das três cores, ocupando a posição (0,0,0). A cor branca é originada da quantidade máxima das cores primárias, ocupando o canto oposto

(1,1,1). Todas as cores do espectro visível encontram-se dentro do cubo. Assim, cada cor é representada por um vetor com valores de R, G e B (MARQUES e NETO, 1999; SOLOMON e BRECKON, 2011).

**Figura 3** - Representação tridimensional do modelo de cores RGB



Fonte: Autoral, 2023

O modelo de cores RGB é o mais utilizado. Entretanto, a partir desse modelo podem ser gerados outros, como o MCY (do inglês, *Magenta, Cyan and Yellow*) presentes nos outros três vértices da Figura 3. O modelo HSV (do inglês, *Hue, Saturation and Value*) é representado pelas componentes matiz, saturação e valor. A matiz pode ser interpretada como a cor predominante, a saturação é o grau de pureza da cor no sentido da quantidade de luz branca misturada e o valor é o brilho da cor (MARQUES e NETO, 1999; SOLOMON e BRECKON, 2011).

O uso de imagens digitais vem sendo utilizado como respostas analíticas em análises colorimétricas. Isso é possível em casos que há o aparecimento ou desaparecimento de cor devido uma reação química como, precipitação, complexação, oxirredução, entre outras. A análise colorimétrica por imagem digital é relatada com diversas matrizes, como a determinação elementar em água (BAUMANN *et al.*, 2019; MASAWAT *et al.*, 2017; PAPPIS *et al.*, 2019), adulterantes em leite (COSTA *et al.*, 2021), ácido úrico em saliva (SOARES e ROCHA, 2021), entre outros. Esses estudos apresentam métodos miniaturizados e de baixo custo, alternativos aos métodos analíticos convencionais. Nesses casos, após a captura das imagens, é necessário o uso de técnicas quimiométricas para o tratamento de dados obtidos das imagens digitais.

### 2.3.1 Quimiometria

A quimiometria pode ser descrita como a interação de métodos matemáticos e estatísticos em análises químicas. Podendo ser utilizada em técnicas de otimização, calibração multivariada, análise exploratória, entre outras (KUMAR *et al.*, 2014).

O objetivo da análise multivariada é encontrar relações entre as amostras e as variáveis de um determinado conjunto, convertendo-as em novas variáveis. As técnicas mais utilizadas em análise multivariada são: a análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), a análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) (KUMAR *et al.*, 2014).

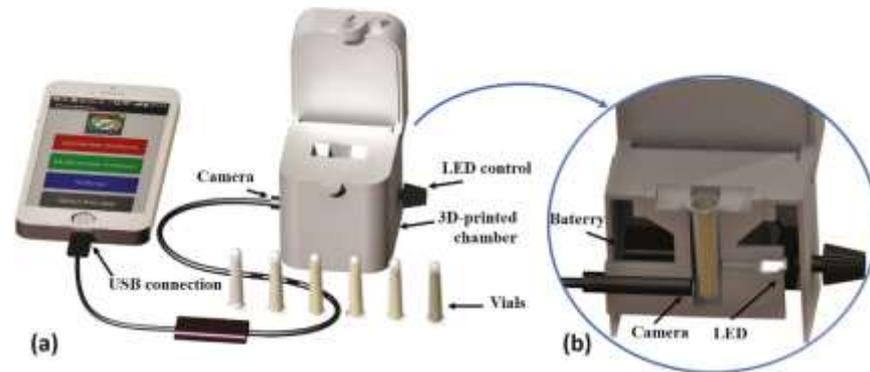
### 2.3.2 Photometrix

Software desenvolvido por Helfer *et al.* (2017) capaz de capturar as imagens e tratar os dados em um único aplicativo empregando modelos matemáticos. O aplicativo está disponível gratuitamente em duas versões para sistemas operacionais Android e Windows-phone. A versão PRO é indicada para capturas utilizando a câmera do próprio dispositivo e a versão UVC possibilita a conexão de uma câmera USB.

As ferramentas quimiométricas do aplicativo incluem a análise univariada utilizando técnicas de correlação linear simples através de canais individuais ou pelo vetor RGB resultante, bem como a análise multivariada com os algoritmos de HCA, PCA e PLS.

A reprodutibilidade do método pode ser prejudicada pelas diferenças de modelos de *smartphones* e da alteração de condições ambientais como, distância da câmera e a iluminação. Em vista disso, Costa *et al.* (2021) desenvolveram um dispositivo portátil (Figura 4) impresso em impressora 3D que permite o controle das condições ambientais.

**Figura 4** - Sistema miniaturizado para análises colorimétricas utilizando o aplicativo PhotoMetrix



Fonte: Costa *et al.*, 2021.

Neste aparelho, foi colocado um diodo emissor de luz (LED, do inglês, *light emitting diode*) conectado a um modulador de energia para que fosse possível controlar a iluminação. Para a captura das imagens, uma câmera endoscópica foi inserida na lateral do dispositivo e conectada a um *smartphone*. Na parte superior há uma cavidade para a introdução de frascos de polipropileno transparente contendo as amostras. Para a avaliação do dispositivo proposto, Costa *et al.* avaliaram quatro adulterantes em amostras de leite cru: cloreto, peróxido de hidrogênio, hipoclorito e amido. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi superior a 0,99 para todos os modelos e não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores medidos e previstos.

Diversos trabalhos têm sido relatados com o uso do PhotoMetrix, desde a análise elementar até molecular, como a determinação de cloreto em petróleo (HOLKEM *et al.*, 2021), monitoramento de flúor em sistemas de abastecimento de água (BAUMANN *et al.*, 2018), determinação de ferro em comprimidos de vitaminas (HELPER *et al.*, 2017), determinação de fosfatos em fertilizantes (SOUZA *et al.*, 2019), entre outros.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

*Neste capítulo são informados os reagentes, as amostras e os instrumentos utilizados. Estão descritas as metodologias adotadas para a avaliação dos parâmetros de otimização do método colorimétrico, os procedimentos experimentais de preparo das amostras e a determinação de glicose utilizando o método de referência e o método proposto.*

### 3.1 REAGENTES

A água utilizada para os experimentos era de elevada pureza com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm. A purificação da água é realizada inicialmente por destilação, seguido de deionização em coluna de troca iônica e, por fim, passagem pelo sistema de Milli-Q (Millipore, EUA).

Para a clarificação das amostras foi utilizado acetato de chumbo P.A. (Reagen, Brasil) e sulfato de sódio anidro (Synth, Brasil). O Reagente de Benedict foi preparado com sulfato de cobre (ACS Científica, Brasil), citrato de sódio (Synth, Brasil) e carbonato de sódio anidro (Proquímios, Brasil). Para o Reagente de Fehling utilizou-se sulfato de cobre (ACS Científica, Brasil), hidróxido de sódio (Neon, Brasil) e tartarato de sódio (Merck, Brasil). O azul de metileno (ACS, Brasil) (2%) foi utilizado como indicador para a melhor detecção do ponto final na titulação pelo método Eynon-Lane. O preparo da curva de calibração foi feito partindo de dextrose anidra P.A. (Dinâmica, Brasil).

