

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GUSTAVO GALASTRI TEIXEIRA

**DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS A
PARTIR DE IMAGENS DIGITAIS**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2022

GUSTAVO GALASTRI TEIXEIRA

**DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS A PARTIR DE
IMAGENS DIGITAIS**

Determination of sugar in food samples based in digital images.

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química/Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Profa. Dra. Poliana Macedo dos Santos

CURITIBA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba**



GUSTAVO GALASTRI TEIXEIRA

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS A PARTIR DE IMAGENS DIGITAIS.

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Química Analítica.

Data de aprovação: 17 de Março de 2022

Prof.a Poliana Macedo Dos Santos, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Frederico Luis Felipe Soares, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Prof Vagner Bezerra Dos Santos, Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco (Ufpe)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 17/03/2022.

Dedico esse trabalho à minha família, professores e amigos.

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer a Deus e meus familiares, pois sem eles nada disso seria possível.

Não posso deixar de agradecer a UTFPR, PPGQ e LAMAQ pois são espaços que privilegiam o conhecimento e onde todas as ideias e pessoas são bem recebidas.

Deixo também um agradecimento aos meus professores, em especial a Prof^a. Dr^a. Poliana Macedo dos Santos pois sem ela este não teria sido possível.

Aos professores, Dr. Vagner Bezerra dos Santos e Dr. Frederico Luis Felipe Soares, por fazer parte da banca examinadora e pela contribuição a esse estudo.

E por fim, agradeço ainda aos meus amigos que ao longo desta etapa me encorajaram e me apoiaram em todos os momentos.

“Eu não me importo com o que os outros pensam sobre o que eu faço, mas eu me importo muito com o que eu penso sobre o que eu faço. Isso é caráter.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

TEIXEIRA, Gustavo Galastri. Determinação de açúcar em amostras alimentícias a partir de imagens digitais. 2022. 58 f. Dissertação – Área de concentração: Química Analítica – PPGQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2022.

Os açúcares são carboidratos encontrados nos mais diversos alimentos consumidos diariamente no mundo. Uma das principais funções no organismo é o fornecimento de energia, porém o seu uso excessivo pode ser prejudicial à saúde, por este motivo, métodos analíticos visam garantir as informações contidas nas embalagens a fim de preservar a segurança do consumidor. Para realizar tais medições, existem diversos métodos e protocolos disponíveis na literatura, desde os mais simples como a titulação, até outros mais complexos como a cromatografia. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e validar dois métodos visando a quantificação de açúcares redutores presentes em amostras de bebidas alcoólicas e não alcoólicas. As amostras analisadas foram adquiridas na cidade de Curitiba-PR e são compostas por sucos (laranja, tangerina, maracujá, abacaxi e maçã), água de coco e cachaça. As propostas basearam-se no uso das reações colorimétricas 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e o teste de Benedict com a análise por imagens digitais. Os métodos foram parcialmente validados segundo os parâmetros de linearidade, limite de detecção (LD), exatidão e precisão. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que os métodos demonstraram linearidade nas faixas de 100-300 mg L⁻¹ para o DNS e de 1-5 g L⁻¹ para o método de Benedict, com limites de detecção 50 mg L⁻¹ e 1,0 g L⁻¹ respectivamente. A exatidão dos métodos foi verificada comparando os resultados com os métodos propostos com os obtidos pelo método de referência (titulométrico e cromatográfico). A partir de um teste t, com 95% de confiança, verificou-se que a concentração obtida com os métodos não é estatisticamente diferente ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$). Nos ensaios de adição e recuperação, os valores obtidos para os dois métodos ficaram na faixa de 97-104%. A precisão foi confirmada a partir dos valores de desvio padrão relativo (DPR) os quais foram inferiores a 4%. Desta forma, é possível afirmar que os métodos propostos indicam uma boa adequação para a finalidade de quantificar açúcares redutores, além de serem baratos, simples, apresentarem alta frequência analítica, baixo consumo de reagentes e geração de resíduos.

Palavras-chave: Açúcares Redutores. Imagem Digital. RGB.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Gustavo Galastri. Determination of sugar in food samples based in digital images. 2022. 58 f. Dissertation. Concentration area: Analytical Chemistry - PPGQ. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2022.

Sugar is the general term for carbohydrate compounds that occurs naturally or is intentionally added to many food products. Its main function is energy supply, but its high consumption can cause serious health problems (obesity, decayed teeth, and chronic diseases). Thus, analytical methods for quality control and to guarantee food safety compliance with legislation is required. In this context, this study aimed to develop procedures for the determination of reducing sugar in beverage samples (juice, coconut water, and sugar cane spirits). The reducing sugar content was determined by the well-known DNS and Benedict colorimetric methods combined with digital image analysis. Linear responses were observed in the glucose concentration range between 0.10 and 0.30 g L⁻¹, with a detection limit of 0.5 g L⁻¹ for the DNS method and from 1.0 to 5.0 g L⁻¹, with a detection limit of 1.0 g L⁻¹ for the Benedict method. Recovery values between 97% and 104% were obtained in the addition and recovery experiments for both procedures. These analytical procedures were applied to different beverage samples (juice, coconut water, and sugar cane spirits) and the results were in close agreement with those obtained using a reference method, with a confidence level of 95%. Thus, the combination of colorimetric reaction with digital image analysis proved to be a viable strategy for reducing sugar quantification in beverage samples by fast, accurate, precise, and low-cost analytical methods.

Keywords: Reducing Sugars. Digital Images. RGB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural da Glicose.....	13
Figura 2 - Representação estrutural da Frutose.....	14
Figura 3 - Reação de oxidação dos açúcares redutores no método DNS.....	17
Figura 4 - Representação do cubo RGB no espaço.....	20
Figura 5 – Modelo de cores HSV.....	20
Figura 6 – Fotografia de soluções de glicose na microplaca.....	31
Figura 7 – Curvas analíticas para os canais R, G e B obtidas no escâner (DNS).....	32
Figura 8 – Curvas analíticas para os canais R e G obtidas no escâner em microplacas na faixa de concentração de 100 a 300 mg L ⁻¹ de glicose.....	33
Figura 9 – Intensidade do sinal em poços com diferentes volumes.....	34
Figura 10 – Curvas analíticas com diferentes tempos de aquecimento (Canal G).....	34
Figura 11 – Estabilidade da cor da curva analítica.....	35
Figura 12 – Gráficos dos resíduos na medição por imagens digitais (DNS).....	37
Figura 13 – Fotografia de soluções de cobre na microplaca.....	40
Figura 14 – Curva analítica do cobre nos canais R, G e B.....	41
Figura 15 – Fotografia da placa contendo a curva analítica (Benedict).....	42
Figura 16 – Curvas analíticas para os canais R, G e B obtidas no escâner (Benedict)..	42
Figura 17 – Curva analítica de 1 a 5 g L ⁻¹ no canal R (Benedict).....	43
Figura 18 – Gráficos dos resíduos na medição por imagens digitais (Benedict).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da Variância.....	28
Tabela 2 – Compilado dos resultados de testes aplicados.....	36
Tabela 3 – Resultados da regressão com base na análise ANOVA (Imagem Digital - DNS).....	36
Tabela 4 – Limites de Detecção e Quantificação (DNS).....	37
Tabela 5 – Quantificação de açúcares redutores em amostras.....	38
Tabela 6 – Ensaio de Recuperação.....	39
Tabela 7 – Valores de Desvio Padrão Relativo.....	39
Tabela 8 – Resultados da análise ANOVA com relação a regressão e falta de ajuste (Benedict).....	44
Tabela 9 – Compilado dos resultados de testes aplicados (Benedict).....	45
Tabela 10 – Limites de Detecção e Quantificação (DNS).....	45
Tabela 11 – Quantificação de açúcares redutores em amostras.....	45
Tabela 12 – Ensaio de Recuperação.....	46
Tabela 13 – Valores de Desvio Padrão Relativo.....	47
Tabela 14 – Quantificação de açúcares redutores em amostras.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coefficiente de Variação
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPI	Pontos por Polegada
DPR	Desvio Padrão Relativo
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSI	<i>Hue, Saturation, Intensity</i>
HSV	<i>Hue, Saturation, Value</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
JPG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MIR	<i>Mid Infrared</i>
NIR	<i>Near Infrared</i>
r	Coefficiente de Correlação
r ²	Coefficiente de Determinação
RGB	Vermelho, Verde e Azul
UV-Vis	Ultra-Violeta Visível
LF-NMR	<i>Low Field Nuclear Magnetic Resonance</i>
DW	Teste de Durbin Watson
BF	Brown-Forsythe
SW	Teste de Shapiro-Wilk
SN	Somogyi-Nelson
MQ _m	Média Quadrática do modelo
MQ _r	Média Quadrática dos Resíduos
MQ _{fa}	Média Quadrática da Falta de Ajuste
MQ _{ep}	Média Quadrática do Erro Puro
SQ _m	Soma Quadrática do Modelo
SQ _r	Soma Quadrática dos Resíduos
SQ _{fa}	Soma Quadrática da Falta de Ajuste
SQ _{ep}	Soma Quadrática do Erro Puro
SQ _t	Soma Quadrática Total

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Açúcares	13
2.2	Métodos Quantitativos para análise de açúcares.....	15
2.2.1	Método DNS	16
2.2.2	Somogyi-Nelson	17
2.2.3	Fenol-Sulfúrico	18
2.2.4	Método de Benedict.....	19
2.3	Análises de imagem digital	19
3.	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivos gerais.....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Reagentes e soluções.....	24
4.1.1	Solução de DNS	24
4.1.2	Reagentes de Benedict	24
4.1.3	Amostras	25
4.2	Método DNS	25
4.3	Método Benedict.....	25
4.4	Aquisição de imagens digitais	25
4.5	Análise das imagens digitais	26
4.6	Métodos de referência	26
4.7	Validação.....	27
4.7.1	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	29
4.7.2	Exatidão.....	29
4.7.3	Precisão.....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	DNS	31
5.1.1	Otimização.....	31
5.1.2	Características analíticas.....	35
5.2	Benedict	40

5.2.1	Otimização.....	40
5.2.2	Características analíticas.....	43
5.3	Comparação dos métodos.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

A biologia mostra que a vida, como a conhecemos, não seria possível sem a presença de açúcar. Esta substância encontra-se presente na molécula de DNA, na fotossíntese e na respiração celular por exemplo (NIELSEN, 1998).

Os açúcares, do latim *succharum*, são em sua grande maioria de origem vegetal, sendo a lactose a grande exceção. Cerca de 70% de todas as calorias ingeridas diariamente são provenientes dessas substâncias. Estas, são decompostas, por meio da ação enzimática, até sua forma mais básica, os monômeros, que serão assimilados pelo organismo e metabolizados, de modo a promover a manutenção da vida (ASADI, 2007).

O Brasil tem como grande expoente o açúcar derivado da cana-de-açúcar, sendo um dos maiores produtores de açúcar do mundo, juntamente com a Índia. Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a safra 18/19, até fevereiro de 2019, produziu cerca de 28,7 milhões de toneladas de açúcar (MAPA, 2019). A indústria alimentícia é responsável por grande parte do consumo dessa substância, a qual faz sua escolha baseada no valor energético e em sua versatilidade, visto que o açúcar pode conferir características não replicáveis por outra substância, sendo as principais a textura, sabor e o tempo de prateleira (ASADI, 2007).

Em meio aos procedimentos analíticos bem estabelecidos para quantificação de açúcar em produtos alimentícios, destacam-se o uso do método titulométrico de Lane-Eynon, que é o método oficial no Brasil descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e pelo MAPA (2005), a espectroscopia no ultravioleta e visível (UV-Vis, *ultraviolet-visible*) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*), quando acoplada com diferentes detectores (índice de refração e espectrometria de massas). Além destas técnicas, a espectrometria de infravermelho na região do próximo (NIR, *Near infrared*) e médio (MIR, *Mid-infrared*) (RECH; WEILER; FERRÃO, 2018; OLIVEIRA et al., 2014), Raman (IIASLAN; BOYACI; TOPCU, 2015), ressonância magnética nuclear de baixo campo (LF-NMR, *Low-Field Nuclear Magnetic Resonance*) (PEREIRA et al., 2013; FLORES et al., 2016), entre outras, também têm sido utilizadas na quantificação de açúcares em diferentes amostras. Apesar destas técnicas serem amplamente utilizadas em análises de rotina, elas apresentam como principais

desvantagens o alto custo dos equipamentos e manutenção, quando comparados a metodologia aqui proposta.

Diante deste contexto, este projeto de mestrado visa propor métodos simples, rápidos e baratos para quantificação de açúcar em amostras alimentícias. Esta proposta combinará procedimentos bem estabelecidos, tais como, imagens digitais e reações colorimétricas. As amostras serão analisadas utilizando simples escâneres de mesa e os resultados obtidos serão comparados com os métodos já bem estabelecidos, como a cromatografia e o método titulométrico, por se tratar do método oficial.

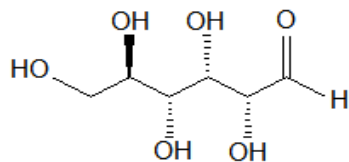
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Açúcares

Açúcar é uma nomenclatura genérica para carboidratos, substâncias bio-orgânicas, que podem ser classificados em duas categorias: carboidratos simples (monossacarídeos) e os carboidratos complexos (dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos) (BRUICE, 2006).

Os monossacarídeos são hidratos de carbono, com a presença de um grupo carbonila em sua cadeia, podendo apresentar função aldeído (aldose) ou cetona (cetose). Em geral, são sólidos cristalinos, solúveis em água e com sabor adocicado. O monossacarídeo mais abundante na natureza é o açúcar de seis carbonos D-glicose, algumas vezes chamado de dextrose. A glicose (Figura 1), $C_6H_{12}O_6$, é considerada a principal aldo-hexose pelo fato de ser a constituinte fundamental do amido, celulose e glicogênio (HORI, 2006).

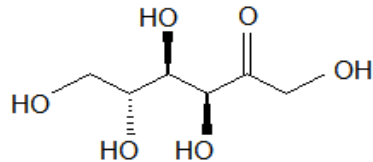
Figura 1 - Representação estrutural da Glicose



Fonte: Autoria Própria (2021)

Outro monossacarídeo bastante importante é a frutose, ou levulose, a qual se diferencia da glicose pelo fato de ser uma molécula cetona, mais especificamente uma ceto-hexose, conforme Figura 2 (HORI, 2006).

Figura 2 - Representação estrutural da Frutose



Fonte: Autoria Própria (2021)

Já os carboidratos complexos contêm duas ou mais unidades de açúcar interligadas. Por exemplo, os dissacarídeos são o produto da condensação de dois monossacarídeos, enquanto que os oligossacarídeos são o produto da condensação de três até dez sub-unidades de monossacarídeos. Já os polissacarídeos são representados pelos grupos que contêm mais de dez monossacarídeos interligados (FRANCISCO JR, 2008).

Entre os carboidratos complexos, a sacarose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, popularmente denominado como açúcar de mesa, é o dissacarídeo mais conhecido. Este açúcar é formado pela união de uma molécula de glicose com uma de frutose (MORRISON; BOYD, 1983).

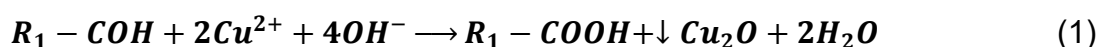
Os açúcares ainda podem ser classificados como açúcares redutores e não redutores. A denominação açúcares redutores é destinada aos monossacarídeos e grande parte dos dissacarídeos, que apresentam um grupo aldeído, cetona, hemicetal ou hemiacetal. Estes açúcares podem ser oxidados, facilmente, por agentes oxidantes como o íon cúprico (Cu^{2+}), que oxida a glicose e outros açúcares a uma complexa mistura de ácidos carboxílicos (FRANCO, et al., 2021). Essa é a base da reação de Fehling, para a detecção da presença de açúcar redutor em solução, que por muitos anos foi utilizado para detectar e dosar níveis elevados de glicose em pessoas com diabetes melito (NELSON; COX, 2014).

Por consequência, os açúcares classificados como não redutores são aqueles que não contêm um átomo de carbono anomérico livre. Um exemplo é a sacarose, molécula em que os carbonos anoméricos de ambas as unidades monossacarídicas estão envolvidos na ligação glicosídica (BRUICE, 2006). No entanto, alguns açúcares não redutores podem originar açúcares redutores após a realização de uma hidrólise com ácido forte ou com o uso de enzimas, como é o caso da sacarose.

2.2 Métodos Quantitativos para análise de açúcares

Ao longo dos anos diferentes técnicas têm sido utilizadas para quantificação de açúcares redutores e/ou totais presentes em diferentes amostras, destacando-se o uso de métodos refratométricos (CALDAS *et al.*, 2015), titulométricos (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008; ALEXANDER; HARTATI; CURTIN, 1989) e espectrofotométricos (LINDSAY, 1973; TOMA; LEUNG, 1987; BASKAN *et al.*, 2016; SHAO; LIN, 2018; LÓPEZ, 2020). Mais recentemente, o uso das técnicas de HPLC-RI (DELGADO *et al.*, 2015; FILIP *et al.*, 2016), NIR, MIR (RECH; WEILER; FERRÃO, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014), Raman (IIASLAN; BOYACI; TOPCU, 2015), LF-NMR (PEREIRA *et al.*, 2013; FLORES *et al.*, 2016), RMN (SANTOS *et al.*, 2016), Eletroforese Capilar (DANIEL, *et al.*, 2018), entre outras, também têm sido utilizadas na quantificação de açúcares em diferentes amostras.

No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz, em seu livro Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008), bem como o MAPA, segundo a portaria nº 76, publicada no Diário Oficial em 26 de novembro de 1986 (BRASIL, 1986), sugerem o método titulométrico de Lane-Eynon como metodologia para a análise quantitativa de açúcares redutores. Esse método é baseado na reação entre os açúcares redutores e a solução de Fehling, a qual pode ser definida como solução alcalina de sulfato de cobre em tampão de tartarato duplo de sódio e potássio. Durante a reação, e sob ação de calor, o íon cúprico (Cu^{2+}) é reduzido a óxido cuproso (Cu_2O), conforme mostra a equação (1).



Sabe-se que a solução inicial apresenta coloração azulada devido a presença de íons cúprico, posteriormente essa coloração é intensificada, devido ao sal formado entre o tartarato de sódio e potássio com o cobre, e após a reação, ocorre a formação de um precipitado avermelhado, proveniente do óxido cuproso. Este método também pode ser utilizado na quantificação de açúcares não redutores, no entanto, é necessária uma hidrólise em meio ácido a fim de promover a dissociação de dissacarídeos em monossacarídeos. A relação de açúcares totais é tratada como a soma dos açúcares redutores com açúcares não-redutores (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

Outros métodos bastante utilizados na determinação de açúcares totais e redutores são os métodos colorimétricos. Dentre eles, destaca-se o método do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), Somogyi-Nelson (SN), Fenol-Sulfúrico e o método Benedict, que originalmente é um método qualitativo, mas tem capacidade para ser adaptado e transformado em quantitativo com pequenas alterações durante a execução do processo.

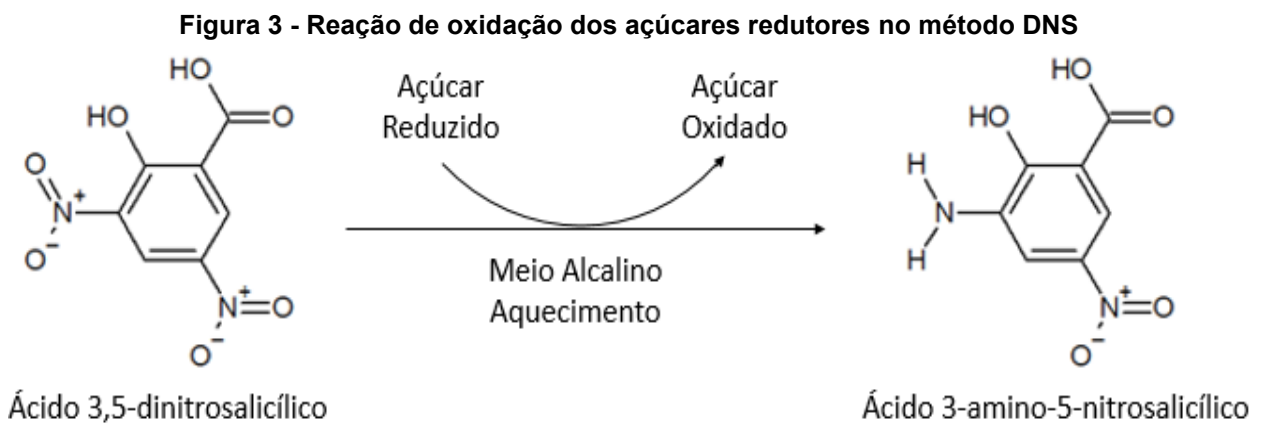
2.2.1 Método DNS

Este método foi descrito primeiramente por Sumner e Graham (1921), com objetivo de avaliar a presença de açúcares redutores (glicose) na urina de pacientes portadores de diabetes. Com o passar dos anos, surgiram algumas variações, destacando-se o método proposto por Miller (1959), o qual vem sendo utilizado nos últimos anos em diferentes aplicações, como na análise de glicose em saliva (MACHADO *et al.*, 2018), na análise de açúcares redutores em amostras de batatas (LINDSAY, 1973), batatas fritas (TOMA; LEUNG, 1987), mel, vinho e medicamentos (NEGRULESCU *et al.*, 2012).

A solução utilizada no método proposto por Miller (1959) é composta por ácido 3,5-dinitrosalicílico, substância que irá sofrer redução por meio do açúcar redutor, formando o 3-amino-5-nitrosalicílico, fenol (utilizado como intensificador de coloração), tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle, que é responsável por dificultar a reação do ácido com o oxigênio dissolvido), hidróxido de sódio (utilizado para auxiliar na

redução e dissolução do ácido 3,5-dinitrosalicílico) e bissulfito de sódio (usado para estabilizar a coloração obtida ao final dos procedimentos).

Neste método, a presença de açúcares redutores é identificada devido a mudança de coloração de amarela, proveniente do DNS, para avermelhado, devido a formação de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. A intensidade da coloração final da solução é proporcional a concentração de açúcares redutores provenientes da amostra. A reação, não estequiométrica, ocorre conforme a Figura 3 (MILLER, 1959).