### 3.2 AMOSTRAS

Em uma farmácia local foram adquiridas duas amostras indicadas para a prevenção da desidratação ou manutenção da hidratação após a fase de desidratação. Para avaliar a diversidade da amostra, foi adquirido uma solução hidroeletrólítica pronta para beber sabor guaraná e um pó para preparo de solução eletrólítica sabor natural.

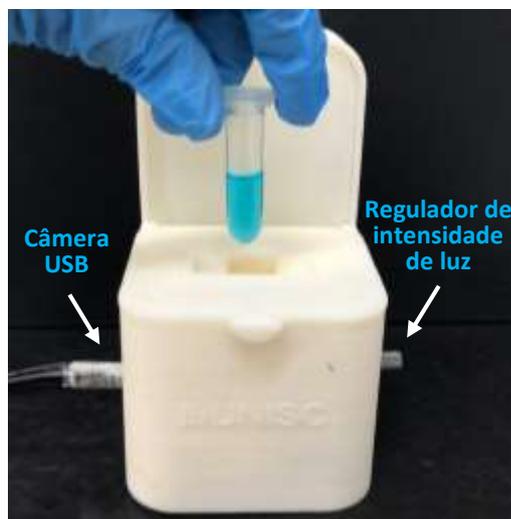
### 3.3 INSTRUMENTAÇÃO

Para a análise colorimétrica foi utilizado um dispositivo portátil proposto por Costa *et al.* O aparelho foi projetado utilizando um software de desenho 3D (SolidWorks® Premium 2008, EUA) e os componentes foram impressos por deposição fundida em ácido polilático (PLA, do inglês, *polylactic acid*) utilizando uma impressora 3D (modelo Core A3 V2, GTMaX 3D, Brasil). O dispositivo permite o controle de condições ambientais, pois a iluminação é originada pelo LED de 6 W conectado a um modulador de energia. Para a captura das imagens digitais, em um canal lateral, foi colocado uma câmera USB (modelo endoscópio inteligente, B-Max,

China, 7 mm, resolução 640 × 480 pixels) conectada a um notebook (modelo Aspire A515-51 series, Acer, Brasil, Intel Core i3-8130U). Na parte superior do aparelho portátil há uma cavidade para a introdução de frascos de polipropileno transparentes do tipo Eppendorf com fundo redondo e capacidade de 2 mL (Cralplast, Brasil).

Na Figura 5 é possível observar a cavidade na qual é inserido os frascos de polipropileno de 2 mL. Nas laterais estão acoplados a câmera USB e o regulador de intensidade de luz.

**Figura 5** - Dispositivo portátil utilizado para controlar as condições experimentais durante a captura de imagem para a determinação de glicose por análise colorimétrica



Fonte: Autoral, 2023.

O emulador BlueStacks App Player (Bluestacks System Incorporated, EUA) foi instalado no notebook para que fosse possível instalar o aplicativo PhotoMetrix PRO disponível gratuitamente na *Google Play Store* (Android).

Para o preparo da curva de calibração e das amostras foi utilizado banho termostático (BM-102-ER, Pemem, São Paulo) e centrifuga (Sigma 3K30, Alemanha). A glicose foi seca em estufa para secagem e esterilização (MA 033, Marconi, São Paulo).

O método titulométrico Lane-Eynon foi realizado com uma bureta de 25 mL e a solução contida no erlenmeyer foi aquecida utilizando uma chapa de aquecimento (modelo ARE, VELP Scientifica, Itália).

## 3.4 PROCEDIMENTOS

### 3.4.1 Preparo de amostra

A amostra líquida foi definida como amostra 1 e a amostra em pó para preparo como amostra 2. A amostra 1 apresentava coloração característica do sabor guaraná, portanto foi necessário realizar a clarificação para posterior análises. O clean up baseia-se na adição de solução neutra de acetato de chumbo 20% sobre a amostra, até completar a descoloração. Cabe salientar que para a titulação foi utilizado um volume maior de amostra e conseqüentemente mais agente clarificante foi necessário. Em seguida, o precipitado branco formado é removido por filtração utilizando papel filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . O sulfato de sódio foi utilizado para precipitar o chumbo remanescente na forma de  $\text{PbSO}_4$  (precipitado branco insolúvel) e realizado uma segunda filtração. A remoção do Pb remanescente é necessária principalmente para a análise colorimétrica, pois ao adicionar o reagente de Benedict (contendo  $\text{CuSO}_4$ ) na amostra contendo Pb irá ocorrer a precipitação do sulfato de chumbo, podendo interferir na análise com imagem digitais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O preparo da amostra 2 consistiu na solubilização de um sachê de 7,34 g em 250 mL de água, como indica a forma de preparo no rótulo. Não foi necessário clarificar a amostra, pois era incolor.

### 3.4.2 Método de referência

As soluções de Fehling A (0,138 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  em água) e Fehling B (0,613 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,500 mol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH em água) foram preparadas e padronizadas com glicose previamente seca em estufa a 70 °C durante uma hora, de acordo com o manual de métodos físico-químicos para análise de alimentos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

A padronização foi realizada adicionando-se 10 mL de cada solução de Fehling em um erlenmeyer, juntamente com 40 mL de água. Aqueceu-se a mistura em uma chapa de aquecimento de forma que a solução atingisse a ebulição em torno de 4 minutos. Ao entrar em ebulição, a titulação foi iniciada gotejando-se padrão de glicose 1% (m/v). Inicialmente, a mistura das soluções de Fehling contida no erlenmeyer

apresenta coloração azul escuro. No decorrer da titulação, o  $\text{Cu}^{2+}$  é reduzido produzindo precipitado avermelhado de  $\text{Cu}_2\text{O}$  e ocasionando a descoloração da solução. A titulação é finalizada quando a solução estiver incolor. Próximo do ponto final foi adicionado 3 gotas do indicador azul de metileno para facilitar a visualização do ponto final.

Após feita a padronização, foi realizado a determinação da concentração de açúcares redutores em glicose nas amostras. Prosseguindo da mesma forma que no procedimento de padronização, no entanto, as amostras eram adicionadas na bureta em substituição a solução padrão de glicose.

### 3.4.3 Método colorimétrico

O Reagente de Benedict foi preparado conforme o procedimento descrito no Manual de Soluções, Reagentes & Solventes (MORITA e ASSUMPÇÃO, 2003).

Para o preparo de 250 mL do reagente, inicialmente, foi aquecido 150 mL de água e solubilizado 25,04 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro e 43,20 g de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Em outro recipiente foi solubilizado 4,33 g de  $\text{CuSO}_4$  em 20 mL de água. Em seguida a solução de cobre foi adicionada sobre a solução de citrato de sódio e carbonato de sódio e aferido a 250 mL com água. Ao misturar as soluções há a alteração da coloração de azul claro para azul forte, indicando a formação do complexo de cobre com o citrato.