Fonte: Autoria Própria (2021)

2.2.2 Somogyi-Nelson

O método Somogyi-Nelson (SN), assim como o método DNS, também é utilizado na quantificação de açúcares redutores. Portanto, para a quantificação de açúcares totais é necessário efetuar a conversão de carboidratos mais complexos em monossacarídeos (NIELSEN, 1998).

Este método é similar ao método titulométrico de Lane-Eynon, pois é baseado na redução dos íons de cobre, ou seja, na conversão de Cu^{2+} em Cu^{+} , na forma de Cu_2O . A reação entre o precipitado e o molibdato de arsênio forma um complexo que acaba por liberar Cu^{2+} em solução, que passa a apresentar uma coloração azul-esverdeada característica, e que pode ser quantificada por espectrofotometria (NIELSEN, 1998). Ao término da reação, ocorre o surgimento de uma coloração azulada com intensidade variando de acordo com a concentração de açúcar redutor presente na solução.

(NELSON, 1944). A equação (2) apresenta, de maneira simplificada, as reações envolvidas no método.



Quando comparado com o método DNS, este método apresenta como desvantagem, um maior tempo de análise. No método DNS é necessário aquecer a solução por aproximadamente 5 minutos, enquanto que no método SN este tempo precisa ser de 20 minutos. Além disso, no método SN é utilizado arsênio-molibdato que possui elevada toxicidade. Apesar destas desvantagens, o método continua sendo utilizado e algumas modificações vêm sendo propostas.

2.2.3 Fenol-Sulfúrico

O método fenol-sulfúrico, utilizado na determinação de açúcares totais, é considerado um dos métodos colorimétricos mais rápidos e de simples execução (NIELSEN, 1998). O método baseia-se na desidratação dos açúcares devido a adição de ácido sulfúrico, formando produtos que em contato com o fenol, faz surgir uma coloração amarelo-alaranjada de intensidade proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra (DUBOIS *et al.*, 1956).

Apesar da simplicidade do método, o método apresenta como principal desvantagem o consumo elevado de ácido concentrado e fenol. Segundo o método proposto por Dubois *et al.* (1956), devem ser adicionados a 2 mL da amostra, 0,05 mL de fenol 80% e posterior adição de 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Após descanso de cerca de 10 minutos, a solução deve ser resfriada em água até temperatura ambiente. Os autores destacam, como alternativa ao procedimento anterior, a utilização de 1 a 2 mL da amostra 1 mL de fenol (5%) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, os outros passos, segundo os autores, devem ser mantidos.

2.2.4 Método de Benedict

O método, ou teste, de Benedict (1911) é muito similar ao método titulométrico de Lane-Eynon, pois é baseado na redução dos íons de cobre em solução. No entanto, neste método é utilizada uma solução com carbonato de sódio e citrato de sódio, ao invés de uma solução alcalina de tartarato duplo de sódio e potássio. A mistura entre essa solução e a solução de sulfato de cobre é dado o nome de reagente de Benedict, que, segundo Benedict (1911), é mais sensível e estável que o reagente de Fehling. Para que a reação ocorra 8 gotas da amostra devem ser misturadas com 5 mL do reagente de Benedict, sob aquecimento, durante 5 minutos.

Após resfriamento o teste, que é qualitativo, apresenta variações colorimétricas de acordo com os intervalos de concentração de açúcares, variando de um azul intenso (concentração nula de glicose), passando por tons de verde, amarelo e posteriormente a coloração avermelhada (alta concentração de glicose) devido à presença do óxido de cobre.

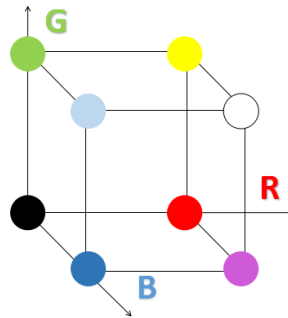
2.3 Análises de imagem digital

As imagens digitais são formadas por uma matriz de m linhas e n colunas, sendo que cada posição contém um valor discreto, denominado de *pixel* (*Picture element*) (GONZALEZ; WOODS, 2008). Pixel é definido como o menor componente de uma imagem digital e, de uma maneira geral, quanto maior a quantidade de pixels presentes na imagem digital, maior será a sua resolução.

A maneira mais comum de extrair informações de uma imagem digital é através da sua decomposição no sistema de cores RGB (abreviatura do inglês *Red* (vermelho), *Green* (verde) e *Blue* (azul)). O sistema RGB usa uma combinação aditiva das cores vermelho, verde e azul para formar uma grande variedade de tonalidades (256^3 possíveis combinações). Cada pixel é formado pela combinação dessas cores e a intensidade de cada cor é medida em canais (256 para cada). O valor de intensidade zero significa completa ausência de uma cor, enquanto o valor 255 indica a máxima intensidade dessa mesma cor. Este modelo de cores pode ser representado por um cubo (Figura 4), onde

três vértices correspondem às cores primárias aditivas, três vértices simbolizam as cores secundárias e os dois restantes são representados pela ausência de cor (cor preta) e a mistura de todas as cores (cor branca) (PRATT, 1991).

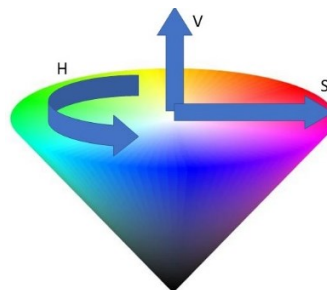
Figura 4 - Representação do cubo RGB no espaço



Fonte: Autoria Própria (2019)

Outro modelo existente, e de grande importância, é o HSI (do inglês, *hue, saturation and intensity*, em português matiz, saturação e brilho) ou HSV (do inglês, *hue, saturation and value*, em português matiz, saturação e valor), representado na Figura 5. Trata-se de um modelo derivado do cubo RGB e baseado, também, no triângulo de Maxwell. Como resultado, tem-se um triângulo, bidimensional, com as cores primárias em seus vértices, e no centro há uma linha conectora entre as cores preta e branca. Dessa forma com a separação da luminosidade na formação do triângulo, torna-se possível a avaliação da saturação “S”. Já a matiz é formada pelo ângulo correspondente a uma revolução a partir da linha traçada do centro até o vértice de coloração vermelha (GONZALEZ; WOODS, 2008).

Figura 5 – Modelo de cores HSV



Fonte: Autoria Própria (2021)

Nos últimos anos, métodos analíticos envolvendo o uso de imagens digitais têm sido propostos para análise de diferentes matrizes. No caso de análise de amostras alimentícias tem-se a quantificação de etanol (BENEDETTI *et al.*, 2015; PESSOA, *et al.*, 2017; BÖCK *et al.*, 2018; CURBANI; GELINSKI; BORGES, 2019; MARINHO *et al.*, 2019), sulfito (BENEDETTI *et al.*, 2015), cobre (PESSOA, *et al.*, 2017), furfural (FRANCO; SUAREZ; SANTOS, 2017), metanol (FRANCO, *et al.*, 2017) e conteúdo fenólico total (LEDESMA; KREPSKY; BORGES, 2019) em bebidas.

Esses métodos também foram aplicados a fim de verificar a adulteração de vinhos envelhecidos (LATORRE, *et al.*, 2019), açaí (ARAÚJO; MARINHO; GOMES, 2017), ketchup (REILE, *et al.*, 2020), derivados de carne branca (FERNANDES *et al.*, 2019), manteiga (WASNIK, *et al.*, 2019) e leite bovino (SANTOS; PEREIRA FILHO, 2013). Determinação de aminoácidos em suplementos (CATELANI, *et al.*, 2019), cafeína em medicamentos e bebidas energéticas (LUCHIARI, *et al.*, 2019), classificação de cachaças de acordo com o tipo de madeira usado no período de envelhecimento (FERNANDES *et al.*, 2019), discriminação de amostras de água com relação aos metais (SHARIATY-RAD; GHORBANI, 2019), méis (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014) e vinhos (LIMA, *et al.*, 2020), de acordo com a origem geográfica, tipo de uva e o fabricante.

Outros trabalhos buscaram a quantificação de corantes em balas (BOTELHO; DANTAS; SENA, 2017; SÁ; FEITEIRA; PACHECO, 2020) e em bebidas não alcoólicas (BOTELHO; ASSIS; SENA, 2014), determinação simultânea de corantes em produtos alimentícios (VIDAL *et al.*, 2018) e de curcumina em açafrão (WONGTHANYAKRAMA; HARFIELD; MASAWATA, 2019). Determinação de iodo em sal de cozinha (COSTA, *et al.*, 2018), ferro (MOHAMED; SHALABY, 2019) e sulfito (SHAHVAR, *et al.*, 2019) em matrizes variadas. Quantificação de ácido ascórbico em sucos de frutas (PORTO *et al.*, 2019) e em frutas amazônicas (SANTOS *et al.*, 2019).

Essa mesma metodologia pode ser aplicada para finalidades diversas, como na determinação de ureia em alimentos para animais (PHONCHAI; RATTANA; THONGPRAJUKAEW, 2020), turbidez (GODOY, *et al.*, 2019) e traços de mercúrio em água (HATIBORUAH, *et al.*, 2020), água em etanol (SHAHVAR, SHAMSAEI, SARAJI, 2020), e qualitativamente em fármacos como o danofloxacin (FANG *et al.*). Os resultados obtidos podem ser analisados através de métodos multivariados ou univariados.

Na literatura também podem ser encontrados exemplos com o objetivo de realizar a quantificação de açúcares. Um procedimento simples foi proposto por Xia *et. al.* (2015) para quantificação de glicose através do uso de microplacas de 96 poços. Para isso, os autores utilizaram o método colorimétrico DNS. Ao término da reação colorimétrica, imagens digitais foram obtidas com auxílio de uma câmera digital. As imagens foram importadas para o MatLab® versão 2014a (MathWorks, Natick, EUA) e os valores de RGB, HSV e HSI foram extraídos. A partir dos resultados, verificou-se que o canal R apresentou uma melhor correlação com a concentração de glicose. Dentre as vantagens apresentadas pelo método, destaca-se a ampla faixa linear (0 – 10 g.L⁻¹), precisão (0,07 g.L⁻¹) e elevada frequência analítica (150 amostras em cerca de 15 min).

Franco *et. al.* (2021) desenvolveram um método para quantificação, por imagens digitais, de açúcares redutores em bebidas alcoólicas não envelhecidas. Tal método baseou-se na reação de redução do cobre, e sua complexação para a formação da Cu(I)-Neocuproína, complexo de coloração amarelo-alaranjada, que foi analisada por um sensor de imagens de um *smartphone*. Para a realização das análises, os autores utilizaram o aplicativo Color Grab da Loomatix®, identificando assim os valores de RGB, sendo o canal azul o mais sensível. A curva analítica foi construída a partir de concentrações de 0,1 g.L⁻¹ até 15 g.L⁻¹, e os limites de quantificação encontrados foram de 0,039 g.L⁻¹ e 0,035 g.L⁻¹, para glicose e frutose, respectivamente. Por fim, os autores concluíram que a presença de açúcares nas cachaças não envelhecidas pode estar relacionada com a adequação das características sensoriais da bebida, fato que visa tornar o produto mais atrativo ao público.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Quantificação de açúcares redutores em amostras alimentícias utilizando como base em métodos colorimétricos simples, DNS e Benedict, aliados a análise por imagens digitais.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a concentração de açúcares redutores em bebidas alcoólicas e não alcoólicas por meio das reações colorimétricas DNS e Benedict;
- b) Validação parcial dos métodos propostos;
- c) Comparação dos resultados obtidos com os métodos propostos com os obtidos com as técnicas de referência (titulométrico e cromatográfico).
- d) Propor um método rápido, de baixo custo, com baixa geração de resíduos utilizando equipamentos de fácil acesso

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

4.1.1 Solução de DNS

O reagente DNS foi preparado de acordo com Miller (1959). Para preparar 50 mL deste reagente, dissolveu-se 1,10 g de NaOH (hidróxido de sódio) em água destilada, e então adicionou 0,32 g de ácido 3,5 dinitro-salicílico sob agitação constante. Feito isso, adicionou-se 9,10 g de tartarato de sódio e potássio (sal de Rochelle) e 0,25 g de bissulfito de sódio. Por fim, 0,25 g de fenol liquefeito juntamente com água destilada foram adicionados até atingir volume final. Como essa solução sofre degradação na presença de luz e CO₂ (dióxido de carbono), ela foi armazenada em frasco âmbar e mantida em um local escuro, a aproximadamente 5 °C, permitindo, dessa forma, sua utilização por períodos superiores a 6 meses sem prejuízo às análises.

Para a construção da curva analítica foi utilizada uma solução estoque de glicose na concentração 1,0 g.L⁻¹, preparada no momento da realização das análises.

4.1.2 Reagentes de Benedict

O reagente de Benedict foi produzido de acordo com a metodologia proposta por López (2020). Tal metodologia propõe que para o preparo de 100 mL do reagente Benedict é necessário 20 g de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) e 10 g de Carbonato de sódio (Na₂CO₃).

Para a construção da curva analítica foi utilizada uma solução estoque de glicose na concentração 10,0 g.L⁻¹, preparada no momento da realização das análises. As soluções de sulfato de cobre (CuSO₄) foram preparadas a partir do sal de sulfato de cobre a uma concentração de 100 g/L.

4.1.3 Amostras

Para a execução deste trabalho foram selecionados seis tipos de amostras, sendo essas bebidas alcoólicas e não alcoólicas como sucos de abacaxi, maçã, maracujá, laranja e tangerina, água de coco e cachaça. Todas as amostras foram adquiridas na cidade de Curitiba-PR. É importante destacar que as embalagens estavam seladas, dentro do prazo de validade e em temperatura ambiente.

4.2 Método DNS

Para a quantificação de açúcares redutores pelo método DNS, adicionou-se o reagente DNS juntamente com a solução padrão de glicose ou da amostra na proporção 1:1. Feito isso, a mistura foi aquecida em banho maria à 100 °C por aproximadamente 5 minutos. Após o aquecimento e resfriamento da solução, o volume deve ser dobrado, pela adição de água destilada, para posterior realização da medição.

4.3 Método Benedict

Para a determinar a concentração de açúcares redutores pelo método Benedict, utilizou-se o procedimento proposto por López (2020) Para isso, utilizou-se uma solução de sulfato de cobre com concentração igual a 25 g L⁻¹ preparada no reagente Benedict. A 1,0 mL desta solução, adicionou-se 0,5 mL do padrão de glicose ou da amostra. A mistura foi aquecida em banho maria à 100 °C por 5 minutos. Após o resfriamento a solução foi centrifugada por 3 minutos a 3500 rpm. Por fim, 1 mL do sobrenadante foi cuidadosamente retirado e diluído na proporção 1:5, seguindo então para a análise.

4.4 Aquisição de imagens digitais

As imagens digitais foram adquiridas utilizando escâner de mesa, modelo Canon® CanoScan LIDE 120.

Para aquisição das imagens no escâner utilizou-se microplacas de poliestireno Kasvi® de 96 poços, com fundo chato e volume aproximado de 0,3 mL. Estas imagens foram obtidas no formato *Joint Photographic Experts Group* (jpg) de 24 bits, com uma resolução de 600 dpi (*dots per inch*). Um anteparo de madeira, similar a um porta-retrato, foi utilizado para impedir a entrada de fontes difusas de iluminação, que não fossem provenientes do escâner, durante o processo de digitalização.

4.5 Análise das imagens digitais

A obtenção dos valores de RGB das imagens obtidas por escâner foi realizada no programa MATLAB®, utilizando rotinas desenvolvidas no laboratório. Para isso, foram importadas para o MATLAB®, as imagens que foram cortadas, em áreas quadrada, de dimensões 28 x 28 *pixels*, as quais buscam representar de maneira efetiva a região central de cada um dos poços presentes nas microplacas

As curvas analíticas, para o método DNS, foram obtidas de modo análogo aquele realizado pelo espectrofotômetro, concentração vs. $-\log(I/I_0)$, onde I_0 é o valor médio do canal R, G ou B do branco, neste caso é a solução de DNS e I é o valor médio do canal R, G ou B para uma dada concentração de analito. Já para o método Benedict, utilizou-se diretamente o valor médio do canal R, G e B vs concentração, devido a linearidade apresentada pelos dados.

4.6 Métodos de referência

Os métodos utilizados como referência foram a cromatografia com o sistema HPLC 1260 Infinity Agilent Detector RID G1362A, com coluna Sugar-Pak 1 de 6,5 x 300 mm e a temperatura da coluna em 90°C, sendo a fase móvel 100% de água ultra pura, e o método titulométrico de Lane-Eynon, conforme instrução normativa descrita pelo MAPA.

4.7 Validação

Os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação foram avaliados durante o processo de validação parcial dos métodos propostos.

A linearidade dos métodos foi avaliada conforme procedimento descrito por SOUZA e JUNQUEIRA (2005). Para este teste, foram preparadas três curvas analíticas, de maneira independente, partindo de um mesmo padrão de glicose. Cada uma das curvas com cinco níveis de concentração (100 – 300 mg L⁻¹ no método DNS e 1 - 5 g L⁻¹ no método Benedict). Os resultados obtidos foram submetidos a testes de verificação de *outliers* (valores dispersos), homoscedasticidade (homogeneidade da variância dos resíduos), independência (autocorrelação de resíduos) e normalidade dos dados e resíduos (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

No presente trabalho, para a análise de *outliers* foi escolhido o teste Jack-Knife (equação 3) (BELSEY; KUH; WELCH, 1980), para a verificação da homoscedasticidade optou-se pelo teste Brown-Forsythe (equação 4) (BROWN; FORSYTHE, 1974), a independência foi verificada pelo teste de Durbin-Watson (equação 5) (DURBIN; WATSON, 1951) e a normalidade analisada com base no teste de Shapiro-Wilk (equação 6) (SHAPIRO; WILK, 1965). Esses testes foram escolhidos pois apresentam resultados consistentes e são amplamente utilizados na literatura.

$$J = \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad (3)$$

sendo n a quantidade de amostras, p o número de parâmetros do modelo e r_i o resíduo padronizado.

$$BF = \frac{\bar{d}_1 - \bar{d}_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} s_p^2}} \quad (4)$$

onde \bar{d}_1 e \bar{d}_2 representam a média dos módulos das diferenças entre os resíduos e a mediana de cada grupo, n é o número de observações em cada grupo e s_p^2 refere-se a variância combinada.

$$DW = \frac{\sum_{t=2}^T (e_t - e_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^T (e_t)^2} \quad (5)$$

em que e são os resíduos obtidos com base no modelo gerado.

$$SW = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

onde x_i são os valores em questão, em ordem crescente, \bar{x} refere-se a média desses valores e a_i são valores tabelados de constantes geradas a partir da média, variância e covariância de n ordens com distribuição normal padrão

A avaliação do ajuste do modelo foi realizada através da análise da variância (ANOVA) da regressão. Na Tabela 1 é apresentado os parâmetros avaliados, onde SQ_{reg} é a soma quadrática da regressão, SQ_r a soma quadrática do resíduo, SQ_{ep} a soma quadrática do erro puro, SQ_{faj} a soma quadrática da falta de ajuste e SQ_T a soma quadrática total.

Tabela 1 - Análise da Variância.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	Fcalc
Modelo	$p - 1$	$SQ_m = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$MQ_m = SQ_m / p - 1$	$F = MQ_m / MQ_r$
Resíduos	$n - p$	$SQ_r = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$MQ_r = SQ_r / n - p$	
Falta de Ajuste	$m - p$	$SQ_{fa} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$MQ_{fa} = SQ_{fa} / m - p$	$F = MQ_{fa} / MQ_{ep}$
Erro Puro	$n - m$	$SQ_{ep} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / n - m$	
Total	$n - 1$	$SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$		

* n = número total de observações, p = número de parâmetros do modelo e m = número de experimentos independentes; \bar{y} = média global, y_i = valor observado e \hat{y}_i = valor previsto

Fonte: Autoria Própria (2021)

4.7.1 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Para o cálculo dos LQ e LD utilizou-se as equações 7 e 8 (BRASIL, 2003) que leva em consideração os parâmetros da curva analítica, ou seja, os valores do coeficiente angular e do desvio padrão do intercepto.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{a} \quad (7)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{a} \quad (8)$$

onde “s” representa o desvio padrão do intercepto (coeficiente linear), e “a” simboliza a inclinação da reta (coeficiente angular).

4.7.2 Exatidão

Para a avaliação da exatidão dois testes foram realizados: i) comparação dos resultados obtidos com método de referência e ii) método de adição e recuperação em dois níveis (50 e 100 mg L⁻¹ para DNS e 1,0 e 2,0 g L⁻¹ para Benedict). Os resultados obtidos foram avaliados em termos do erro relativo (equação 9), teste t pareado (MARINHO et. al.,2019) (equação 10) e porcentagem de recuperação (equação 11).

$$Erro\ Relativo(\%) = \frac{|Valor\ medido - Valor\ de\ referência|}{Valor\ de\ referência} \times 100 \quad (9)$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{d}}{S_d} \times \sqrt{N} \quad (10)$$

em que \bar{d} é a média das diferenças, S_d o desvio padrão das diferenças e N o número de amostras.

$$Rec(\%) = \frac{C_{obs}}{C_{esp}} \times 100 \quad (11)$$

onde $Rec(\%)$ é a recuperação percentual, C_{obs} refere-se à concentração observada e C_{esp} refere-se à concentração esperada.

4.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada a fim de verificar a proximidade entre as medidas realizadas. O parâmetro considerado foi o da repetitividade (BRASIL, 2003), e os resultados obtidos foram analisados de acordo com o desvio padrão relativo (DPR), evidenciado pela equação (12).

$$DPR(\%) = \frac{S_{rec}}{\overline{REC}} \times 100 \quad (12)$$

onde $DPR(\%)$ é o desvio padrão relativo, S_{rec} refere-se ao desvio padrão das recuperações e \overline{REC} refere-se à média das recuperações.