A reação de oxirredução foi realizada em frascos de polipropileno de 2 mL utilizando 0,75 mL do Reagente de Benedict e 0,75 mL de padrão de glicose ou amostra. Para completar a reação, aqueceu-se a mistura em banho maria a 90 °C.

Foram avaliadas duas metodologias para a aquisição das imagens digitais. Na primeira, foi feita a captura da imagem no frasco contendo o precipitado avermelhado logo após finalizar a reação de oxirredução.

Na segunda estratégia, foi realizado a leitura apenas do sobrenadante, ou seja, do reagente de Benedict remanescente após a reação. Neste caso, os frascos foram centrifugados a 3.000 rpm durante 3 minutos para decantar o precipitado formado. Em seguida, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferido para outro frasco para a captura de imagem.

### 3.4.3.1 Otimização

Inicialmente foi verificado o tempo necessário para que todo açúcar do padrão/amostra reagisse com o reagente de Benedict. Para isso, foi utilizado uma solução padrão de glicose de  $5 \text{ g L}^{-1}$ . O tempo foi verificado até 14 minutos e foi fixado aquele que apresentasse coloração constante após certo período, indicando o consumo de todo açúcar presente na solução padrão do maior ponto da curva de calibração.

As condições experimentais foram avaliadas a partir de um planejamento de experimentos fatorial do tipo Doehlert (DOE) utilizando o modelo quadrático para duas variáveis, em que se avaliou a influência da intensidade de luz (30 a 180 lx) e a distância focal da câmera (2 a 20 mm). A construção do planejamento foi feita em planilhas eletrônicas, como apresentado por Teófilo e Ferreira (2006). A planilha fornece os níveis de cada variável, os ensaios do planejamento, a análise de variância para verificar o ajuste do modelo e a superfície de resposta para encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada (Teófilo e Ferreira, 2006).

A distância focal da câmera foi definida como variável 1 e a intensidade de luz como variável 2. Em casos de duas variáveis, os níveis gerados são 5 e 3 para a variável 1 e 2, respectivamente, resultando em 13 ensaios. Na Tabela 1 podem ser observados os níveis gerados para cada variável e na Tabela 2 os ensaios gerados pelo planejamento DOE.

**Tabela 1** - níveis reais e codificados para cada variável a fim de obter a melhor condição experimental na aquisição das imagens digitais

<b>Variáveis</b>	<b>Código</b>	<b>Níveis</b>				
Distância	Var01	-1	-0,5	0	0,5	1
		2	6,5	11	15,5	20
Intensidade	Var02	-1	0	1		
		30	105	180		

Fonte: Autoral, 2023.

**Tabela 2** - ensaios gerados pelo planejamento DOE

<b>Ensaio</b>	<b>Var01</b>	<b>Var02</b>
1	20	105
2	15,5	180
3	2	105
4	6,5	30
5	15,5	30
6	6,5	180
7	11	105
8	11	105
9	11	105
10	11	105
11	11	105
12	11	105
13	11	105

Fonte: Autoral, 2023.

Os ensaios foram realizados com um padrão de 2,5 g L<sup>-1</sup> e as capturas de imagem foram feitas utilizando a opção de calibração multivariada apenas para obtenção dos valores dos canais R, G e B. O vetor resultante ( $\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}$ ) foi inserido como resposta aos ensaios na planilha proposta por Teófilo e Ferreira (2006) a fim de avaliar a significância da regressão, ajuste do modelo e obter os gráficos de superfícies, que indica a melhor condição de trabalho.

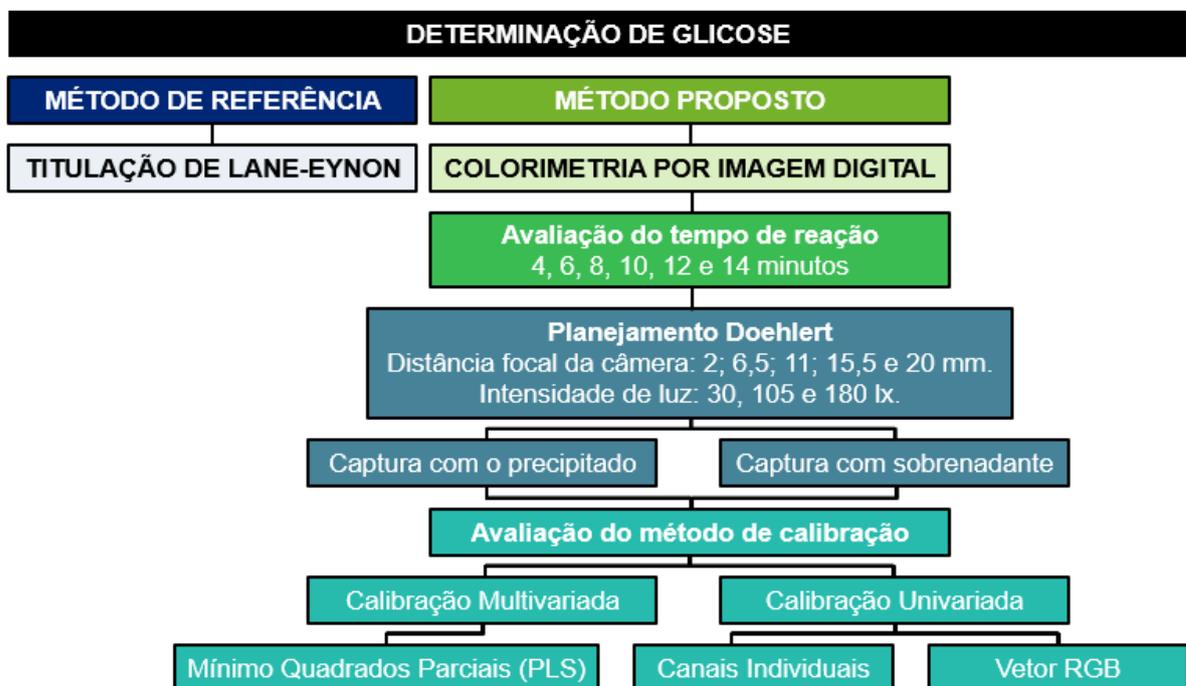
A ferramenta Solver, disponível no Microsoft Excel®, foi utilizada para confirmar qual a condição ótima de trabalho. Esse suplemento pode ser utilizado para teste de hipóteses, sendo possível identificar valores de máximo e mínimo, que são inconclusivos apenas por visualização dos gráficos de superfícies.

Na estratégia de leitura com apenas o sobrenadante, considerando que a curva de calibração obtida após a reação entre o Reagente de Benedict e a glicose possui um decréscimo da intensidade de coloração em relação ao aumento da concentração de glicose, suspeitava-se que, neste caso, a melhor condição de trabalho seria correspondente as condições experimentais representadas pelo menor ponto do gráfico de superfície.