Para este propósito, obteve-se uma sequência de 10 medições em um curto intervalo de tempo, mantendo todas as outras variáveis inalteradas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

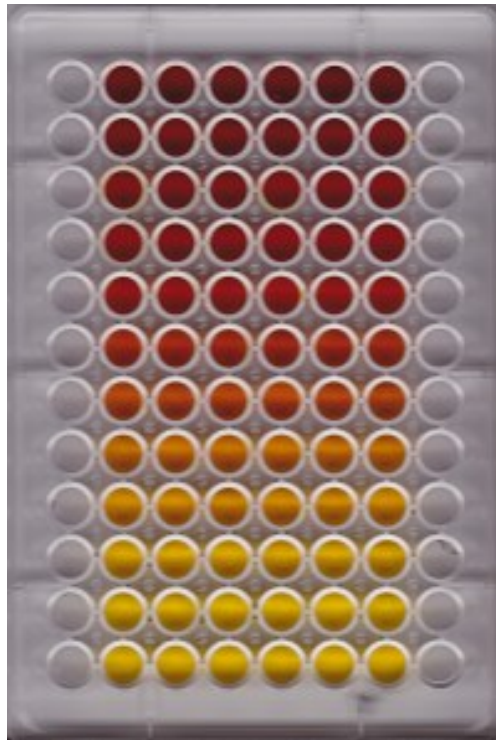
5.1 DNS

5.1.1 Otimização

O procedimento foi otimizado para incrementar as respostas obtidas pelo método univariado, gerar um menor consumo de reagentes, assim como proporcionar uma maior exatidão dos resultados.

Inicialmente, testes foram realizados com os três canais de cores (RGB) com o objetivo de determinar qual apresentava uma resposta linear em relação à concentração de açúcar, bem como a faixa linear. Na Figura 6 é apresentada uma fotografia do sistema contendo soluções de glicose de 25 a 600 mg L⁻¹. Nesta imagem, cada linha corresponde a uma concentração diferente da solução de glicose.

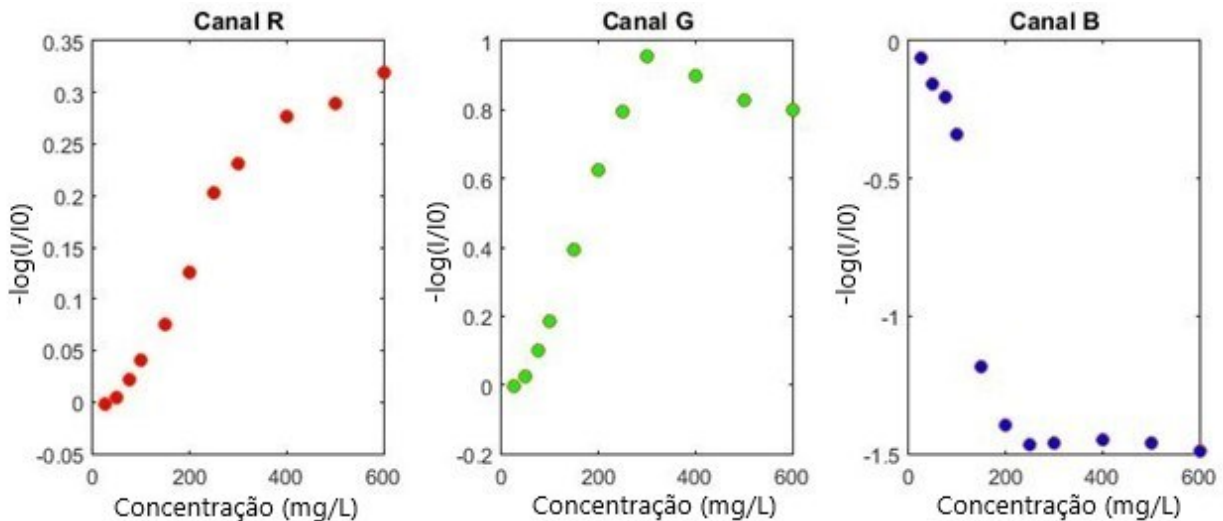
Figura 6 – Fotografia de soluções de glicose na microplaca



Fonte: Autoria própria (2019)

Para determinar qual canal se correlacionava linearmente com a concentração de açúcar, curvas analíticas foram construídas no intervalo de concentração de 25 a 600 mg L⁻¹. Os resultados obtidos para os três canais de cores podem ser visualizados na Figura 7.

Figura 7 – Curvas analíticas para os canais R, G e B obtidas no escâner (DNS)



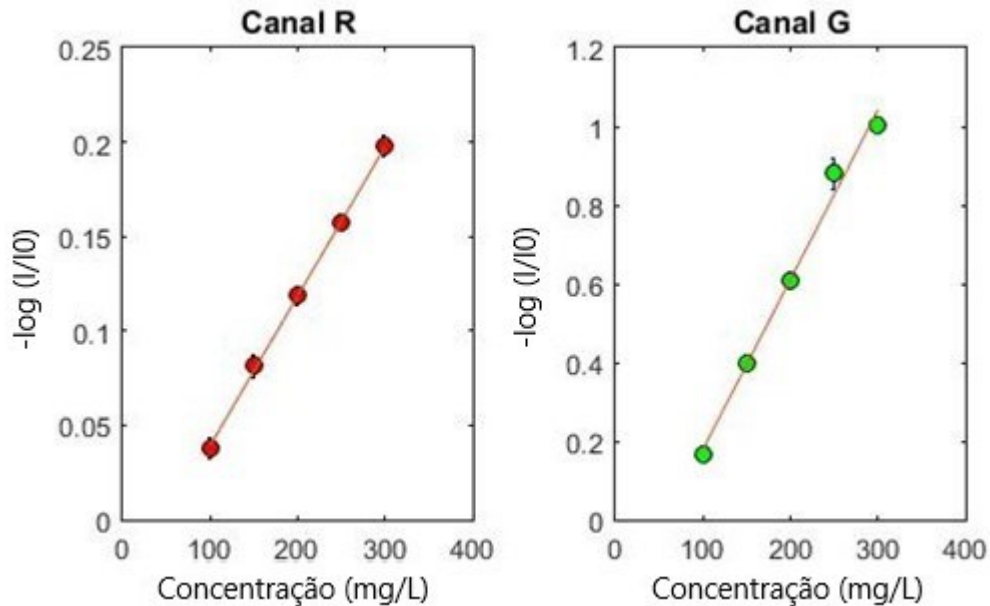
Fonte: Autoria própria (2019)

A partir destes resultados (Figura 7), observou-se que o canal R apresentou uma tendência linear para toda a faixa de concentrações estudada. Já o canal G apresentou uma resposta linear apenas para a faixa de concentração de 100 – 300 mg L⁻¹. E o canal B não apresentou relação constante de linearidade com o aumento da concentração de açúcar, inclusive para as faixas de menor concentração.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 7, novas curvas analíticas foram obtidas para os canais R e G no intervalo de concentrações de 100 a 300 mg L⁻¹. Esta faixa foi escolhida pois é a região na qual o canal G apresenta uma resposta linear, permitindo desta forma uma comparação com o canal R. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 8. Ao comparar os resultados obtidos com os canais R e G, verificou-se que o coeficiente angular obtido para o canal R foi de aproximadamente 0,0008, cinco vezes menor que o obtido com o canal G (coeficiente angular = 0,0040). Como já esperado apenas pela observação do comportamento dos gráficos na Figura 7, optou-se por trabalhar com o canal G devido a sua maior sensibilidade, visto que os testes

e análises só confirmaram a premissa inicial. Além disso, o produto da reação, o 3-amino-5-nitrosalicilato, apresenta uma absorção máxima em aproximadamente 540 nm, que é sobreposta à região espectral coberta pelo canal G do sistema RGB.

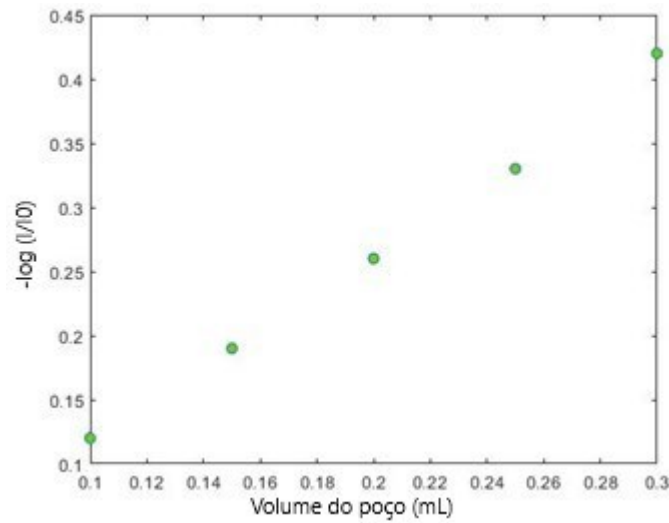
Figura 8 – Curvas analíticas para os canais R e G obtidas no escâner em microplacas na faixa de concentração de 100 a 300 mg L⁻¹ de glicose



Fonte: Autoria própria (2019)

Após a otimização do canal e faixa de trabalho, testes foram realizados com o objetivo de otimizar o recipiente utilizado, volume de amostra e dispositivo utilizado para captura das imagens. Desta forma, análises foram realizadas em microplacas de fundo em “V”, fundo em “U”, bordas pretas. Essas apresentaram interferências na imagem, gerando desvios muito altos. Também foram testadas microplacas de fundo chato com diferente número de poços, as quais não apresentaram nenhum tipo de diferença então optou-se por utilizar a de menor volume, com o objetivo de reduzir a quantidade de reagentes e resíduos. Sendo assim a microplaca de 96 poços e fundo chato foi adotada como padrão para as análises.

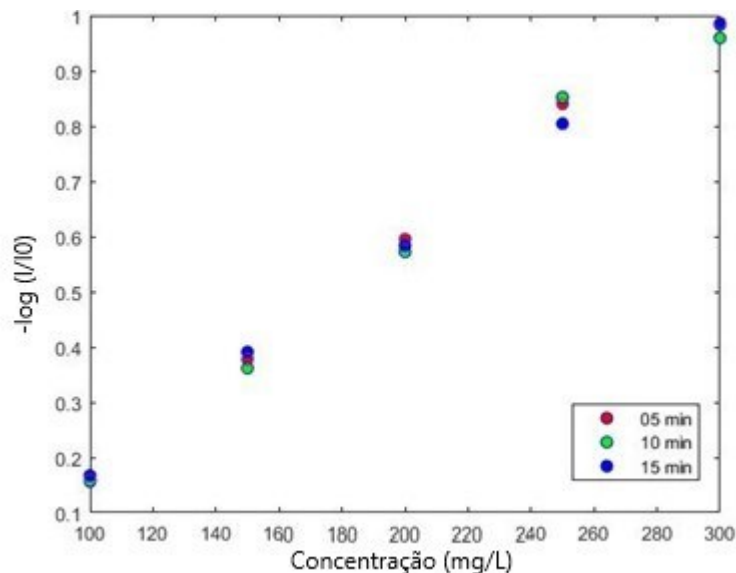
Em seguida, avaliou-se a influência no volume utilizado em cada poço da microplaca. Testes foram realizados com volumes de 0,10 a 0,30 mL, para a concentração de 200 mg L⁻¹ (Figura 9).