Desta forma, a curva de calibração foi analisada nas condições representadas pelo ponto máximo e nas condições mínimas, sendo escolhida a condição que apresentar a melhor linearidade, menor erro quadrático médio de calibração (RMSEC, do inglês, *Root Mean Square Error of Calibration*), menor erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV, do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*) e menor erro quadrático médio de predição (RMSEP, do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*).

A Figura 6 ilustra a sequência dos procedimentos realizados.

Figura 6 – Fluxograma dos procedimentos realizados e parâmetros avaliados



Fonte: Autoral, 2023.

#### 3.4.3.2 Determinação de glicose nas amostras

A análise das amostras foi feita após a otimização das condições experimentais, preparando-se uma curva de calibração de 0,25 a 5 g L<sup>-1</sup> de glicose.

#### 3.4.4 Validação

A curva de calibração obtida na análise por PLS foi avaliada em termos da linearidade, RMSEC, RMSECV, RMSEP e do número de fatores necessários para a adequada explicação do método.

Sistematicamente, na análise de validação cruzada (RMSECV) um padrão do conjunto de padrões de calibração é retirado da curva e em sequência é avaliado como amostra pela curva obtida sem esse. A análise fornece o RMSECV. Para a definição do número de fatores a ser usado, é escolhido aquele que apresentar o menor valor de RMSECV e que a partir desse não se tenha mais ganho de informação.

Para ambas as análises, univariada e multivariada, foi utilizado um conjunto de previsão, que consiste em soluções de referência que não estavam incluídas na curva de calibração, a fim de avaliar a capacidade preditiva do modelo (RMSEP), calculado a partir da Equação 3. Em que  $y_m$  é o valor medido,  $y_e$  é o valor esperado e  $n$  é o número de amostras do conjunto.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_m - y_e)^2}{n}} \quad (3)$$

O limite de quantificação foi calculado de acordo com a Equação 4, partindo do desvio padrão de 10 medidas do branco e o coeficiente angular (sensibilidade) da equação de reta da curva de calibração. O branco era obtido através da reação de 0,75 mL do Reagente de Benedict e 0,75 mL de água ultrapura.

$$LQ = \frac{10 \times sd}{sensibilidade} \quad (4)$$

A exatidão do método foi avaliada por comparação dos resultados obtidos pelo PhotoMetrix e pela titulação de Lane-Eynon através do teste t de *Student*, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o software RStudio, versão 4.1.2.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

*O capítulo a seguir conterà os resultados obtidos ao longo do trabalho. Inicialmente serão mostrados os resultados obtidos pelo método de referência. Em seguida, será apresentado a otimização do método colorimétrico. E, por fim, são apontadas as figuras de mérito utilizando três modos de calibração do PhotoMetrix e a determinação de glicose nas amostras.*

#### 4.1 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA

A titulação de Fehling ou Lane-Eynon foi feita rapidamente, atingindo a ebulição em torno de quatro minutos e após iniciada a titulação, terminada em até três minutos para evitar que o  $\text{Cu}_2\text{O}$  volte a forma  $\text{Cu(II)}$  devido a reação com o oxigênio do ar atmosférico.

Inicialmente foi feita a padronização do reagente de Fehling com glicose 1% previamente seca. Determinou-se que o fator ( $f$ ) da solução de Fehling (gramas de glicose correspondente a 10 mL das soluções de Fehling) foi de 0,055 g, calculado de acordo com a Equação 5, em que  $V$  é o volume gasto do padrão de glicose e  $P$  é o título da solução padrão (g%).

$$f = V \times P \quad (5)$$

Após a padronização, procedeu-se as determinações de glicose nas amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. No rótulo de informação nutricional da amostra 1 é informado que a concentração de glicose é igual a  $22,5 \text{ g L}^{-1}$ . Já para a amostra 2, a diluição de um sachê com 7,34 g de amostra em 250 mL de água, como indicado no rótulo, fornece uma solução com  $24,2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Ambas as amostras não apresentaram diferença significativa entre o valor determinado e a informação do rótulo, verificado através do teste  $t$  com intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 3** - Determinação de glicose nas amostras por titulometria de Lane-Eynon (n=3)

Amostra	Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	$18,1 \pm 3,3$
2	$21,2 \pm 2,3$

Fonte: Autoral, 2023

#### 4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO

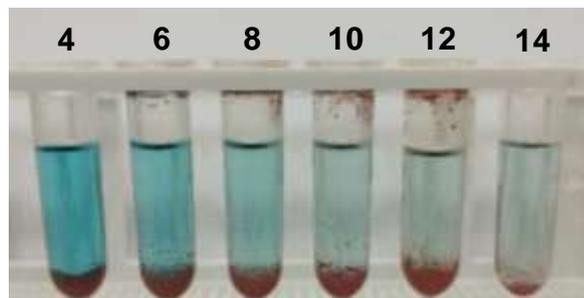
Inicialmente foi realizado um teste para avaliar o tempo de reação necessário entre o reagente de Benedict e a glicose. Após a seleção do tempo, foi feita a definição dos parâmetros analíticos, da distância focal da câmera endoscópica e da intensidade de luz aplicada pelo LED, através do planejamento Doehlert e do suplemento Solver.

### 4.2.1 Avaliação do tempo

A escolha do tempo de reação foi feita partindo-se de uma solução padrão de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Foram preparadas seis soluções com  $0,75 \text{ mL}$  de padrão de glicose e  $0,75 \text{ mL}$  do Reagente de Benedict. Os frascos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram colocados em banho maria à  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  durante tempos de 4, 6, 8, 10, 12 e 14 minutos, respectivamente.

Analisando a Figura 7, percebe-se que a partir de 10 minutos não há mais alteração na coloração da solução. Portanto, foi definido o tempo de 10 minutos para a reação de oxirredução entre o Reagente de Benedict e a glicose.

**Figura 7** - Avaliação do tempo de reação de oxirredução entre o reagente de Benedict e a glicose. Em minutos.



Fonte: Autoral, 2023

### 4.2.2 Planejamento Dohlert

Os 13 ensaios do planejamento gerado pela planilha eletrônica proposta por Teófilo e Ferreira (2006) foram realizados com uma solução padrão de  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  para a estratégia de análise direta (capturando a imagem no frasco em que foi realizada a reação de oxirredução, com o precipitado de óxido de cobre presente) e análise do sobrenadante (após a centrifugação do frasco e coleta de  $1 \text{ mL}$  do sobrenadante para outro frasco).

#### 4.2.2.1 Captura de imagem com o precipitado

Capturou-se as imagens utilizando o modelo PLS apenas para adquirir os valores dos canais R, G e B. O vetor resultante dos três canais foi colocado como

respostas aos ensaios. A Tabela 4 abaixo apresenta os ensaios e respectivas respostas.

**Tabela 4** – Respostas dos ensaios do Planejamento DOE originados da captura dos frascos contendo o precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$

<b>Ensaio</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>B</b>	<b>Vetor RGB</b>
1	131	67	81	168.0
2	104	94	102	173.4
3	107	59	44	129.9
4	49	46	37	76.7
5	69	53	52	101.4
6	119	114	115	201.0
7	122	61	59	148.6
8	123	61	55	147.9
9	125	60	64	152.7
10	109	67	63	142.6
11	107	66	64	141.1
12	113	70	70	150.2
13	112	66	60	143.2

Fonte: Autoral, 2023

Após inserir o vetor resultante como resposta aos experimentos, foram obtidos os resultados de significância da regressão e o ajuste do modelo quadrático (Tabela 5). A soma quadrática da variação total ( $SQ_{total}$ ) é a soma dos componentes  $SQ_{regressão}$  e  $SQ_{resíduos}$ . Em um bom modelo é esperado que a maior parte da variação total seja descrita pela equação de regressão e o restante pelos resíduos. A  $SQ_{resíduos}$  é dada pela soma dos componentes: soma quadrática do erro puro ( $SQ_{ep}$ ) e a soma quadrática da falta de ajuste ( $SQ_{faj}$ ). Da variação que fica com os resíduos é esperado que a maior parte fique com o erro puro (erro experimental) e não com a falta de ajuste (relacionado com o modelo). Em termos práticos, um bom modelo deve apresentar regressão significativa e falta de ajuste não significativa (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Os dados demonstrados na Tabela 5 indicam que a regressão foi significativa ( $p < 0,05$ ), no entanto o modelo apresenta falta de ajuste ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5** - Análise de variância do planejamento DOE utilizando o modelo quadrático das capturas de imagem dos frascos contendo o precipitado de Cu<sub>2</sub>O

Fonte de variação	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	10990,2	5	2198,04	38,94 <b>SG</b>	6E-06
Resíduos	395,125	7	56,446		
Falta de Ajuste	280,683	1	280,683	14,716 <b>SG</b>	0,009
Erro Puro	114,442	6	19,074		
Total	11385,3	12			
% variação explicada				99,35	
% máxima de variação explicável				99,51	

SQ: soma quadrática; nGL: número de graus de liberdade; MQ: média quadrática.

#### 4.2.2.2 Captura de imagem do sobrenadante

Para a captura de imagem deste planejamento, foi realizado a centrifugação e coleta de 1 mL do sobrenadante. Os valores de cada canal adquiridos das capturas de imagem estão demonstrados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Respostas dos ensaios do Planejamento DOE originados da captura dos frascos contendo apenas o sobrenadante

Ensaio	R	G	B	Vetor RGB
1	143	207	203	323.3
2	141	206	194	316.2
3	140	204	195	315.0
4	129	175	146	261.9
5	126	173	161	267.8
6	142	207	199	320.3
7	124	191	177	288.4
8	124	191	177	288.4
9	124	189	174	285.3
10	122	192	179	289.5
11	122	192	180	290.1
12	122	193	181	291.4
13	121	192	179	289.0

Fonte: Autoral, 2023.

Neste caso, os resultados de significância da regressão e o ajuste de modelo foram mais promissores do que a análise direta dos frascos contendo o precipitado.

Os valores da Tabela 7 indicam que o modelo está ajustado pois forneceu  $p > 0,05$  e a regressão foi significativa ( $p < 0,05$ ), tendo como variância explicada de 99,35%.

**Tabela 7** - Análise de variância do planejamento DOE utilizando o modelo quadrático das capturas de imagem dos frascos contendo apenas o sobrenadante

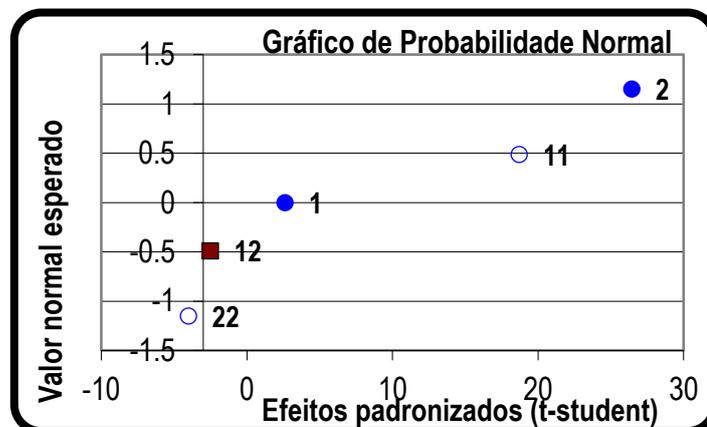
Fonte de variação	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	$p$
Regressão	4376,5	5	875,3	214,581 <b>SG</b>	2E-07
Resíduos	28,554	7	4,079		
Falta de Ajuste	7,032	1	7,032	1,960	0,211
Erro Puro	21,522	6	3,587		
Total	4405,036	12			
% variação explicada				99,35	
% máxima de variação explicável				99,51	

SQ: soma quadrática; nGL: número de graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Visto que a estratégia de análise direta do frasco contendo o precipitado apresentou falta de ajuste, prosseguiu-se todas as análises a seguir apenas com o sobrenadante.

Após verificar a análise de variância do modelo, foi avaliado os coeficientes do modelo a fim de selecionar os que são significativos para realizar a análise de superfície de resposta. O gráfico de probabilidade normal (Figura 8), obtido na planilha eletrônica, indica que o coeficiente da variável 2 (intensidade de luz) e coeficiente quadrático da variável 1 (distância focal da câmera) apresentam a maior contribuição para o modelo.

**Figura 8** - Gráfico de probabilidade normal dos coeficientes

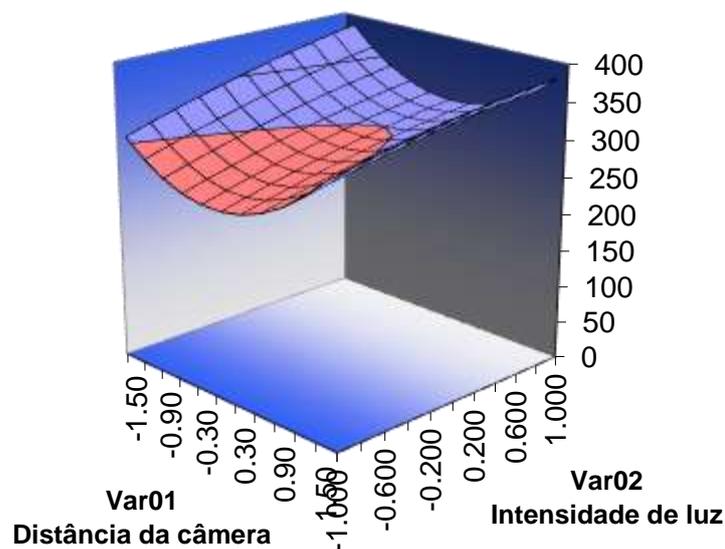


Fonte: Autoral, 2023.