Figura 9 – Intensidade do sinal em poços com diferentes volumes (canal G)

Fonte: Autoria própria (2019)

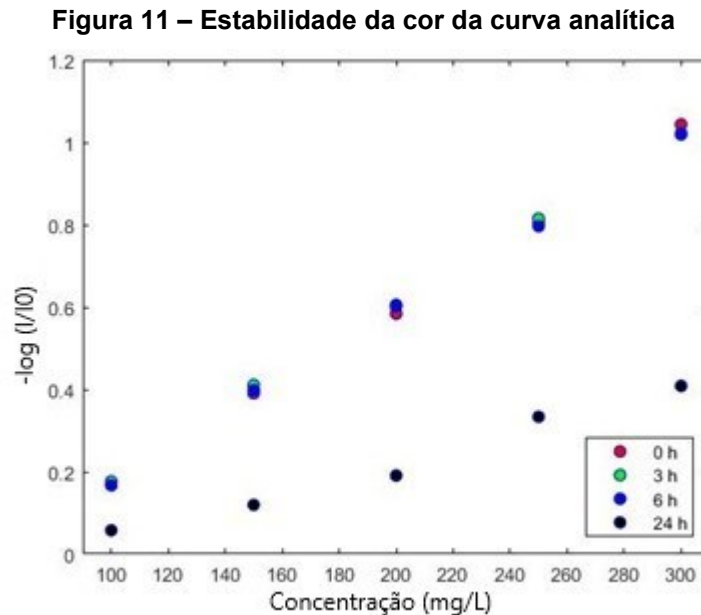
Uma maior intensidade do sinal foi obtida com o volume 0,30 mL. Sendo assim, optou-se por utilizar esse volume para o restante das análises.

O tempo de aquecimento também foi avaliado. Para isso foram construídas 3 curvas as quais ficaram sob aquecimento durante 5, 10 e 15 minutos. A partir dos resultados obtidos (Figura 10) é possível observar a semelhança entre os resultados indicando que com 5 minutos a reação já estaria completa.

Figura 10 – Curvas analíticas com diferentes tempos de aquecimento (Canal G)

Fonte: Autoria própria (2019)

Outro fator analisado durante os experimentos foi a estabilidade da cor. Para este teste, a mesma curva analítica foi analisada em um período de 24 horas. Durante todo esse período, as soluções ficaram expostas a luz e condições ambientes (22 °C). A partir dos resultados obtidos (Figura 11) pode-se afirmar que as amostras podem ser analisadas após 6h sem perda nenhuma de informação, pois além de apresentarem coeficientes angulares muito próximos, todas as curvas possuem coeficientes de determinação superiores a 0,99, e não diferem entre si, em um mesmo nível, com base em um teste t.



Fonte: Autoria própria (2019)

5.1.2 Características analíticas

Utilizando as condições otimizadas, respostas lineares foram obtidas no canal G, na faixa de 100 a 300 mg L⁻¹, descrita pela equação (13), que apresenta coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99.

$$y = 0,0039 \pm 3.10^{-5}x - 0,2650 \pm 0,02 \quad (13)$$

A linearidade do método foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples, na faixa de 100 a 300 mg L⁻¹. Para a detecção de *outliers* os dados foram submetidos ao teste Jack-Knife, não sendo detectada nenhuma amostra anômala. O teste de Durbin-Watson foi aplicado e nenhuma tendência de caráter positivo ou negativo foi detectada, logo é possível afirmar a independência dos resíduos. A homoscedasticidade, por sua vez, foi provada por meio dos testes de Brown-Forsythe, garantido, dessa forma, a adequação do método dos mínimos quadrados ordinários para a realização da regressão linear. E por fim, a normalidade foi assegurada pelo teste de Shapiro-Wilk, após a hipótese nula, que considera a distribuição normal dos dados, não ser rejeitada. Os valores obtidos nos testes citados anteriormente podem ser observados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Compilado dos resultados de testes aplicados

Método	Imagem-Digital	Valores de referência
Teste		
Jack-Knife (<i>J</i>)*	$J = 2,03$	$J < 2,18$
Durbin-Watson (<i>DW</i>)	$DW = 2,23$	$1,23 < DW < 2,77$
Brown-Forsythe (<i>BF</i>)	$BF = 0,87$	$BF < 3,48$
Shapiro-Wilk (<i>SW</i>)	$SW = 0,93$	$SW > 0,881$

*Refere-se ao maior valor encontrado

Fonte: Autoria Própria (2021)

Os resultados obtidos a partir da ANOVA, podem ser vistos, de modo resumido, na Tabela 3 a seguir:

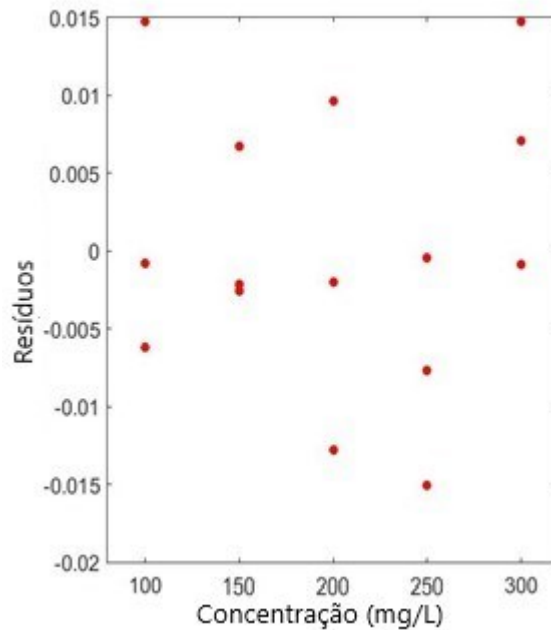
Tabela 3 – Resultados da regressão com base na análise ANOVA (Imagem Digital - DNS)

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	Fcalc
Modelo	1	$SQ_m = 1,14$	$MQ_m = 1,14$	$F = 4077,64$
Resíduos	13	$SQ_r = 3,63 \cdot 10^{-3}$	$MQ_r = 2,80 \cdot 10^{-4}$	
Falta de Ajuste	3	$SQ_{fa} = 1,48 \cdot 10^{-3}$	$MQ_{fa} = 4,95 \cdot 10^{-4}$	$F = 2,30$
Erro Puro	10	$SQ_{ep} = 2,15 \cdot 10^{-3}$	$MQ_{ep} = 2,15 \cdot 10^{-4}$	
Total	14	$SQ_T = 1,14$		

Fonte: Autoria Própria (2021)

Pode se observar, através dos resultados explicitados na Tabela 3, que a regressão linear é significativa ($F_{tabelado} = 4,67$) e que não há falta de ajuste do modelo obtido ($F_{tabelado} = 3,71$). Além disso os resíduos mostraram-se aleatórios, conforme mostra Figura 12.

Figura 12 – Gráficos dos resíduos na medição por imagens digitais (DNS)



Fonte: Autoria Própria (2021)

Para o cálculo do LD e LQ, foram utilizadas as equações (7) e (8) e os resultados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Limites de Detecção e Quantificação (DNS)

Método	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Curva Analítica	14,98	41,34

Fonte: Autoria Própria (2022)

Para a avaliação da exatidão, algumas amostras foram analisadas pelo método proposto e pelo método de referência (Lane-Eynon e cromatográfico). Os resultados obtidos foram comparados considerando o erro relativo percentual, e estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Quantificação de açúcares redutores em amostras

Amostra	DNS (g L ⁻¹)	Método de referência (g L ⁻¹)	Erro Relativo (%)
Água de Coco	52,26±0,78	57,00*	8,30
Suco de Maçã	114,67±1,15	114,00*	0,59
Suco de Tangerina	108,47±2,18	99,00*	9,57
Suco de Laranja	101,11±2,05	102,50*	1,36
Suco de Abacaxi	107,26±3,03	98,50*	8,90
Suco de Maracujá	65,58±0,52	66,50*	1,38
Cachaça	17,63±0,09	17,50**	0,74

*Método Lane-Eynon

**Método cromatográfico

Fonte: Autoria Própria (2022)

Realizando um teste t, com os dados pareados, entre o método proposto e o método titulométrico, a 95% de confiança, verificamos que não existem diferenças significativas entre os métodos aplicados ($t_{\text{calc}} = 0,83$ e $t_{\text{tab}} = 2,57$), logo é possível afirmar que existe equivalência entre o método proposto e o método de referência. Para a comparação da amostra de cachaça foi realizado um teste t comparando as duas médias, sendo assim o t_{tab} (4,30) é maior que o t_{calc} (2,50), reforçando a precisão e exatidão do método visto que a técnica de referência utilizada é bastante eficaz com relação aos resultados apresentados.

Considerando o erro relativo percentual, os resultados de todas as amostras estão dentro do limite aceitável para esta técnica que é de 10%, em módulo, como descrito por Marinho *et. al.* (2019), reforçando o resultado encontrado pelo teste t.

Um ensaio de adição e recuperação foi realizado a fim de confirmar a exatidão do método. Para isso foram adicionadas, nas amostras, alíquotas de um padrão de glicose de 10 g L⁻¹, com volume desprezível. Esta adição foi realizada em dois níveis de concentração (50 e 100 mg L⁻¹) e os resultados obtidos foram adequados e encontram-se entre 97,34% a 102,79% (Tabela 6).

Tabela 6 – Ensaio de Recuperação

Amostra	Concentração Adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração Encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)*
Água de Coco	50	49,86±0,35	99,72
	100	102,79±0,48	102,79
Cachaça	50	49,99±0,46	101,46
	100	102,26±1,06	102,26
Suco de Maçã	50	49,78±1,60	99,56
	100	101,18±1,29	101,18
Suco de Tangerina	50	51,37±0,56	102,76
	100	99,25±1,00	99,25
Suco de Laranja	50	49,99±0,58	99,99
	100	103,42±1,03	103,42
Suco de Abacaxi	50	48,67±0,49	97,34
	100	102,66±0,36	102,66
Suco de Maracujá	50	50,88±0,23	101,76
	100	101,24±0,57	101,24

*Refere-se a média das recuperações

Fonte: Autoria Própria (2022)

Por fim foi analisada a precisão com base na repetitividade. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de Desvio Padrão Relativo

Amostra	Nível de adição	DPR (%)
Água de Coco	Baixo	2,04
	Alto	1,65
Cachaça	Baixo	2,11
	Alto	1,42
Suco de Maçã	Baixo	2,19
	Alto	0,90
Suco de Tangerina	Baixo	1,32
	Alto	1,29
Suco de Laranja	Baixo	1,99
	Alto	2,99

Fonte: Autoria Própria (2022)

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), a precisão do método é verificada quando os valores de DPR são inferiores a 5%. Sendo assim, com base nos dados obtidos, o método proposto pode ser considerado preciso.

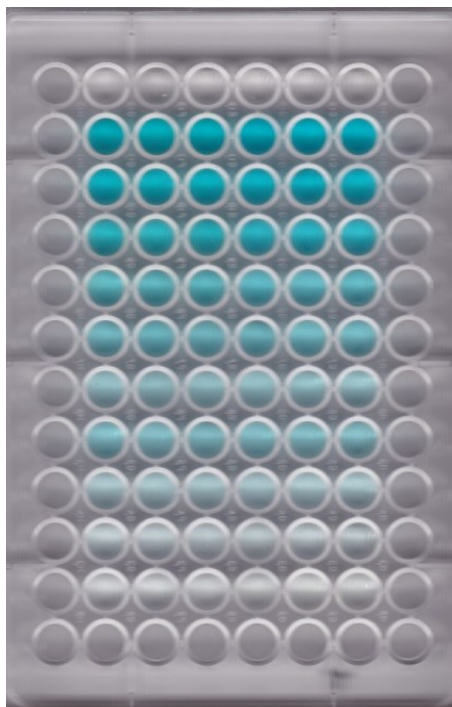
5.2 Benedict

5.2.1 Otimização

Com base nos resultados obtidos anteriormente com o método DNS, optou-se por continuar utilizando as microplacas de 96 poços de fundo chato e um volume de 0,3 mL de solução em cada poço. Para aquisição das imagens, manteve-se o uso do escâner de mesa. Nestas condições, testes foram realizados para determinar qual o canal apresentava uma resposta linear em relação à concentração de açúcares redutores, bem como a faixa linear.