Todos os coeficientes apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) e foram utilizados para adquirir o gráfico de superfície de resposta e para a posterior análise utilizando a ferramenta Solver.

Na Figura 9 é apresentado a superfície de resposta obtida, percebe-se que a superfície tem a menor resposta com distância focal intermediária e com baixas intensidades, já a maior resposta é obtida em maiores intensidades de luz e com distância da câmera menor e maior.

**Figura 9** - Superfície de resposta gerada pelo planejamento DOE



Fonte: Autoral, 2023.

Para confirmar o ponto de mínimo e máxima intensidade, foi utilizada a ferramenta Solver, suplemento disponível no Microsoft Excel®, utilizando o método de solução de Gradação Reduzida Generalizada (GRG, do inglês, *Generalized Reduced Gradation*) não linear. Através dos resultados expressos na Tabela 8 foi definido que o ponto de maior intensidade foi com 20 mm de distância focal e 180 lx de intensidade. Já a condição que forneceu a menor intensidade foi com 6,68 mm de distância focal e intensidade de luz de 30 lx. As duas condições foram utilizadas para adquirir as imagens da curva analítica a fim de verificar se a melhor resposta do modelo é referente as condições do ponto máximo ou ponto mínimo.

**Tabela 8** – Resultado das condições de ponto máximo e ponto mínimo através da ferramenta Solver

	Planejamento			Resposta		
	-1	0	1	Ponto	Valor codificado	Valor real
Var01	2	11	20	máximo	1	20
				mínimo	-0,147	9,68
Var02	30	105	180	máximo	1	180
				mínimo	-1	30

Fonte: Autoral, 2023.

#### 4.2.3 Definição do método de calibração

O método de calibração multivariada utilizando PLS e os métodos de calibração univariada utilizando canais individuais ou o vetor RGB foram avaliados utilizando as condições de ponto máximo e mínimo para verificar qual condição e método de calibração fornece os melhores valores de linearidade, RMSECV e RMSEP. Para todos os modos de calibração foi utilizado uma curva de 0,25 a 5 g L<sup>-1</sup> de glicose (Figura 9).

**Figura 10** - Curva de calibração de 0,25 a 5 g L<sup>-1</sup> de glicose



Fonte: Autoral, 2023.

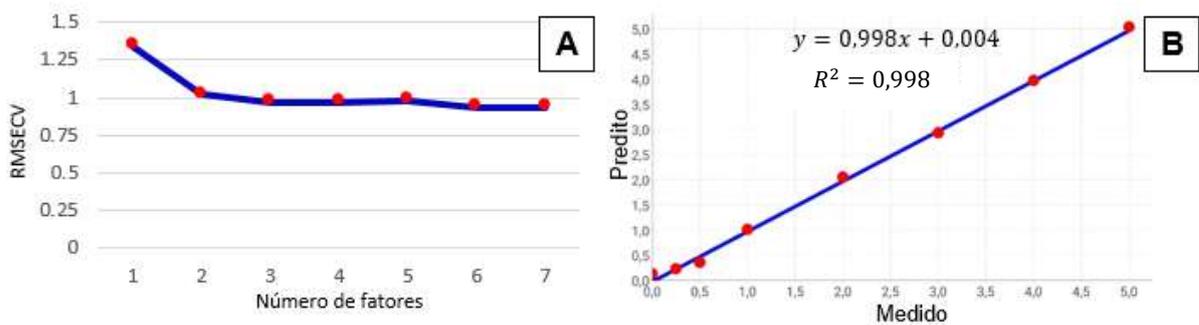
##### 4.2.3.1 Calibração multivariada utilizando PLS

Para a calibração multivariada pelo método PLS disponível no aplicativo PhotoMetrix escolhe-se o número de fatores em que fornece o menor valor de RMSECV e boa linearidade. O valor de RMSECV é fornecido pelo aplicativo após a construção da curva de calibração e definição do número de fatores.

Inicialmente foi feito a captura de imagem utilizando as condições do ponto mínimo (9,68 mm de distância e 30 lx de intensidade de luz) da superfície de resposta

gerada pelo planejamento DOE. Analisando o gráfico ilustrado na Figura 11-A, percebe-se que três fatores são suficientes para a adequada explicação do modelo, acima disso não se tem mais ganho de informação.

**Figura 6** - (A) Valores de RMSECV em função do número de fatores e (B) curva de calibração nas condições experimentais indicadas pelo ponto de mínima intensidade



Fonte: Autora, 2023.

Definindo o número de fatores igual a três obteve-se uma curva de calibração (Figura 11-B) com coeficiente de determinação igual a 0,998. Apesar de fornecer boa linearidade, ao verificar a capacidade preditiva do método utilizando padrões de calibração, foram obtidos valores com erros superiores a 10%. Como pode ser observado na Tabela 9, o valor calculado para o RMSEP foi igual a 0,47 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 9** - Avaliação da capacidade preditiva utilizando PLS nas condições do ponto mínimo

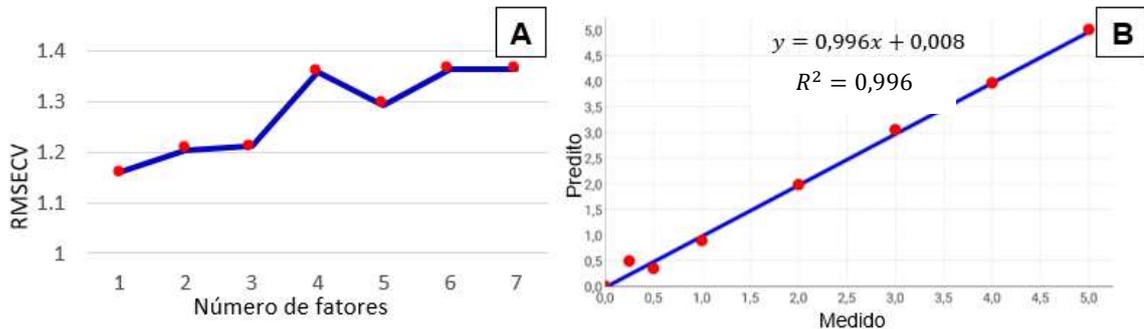
Padrão (g L <sup>-1</sup> )	Concentração medida (g L <sup>-1</sup> )
1,5	1,97
3,5	3,91
4,5	5,02
RMSEP	0,47

Fonte: Autoral, 2023.

Após feita a análise nas condições experimentais do ponto mínimo da superfície de resposta, foi realizado para o ponto de máxima intensidade, ou seja, com distância focal de 20 mm e intensidade de luz de 180 lx.

Os resultados expressos na Figura 12-A, diferentemente do que é visto usualmente, tem o valor de RMSECV crescente conforme aumenta o número de fatores. Para obter um coeficiente de determinação igual a 0,996 (Figura 12-B) foram necessários cinco fatores.