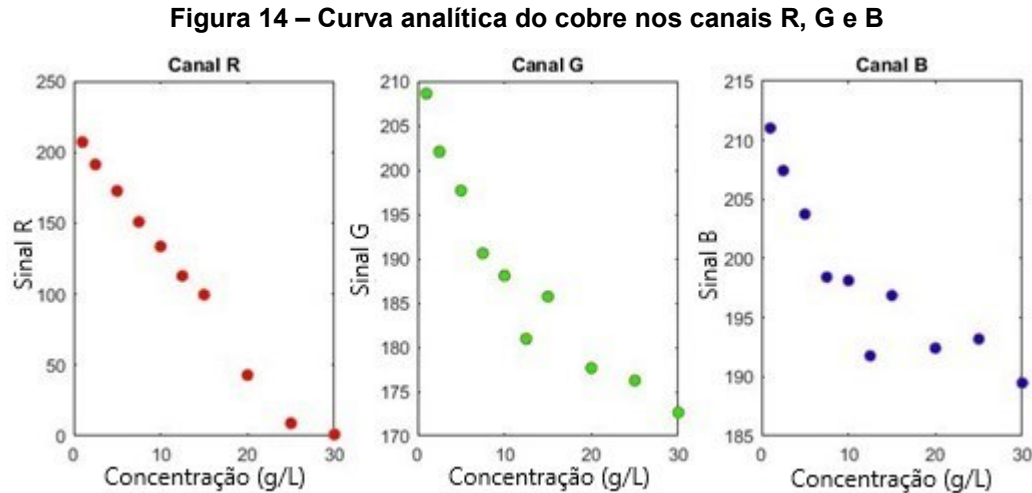
Primeiramente foi construída uma curva de cobre (Figura 13), em diferentes concentrações (1 a 30 g L⁻¹).

Figura 13 – Fotografia de soluções de cobre na microplaca



Fonte: Autoria Própria (2021)

As curvas analíticas podem ser visualizadas na Figura 14, em que se observa que o canal R apresentou uma melhor resposta linear.

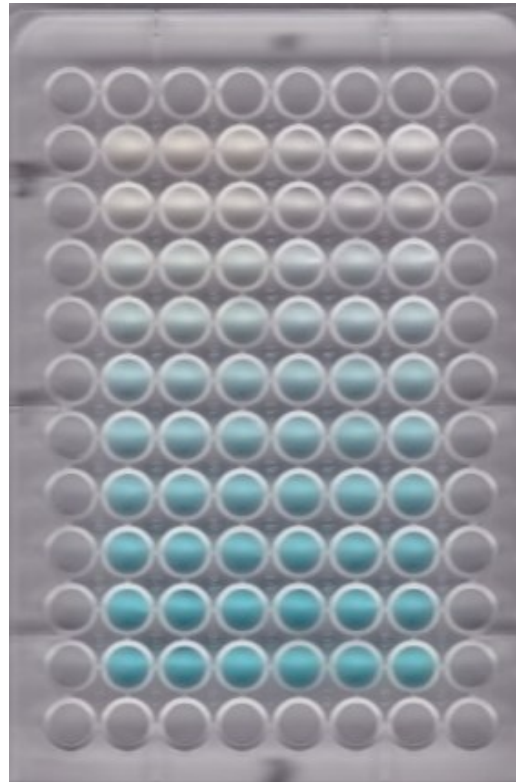


Fonte: Autoria Própria (2021)

O objetivo dessa etapa é determinar a melhor concentração de cobre em solução, para os posteriores testes colorimétricos. E, a partir destes resultados, pode-se concluir que a concentração de cobre a ser utilizada é de 20 g L^{-1} , pois a coloração não é escura o suficiente para gerar grandes e abruptas variações e nem clara demais reduzindo a faixa de descoloração da solução.

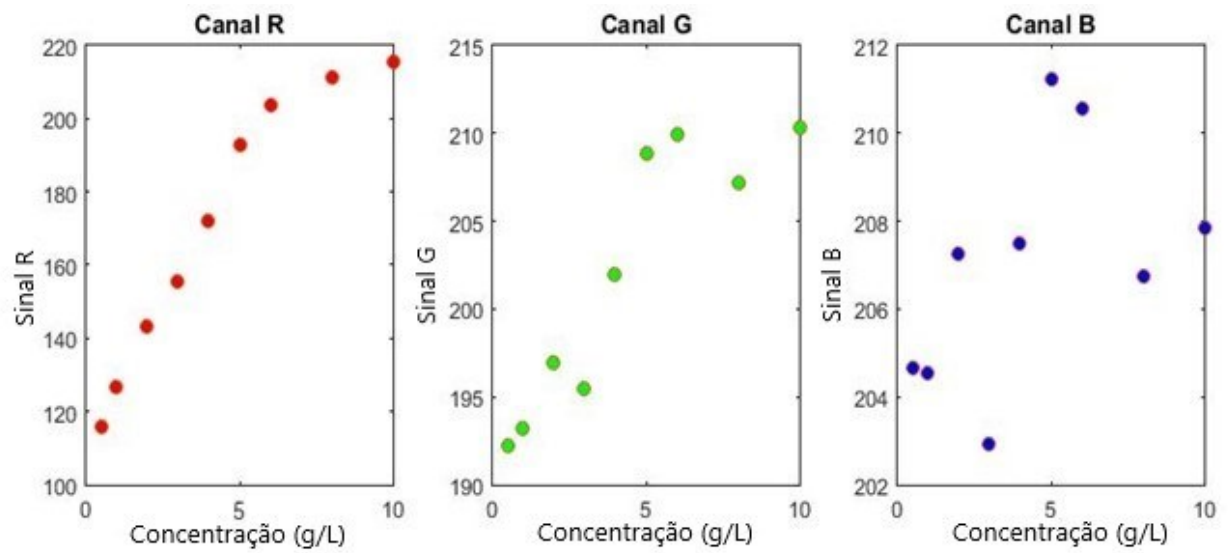
Em seguida, testes foram realizados para determinar a faixa de concentração para quantificação de açúcar. Assim, curvas analíticas foram construídas no intervalo de concentração de $0,5$ a 10 g L^{-1} de glicose, com a concentração de cobre igual a 20 g L^{-1} no reagente de Benedict. Na Figura 15 é apresentado a foto da microplaca de 96 poços com a curva analítica após os procedimentos de aquecimento, resfriamento, centrifugação e diluição. As maiores concentrações de açúcares redutores são as que apresentam menor intensidade da cor azul, devido à baixa concentração de cobre em solução. As curvas analíticas para os canais R, G e B podem ser visualizados na Figura 16 onde é possível observar que o canal R apresenta uma melhor relação linear.

Figura 15 – Fotografia da placa contendo a curva analítica (Benedict)



Fonte: Autoria Própria (2021)

Figura 16 – Curvas analíticas para os canais R, G e B obtidas no escâner (Benedict)

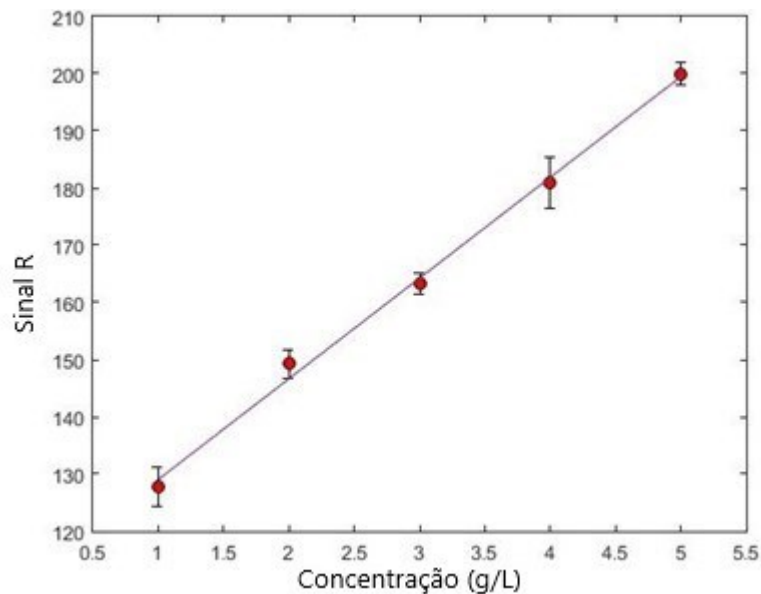


Fonte: Autoria Própria (2021)

5.2.2 Características analíticas

Verificou-se durante as realizações dos testes iniciais que a faixa linear encontra-se no canal R, cor complementar ao azul apresentado pela solução, com concentrações de açúcares redutores variando de 1 a 5 g L⁻¹ (Figura 17). Nesta faixa de concentração, o método apresentou um coeficiente angular de 16,45±0,94, o coeficiente linear 113,13±4,89. O valor encontrado para r² foi igual a 0,99, o que reflete uma boa adequação a linha de regressão ajustada.

Figura 17 – Curva analítica de 1 a 5 g L⁻¹ no canal R (Benedict)



Fonte: Autoria Própria (2021)

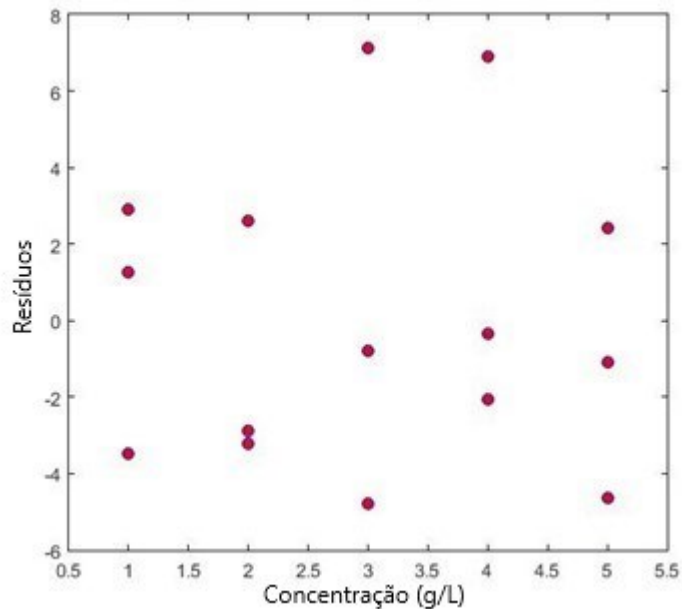
Para confirmar a linearidade do método, os dados foram submetidos ao teste ANOVA e os resultados obtidos podem ser vistos, de modo resumido, na Tabela 8. A partir destes resultados confirma-se que a regressão linear é significativa ($F_{tabelado} = 4,67$) e que não há falta de ajuste do modelo obtido ($F_{tabelado} = 3,71$). Além disso os resíduos mostraram-se aleatórios (Figura 18).