**Figura 12** - (A) Valores de RMSECV em função do número de fatores e (B) curva de calibração nas condições experimentais indicadas pelo ponto de máxima intensidade



Fonte: Autoral, 2023.

Para confirmar que o ponto máximo realmente não seria a condição ótima, foi feita a captura dos padrões de previsão para obter o valor de RMSEP, resultando em  $1,43 \text{ g L}^{-1}$  (Tabela 10).

**Tabela 10** - Capacidade preditiva utilizando PLS nas condições do ponto máximo

Padrão ( $\text{g L}^{-1}$ )	Concentração medida ( $\text{g L}^{-1}$ )
1,5	3,55
3,5	3,53
4,5	3,11
RMSEP	1,43

Fonte: Autoral, 2023.

Considerando os resultados para o número de fatores e o elevado RMSEP, confirma-se que o ponto máximo da superfície de resposta não é a condição ótima. Desta forma, para as próximas análises apenas as condições do ponto mínimo foram utilizadas.

#### 4.2.3.2 Calibração univariada utilizando canais individuais

A análise univariada é recomendada para casos em que a concentração do analito altera somente a intensidade da cor (HELPER et al., [2023]). Neste modo de calibração, após realizar a captura de imagem dos padrões, a opção fornece a regressão linear simples para cada um dos canais, como o vermelho (R, do inglês, *Red*), verde (G, do inglês, *Green*), azul (B, do inglês, *Blue*), matiz (H, do inglês, *Hue*), saturação (S, do inglês, *Saturation*), valor (V, do inglês, *Value*), luminosidade (L, do

inglês, *Luminosity*) e intensidade (I, do inglês, *Intensity*). A Tabela 11 indica a equação de reta e o coeficiente de correlação de cada canal.

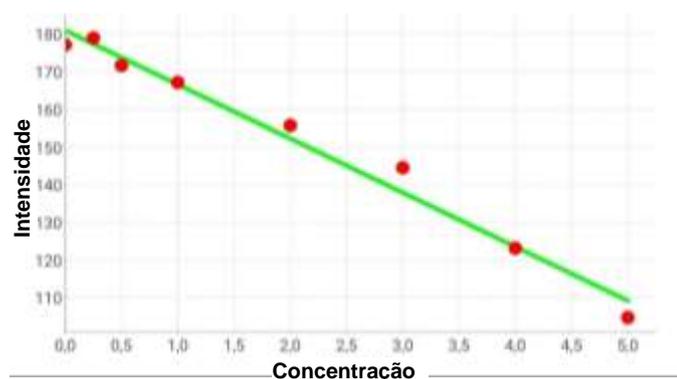
**Tabela 11** - Equações de reta e coeficientes de correlação obtidos pelo modo de calibração univariada pelo método de regressão linear simples

Canal	Equação de reta	Coefficiente de correlação
S	$y = -0,100x + 0,734$	-0,991
R	$y = -14,360x + 181,099$	-0,990
V	$y = -0,056x + 0,710$	-0,990
B	$y = 11,756x + 42,247$	0,980
L	$y = -0,014x + 0,458$	-0,899
H	$y = 76,164x - 18,643$	0,867
I	$y = -0,005x + 0,411$	-0,830
G	$y = -0,881x + 84,169$	-0,485

Fonte: Autoral, 2023.

Com base nos dados foi observado que os vetores S, R e V forneceram os melhores valores de correlação, no entanto os vetores S e V apresentaram baixa sensibilidade, que resulta em elevados limites de quantificação. Desta forma, o canal R foi escolhido para as seguintes análises. A Figura 13 ilustra a curva de calibração obtida através do vetor R.

**Figura 13** - Curva de calibração do vetor R



Fonte: Autoral, 2023.

A Tabela 12 indica a predição dos padrões de previsão. Neste caso o valor de RMSEP foi igual a  $0,29 \text{ g L}^{-1}$ , valor inferior aos modos de calibração anteriores. No entanto, apresentou erro relativo superior a 10% para o padrão de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$ .

**Tabela 12** - Capacidade preditiva utilizando o vetor R no modo de calibração univariada

Padrão (g L <sup>-1</sup> )	Concentração medida (g L <sup>-1</sup> )
1,5	1,68
3,5	3,63
4,5	4,95
RMSEP	0,29

Fonte: Autoral, 2023.

#### 4.2.3.3 Calibração univariada utilizando o vetor RGB

O modo de calibração utilizando o vetor RGB fornece apenas uma equação de reta, gerada pela regressão simples do vetor resultante ( $\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}$ ).

Para essa análise o padrão de 0,25 g L<sup>-1</sup> foi removido da curva de calibração, desta forma foi possível obter um valor de coeficiente de correlação maior (Figura 14).

**Figura 147** - Curva de calibração utilizando o vetor RGB no modo de calibração univariada

Fonte: Autoral, 2023

Analisando a Tabela 13, é possível verificar que o modo de calibração univariada utilizando o vetor RGB forneceu o menor valor de RMSEP e erros relativos de no máximo 8%. Além disso, obteve-se uma boa linearidade e o maior valor para o coeficiente angular, que está relacionado com o limite de quantificação. Desta forma, o vetor RGB foi escolhido para realizar a determinação de glicose nas amostras.

**Tabela 13** - Capacidade preditiva utilizando o vetor R no modo de calibração univariada

Padrão (g L <sup>-1</sup> )	Concentração medida (g L <sup>-1</sup> )
1,5	1,62
3,5	3,74
4,5	4,73
RMSEP	0,20

Fonte: Autoral, 2023.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE NAS AMOSTRAS

O desenvolvimento do método colorimétrico teve como resultados a condição ótima de 20 mm de distância focal da câmera e intensidade de luz de 30 lx aplicada pelo LED. Além disso, foi estabelecido que o modo de calibração univariada utilizando o vetor resultante RGB seria utilizado para a análise das amostras, pois forneceu os melhores valores para as figuras de mérito RMSEP e coeficiente de correlação.

Para a determinação de glicose nas amostras foi utilizado uma curva de calibração de 0,5 a 5 g L<sup>-1</sup> de glicose.

Inicialmente foi feito o preparo das amostras. No caso da amostra 1 foi realizado a clarificação e para a amostra 2 foi feito a solubilização. Ambas as amostras foram diluídas para a determinação por colorimetria.

O procedimento de reação de oxirredução para as amostras foi feito da mesma forma que as soluções padrão, utilizando 0,75 mL do Reagente de Benedict e 0,75 mL da amostra. Em seguida, foram aquecidas a 90 °C durante 10 minutos. Posteriormente, foi realizado a centrifugação e coleta de 1 mL do sobrenadante.

A captura de imagem nas condições otimizadas resultou nos valores de concentração de glicose, em g L<sup>-1</sup>, apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** - Concentração de glicose nas amostras obtidos pelo método proposto utilizando o PhotoMetrix e pelo método de referência de titulação de Lane-Eynon. Resultados em g L<sup>-1</sup>

Amostra	PhotoMetrix	Titulação
1	17,0 ± 0,6	18,2 ± 3,3
2	23,3 ± 1,8	21,2 ± 2,3

Fonte: Autoral, 2023.

A exatidão do método foi verificada através do teste *t* (RStudio) com intervalo de confiança de 95%. Não foi observado diferença significativa entre os resultados do método proposto e do método de referência. O limite de quantificação foi obtido a partir de dez leituras do branco, fornecendo o valor de 0,17 g L<sup>-1</sup>.

## 5 CONCLUSÃO

O planejamento experimental do tipo Doehlert em conjunto com a ferramenta Solver foi adequado para a avaliação da condição ótima de trabalho. Foi definido que distâncias focais intermediárias (9,68 mm) e baixa intensidade de luz (30 lx) apresentam as melhores respostas no modelo. Apenas a estratégia de captura de imagem do sobrenadante foi empregada nas determinações de glicose. Isso pois, o resultado do planejamento com a captura de imagem direta do precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$  apresentou falta de ajuste. Isso pode ser justificado pela distribuição de coloração não homogênea, visto que o precipitado decanta rapidamente, sendo requerido agilidade e padronização no tempo de agitação e de captura de imagem.

O modo de calibração multivariada pelo método PLS e a calibração univariada com o vetor R forneceram erros de previsão superiores a 10%. O modo de calibração univariada utilizando o vetor RGB apresentou o menor valor de RMSEP e maior coeficiente de correlação, sendo o método escolhido para a determinação de glicose nas amostras e apresentando um LQ satisfatório de  $0,17 \text{ g L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos pelo método proposto não tiveram diferença significativa quando comparados com os resultados do método de referência de titulação. O método titulométrico de Lane-Eynon apresenta desvantagens, como a instabilidade do reagente e a necessidade de realizar a titulação em até 3 minutos. Já o método proposto possui vantagens como a redução do uso de reagentes, possibilidade de miniaturização do sistema, baixo custo, facilidade de operação e tratamento de dados.

O uso de dispositivos portáteis miniaturizados atrelado ao uso de imagens digitais é uma alternativa econômica e prática para a medição rápida em análises rotineiras de controle de qualidade de bebidas.

## REFERÊNCIAS

- BAUMANN, L. *et al.* Uso do aplicativo PhotoMetrix no monitoramento da concentração de flúor em sistemas alternativos de abastecimento de água. **Águas Subterrâneas**, v. 33, n. 2, 2019.
- BENEDETTI, L. P. dos S. *et al.* A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, n. 10, p. 4138–4144, 2015.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005. **Manual Operacional de Bebidas e Vinagres**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2005. Seção 1, p. 11.
- CALDAS, B. S. *et al.* Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 53–63, 2015.
- DA COSTA, A. *et al.* PhotoMetrix UVC: A New Smartphone-Based Device for Digital Image Colorimetric Analysis Using PLS Regression. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2021.
- DUARTE, D. D. *et al.* Development and validation of a liquid chromatographic method to quantify sucrose, glucose, and fructose in tubers of *Solanum tuberosum* Group Phureja. **Journal of Chromatography B**, v. 975, p. 18–23, 2015.
- HATANAKA, C.; KOBARA, Y. Determination of Glucose by a Modification of Somogyi-Nelson Method. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2943–2949, 1980.
- HELPER, G. A. *et al.* PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016.
- HELPER, G. A.; COSTA, A. B.; FERRÃO M. F. Tutorial: Bem-vindo ao PhotoMetrix. **PhotoMetrix**, [2023]. Disponível em: <https://www.photometrix.com.br/>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A. *et al.* Quantification of Reducing Sugars Based on the Qualitative Technique of Benedict. **ACS Omega**, v. 5, n. 50, p. 32403–32410, 2020.
- HOAREAU, W. *et al.* Non-lead polarimetry for sugarcane juice and factory products. **Sugar Industry**, p. 69–81, 2010.
- HOLKEM, A. P. *et al.* A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Fuel**, v. 289, p. 119941, 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4ª ed. (1ª ed digital). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KEJLA, L. *et al.* Anthrone method combined with adsorption of interferents as a new approach towards reliable quantification of total carbohydrate content in pyrolysis bio-oils. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 173, p. 106066, 2023.

KUMAR, N. *et al.* Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186–199, 2014.

LANE, J. H.; EYNON, L. **Determination of Reducing Sugars by Fehling's Solution with Methylene Blue Indicator.** Norman Rodger, London, 1934.

MARQUES, O. F.; NETO, H. V. **Processamento Digital de Imagens.** Rio de Janeiro: Brasport, 1999.

MASAWAT, P. *et al.* Green Determination of Total Iron in Water by Digital Image Colorimetry. **Analytical Letters**, v. 50, n. 1, p. 173–185, 2017.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes.** 12ª reimpressão. p. 287. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

PAPPIS, C. *et al.* Point-of-use determination of fluoride and phosphorus in water through a smartphone using the PhotoMetrix® app. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 25, 2019.

PISMENNÕI, D. *et al.* Development and Optimisation of HILIC-LC-MS Method for Determination of Carbohydrates in Fermentation Samples. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3669, 2021.

SÁ, A.; PAIM, L.; STRADIOTTO, N. New Detector Based on Composite of Carbon Nanotubes with Nanoparticles of Cobalt Oxide for Carbohydrates Analysis by HPLC with Reverse Pulsed Amperometric Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

SCHLESNER, S. K. *et al.* Smartphone-based miniaturized, green and rapid methods for the colorimetric determination of sugar in soft drinks. **Green Analytical Chemistry**, v. 1, p. 100003, 2022.

SHORE, M.; SARGENT, D. Modern instrumental techniques of analysis and sugar industry. **International Sugar Journal**, v. 83, n. 991, p. 199-205, 1981.

SILVA, R. N. *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337–341, 2003.

SIQUEIRA, G. Determinação de açúcar em alimentos e bebidas. **BQIBR**, 2019. Disponível em: <https://bioquimicabrasil.com/2019/05/26/determinacao-de-acucar-em-alimentos-e-bebidas/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105862, 2021.

SOLOMON, C.; BRECKON, T. **Fundamentals of Digital Image Processing: a practical approach with examples in Matlab**. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica**. Volume 1. 12ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018.

SOLOMONS, T.W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica**. Volume 2. 12ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018.

SOUZA, D. M. et al. Uso do aplicativo PhotoMetrix® para a determinação de fosfato em fertilizantes: um recurso didático para o ensino de química analítica. **Seminário Internacional de Educação, Tecnologia e Sociedade: Ensino Híbrido**, 2019.

TEIXEIRA, G. G.; SANTOS, P. M. Simple and cost-effective approaches for quantification of reducing sugar exploiting digital image analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 113, p. 104719, 2022.

TEÓFILO, T. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: estrutura e função**. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

YOU, H. *et al.* Sugarcane nitrogen nutrition estimation with digital images and machine learning methods. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 14939, 2023.