Tabela 8 – Resultados da análise ANOVA com relação a regressão e falta de ajuste (Benedict)

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	Fcalc
Modelo	1	$SQ_m = 8117,09$	$MQ_m = 8117,09$	$F = 522,24$
Resíduos	13	$SQ_r = 202,05$	$MQ_r = 15,54$	
Falta de Ajuste	3	$SQ_{fa} = 15,46$	$MQ_{fa} = 5,15$	$F = 0,28$
Erro Puro	10	$SQ_{ep} = 186,60$	$MQ_{ep} = 18,66$	
Total	14	$SQ_T = 8319,15$		

Fonte: Autoria Própria (2021)

Figura 18 – Gráficos dos resíduos na medição por imagens digitais (Benedict)



Fonte: Autoria Própria (2021)

Para a detecção de outliers, verificação da independência, homoscedasticidade e normalidade dos dados foram utilizados os mesmos testes aplicados na avaliação do modelo DNS. E, assim como no método DNS, todos os resultados dos testes relacionados a linearidade encontram-se dentro dos valores considerados aceitáveis (Tabela 9).

Tabela 9 – Compilado dos resultados de testes aplicados (Benedict)

Método	Imagem-Digital	Valores de referência
Jack-Knife (<i>J</i>)*	$J = 2,09$	$J < 2,18$
Durbin-Watson (<i>DW</i>)	$DW = 2,65$	$1,23 < DW < 2,77$
Brown-Forsythe (<i>BF</i>)	$BF = 0,21$	$BF < 3,48$
Shapiro-Wilk (<i>SW</i>)	$SW = 0,93$	$SW > 0,881$

*Refere-se ao maior valor encontrado

Fonte: Autoria Própria (2021)

Para o cálculo dos LD e LQ foram adotados os mesmos métodos utilizados para o método DNS. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Limites de Detecção e Quantificação (Benedict)

Método	LD (g L ⁻¹)	LQ (g L ⁻¹)
Curva Analítica	0,84	2,52

Fonte: Autoria Própria (2022)

Para a avaliação da exatidão, as amostras que foram analisadas pelo método DNS, também foram analisadas pelo método de Benedict, e comparadas com o método de referência (Lane-Eynon e cromatográfico).

Tabela 11 – Quantificação de açúcares redutores em amostras

Amostra	Benedict (g L ⁻¹)	Método de referência (g L ⁻¹)	Erro Relativo (%)
Água de Coco	53,85±3,50	57,00*	5,53
Suco de Maçã	120,05±0,87	114,00*	5,31
Suco de Tangerina	103,24±5,75	99,00*	4,28
Suco de Laranja	106,61±5,68	102,50*	4,01
Suco de Abacaxi	104,16±4,68	98,50*	5,68
Suco de Maracujá	69,19±4,19	66,50*	4,05
Cachaça	17,68±0,95	17,50**	1,03

*Método Lane-Eynon

**Método cromatográfico

Fonte: Autoria Própria (2022)

Assim como para o método DNS, nenhum dos valores aqui apresentados demonstrou erro relativo percentual superior a 10%, em módulo, descrita como satisfatória por Marinho *et. al.* (2019). Quando aplicado um teste t pareado, a 95% de confiança, verificamos a equivalência entre os métodos de Benedict e titulométrico visto que o t_{tab} (2,57) é maior que o t_{calc} (2,38). Para a cachaça os valores de t_{tab} (4,30) e t_{calc} (0,32), servem para confirmar a boa equivalência do método proposto.

A partir dos testes de adição e recuperação foi possível confirmar a exatidão do método, onde os valores de recuperação ficaram na faixa de 98,14 - 103,13 % (Tabela 12).

Tabela 12 – Ensaio de Recuperação

Amostra	Concentração Adicionada (g L⁻¹)	Concentração Encontrada (g L⁻¹)	Recuperação (%)*
Água de Coco	1,0	1,02±0,02	101,98
	2,0	2,03±0,01	101,33
Cachaça	1,0	1,01±0,01	101,28
	2,0	2,01±0,01	100,50
Suco de Maçã	1,0	1,00±0,02	100,50
	2,0	2,03±0,02	101,71
Suco de Tangerina	1,0	1,00±0,03	100,01
	2,0	2,04±0,02	101,93
Suco de Laranja	1,0	1,00±0,02	99,58
	2,0	2,03±0,01	101,72
Suco de Abacaxi	1,0	0,98±0,03	98,14
	2,0	1,97±0,02	98,55
Suco de Maracujá	1,0	1,03±0,02	103,13
	2,0	1,98±0,01	99,16

*Refere-se a média das recuperações

Fonte: Autoria Própria (2022)

Por fim, analisou-se a precisão com base na repetitividade do método com base no valor do DPR. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 13 e confirmam a precisão do método pois os valores obtidos são inferiores a 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 13 – Valores de Desvio Padrão Relativo

Amostra	Nível de adição	DPR (%)
Água de Coco	Baixo	0,79
	Alto	1,98
Cachaça	Baixo	4,26
	Alto	2,03
Suco de Maçã	Baixo	1,55
	Alto	4,21
Suco de Tangerina	Baixo	1,15
	Alto	2,49
Suco de Laranja	Baixo	1,02
	Alto	3,34

Fonte: Autoria Própria (2022)

5.3 Comparação dos métodos

Para avaliar a semelhança entre os resultados dos diferentes métodos propostos, foi realizada uma comparação entre os valores obtidos pelo método DNS e Benedict. Esses estão dispostos na tabela 14.

Tabela 14 – Quantificação de açúcares redutores em amostras pelo método Benedict e DNS

Amostra	Benedict (g L ⁻¹)	DNS (g L ⁻¹)
Água de Coco	53,85±3,50	52,26±0,78
Suco de Maçã	120,05±0,87	114,67±1,15
Suco de Tangerina	103,24±5,75	108,47±2,18
Suco de Laranja	106,61±5,68	101,11±2,05
Cachaça	17,68±0,68	17,63±0,09
Suco de Abacaxi	104,16±4,68	107,26±3,03
Suco de Maracujá	69,19±4,19	65,58±0,52

Fonte: Autoria Própria (2022)

Segundo o teste t, aplicado com 95% de confiança, os resultados obtidos ($t_{\text{calc}}=0,72$; $t_{\text{tab}}=2,45$) não diferem de modo significativo, pois $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$, ou seja, os métodos podem ser considerados equivalentes.

Com relação a execução dos métodos, o de Benedict é mais laborioso, porém envolve reagentes mais baratos e de menor toxicidade, além de apresentar resultados mais precisos e exatos como já demonstrado no decorrer deste trabalho. Outro ponto positivo a ser destacado no método de Benedict é a necessidade de uma menor diluição, e a faixa do método, que é bem mais ampla quando comparada a do DNS, e quando comparamos parâmetros como LD e LQ o método de Benedict apresenta valores mais críveis, que aqueles apresentados pelo método DNS. A única vantagem a se destacar com relação ao método DNS é o tempo de execução do método.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os métodos propostos podem ser utilizados para quantificação de açúcares redutores em bebidas não alcoólicas e alcoólicas, pois apresentam metodologia acessível e uma alta frequência analítica. Ambos utilizam equipamento de baixo custo (escâner de mesa comercial), apresentam baixo consumo de reagentes e, conseqüentemente, menor geração de resíduos quando comparado com os métodos de referência (titulométrico e cromatográfico). Adicionalmente, os métodos foram parcialmente validados de acordo com guias brasileiros de validação, sendo considerados lineares, como limites de detecção dentro dos valores encontrados em diferentes tipos de bebidas. A exatidão, com base na recuperação, variou próximo aos 100%, sendo o método com Benedict mais exato. A precisão foi efetiva devido ao DPR inferior a 5%.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, P. W.; HARTATI, R. D.; CURTIN, J. **Automated potentiometric end point determination in the Lane-Eynon titration of reducing sugars.**

Electroanalysis, 1: 263-269. 1989.

ARAÚJO, A.; MARINHO, W.; GOMES, A. A. **A fast and inexpensive chemometric-assisted method to identify adulteration in acai (*Euterpe oleracea*) using digital images.** Food Anal. Methods, 11, p. 1920-1926. 2018.

ASADI, M. **Beet-Sugar Handbook.** John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2007.

BASKAN, S.; TÜTEM, E.; AKYÜZ, E.; ÖZEN, S.; APAK, R.; **Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction.** Talanta, 147-162. 2016.

BENEDETTI, L. P. S.; SANTOS, V. B.; SILVA, T. A.; BENEDETTI FILHO, E.; MARTINS, V. L.; FATIBELLO FILHO, O. **A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks.** Anal. Methods 7(10):4138–4144. 2015.

BENEDETTI, L. P. S., SANTOS, V. B., SILVA, T. A., BENEDETTI FILHO, E., MARTINS, V. L., FATIBELLO FILHO, O. **A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages.** Anal. Methods 7:7568–7573. 2015.

BENEDICT, S. R.; OSTERBERG, E. **Determination of sugar in normal urine.** J. Biol. Chem. 34: 195-201. 1918.

BENEDICT, S. R. **A reagent for the detection of reducing sugar. A rapid method for the quantitative determination of sugar in urine.** J. Biol. Chem. 57: 1193-1194. 1911.

BELSEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity.** New York: Wiley. 292 p., 1980.

BÖCK, F. C.; HELFER, G. A.; COSTA, A. B.; DESSUY, M. B.; FERRÃO, M. F. **Rapid determination of ethanol in sugarcane spirit using partial least squares regression embedded in smartphone.** Food Anal. Methods, 11, p. 1951-1957. 2018.

BOTELHO, B. G.; ASSIS, L. P.; SENA, M. M., **Development and Analytical Validation of a Simple Multivariate Calibration Method using Digital Scanner Images for Sunset Yellow Determination in Soft Beverages.** Food Chem., p. 159-175. 2014.

BOTELHO, B. G.; DANTAS, K. C. F.; SENA, M. M. **Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS.** Chem. Intell. Lab. 167:44–49. 2017.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2003.

BRASIL. **Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2017.

BRASIL. **Resolução RDC Nº 429, de 08 de outubro de 2020.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa-IN Nº 75, de 8 de outubro de 2020.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986.** Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. **Robust tests for the equality of variances.** J. Am. Stat. Assoc., v. 69, n. 346, p. 364-367. 1974.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica.** 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall. 2006.

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

CATELANI, T. A.; BITTAR, D. B.; PEZZA L.; PEZZA, H. R. **Determination of amino acids in gym supplements using digital images and paper platform coupled to diffuse reflectance spectroscopy and USB device.** Talanta, v. 196, p. 523–529. 2019.

COSTA, G.; FEITEIRA, F. N.; SCHUENCK, H. M.; PACHECO, W. F. **Iodine determination in table salts by digital images analysis.** Anal. Methods, 10, p. 4463-4470. 2018.

CURBANI, L.; GELINSKI, J. M. L. N.; BORGES, E. M. **Determination of Ethanol in Beers Using a Flatbed Scanner and Automated Digital Image Analysis.** Food Anal. Methods, 13, p. 249–259. 2020.

DANIEL, D., LOPES, F. S., SANTOS, V. B., LAGO, C. L. **Detection of coffee adulteration with soybean and corn by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry.** Food Chem. 15, 243, p. 305-310. 2018.

DELGADO, D. D.; CUENCA, N. C. E.; SANCHÉZ, R. L. P.; KUSHALAPPA, A.; VÁSQUEZ, M. T. **Development and validation of a liquid chromatographic method to quantify sucrose, glucose, and fructose in tubers of Solanum tuberosum.** Group Phureja. J. Chromat. B, 975(0), p. 18-23. 2015.

DOMÍNGUEZ, M. A.; DINÍZ, P. H. G. D.; Di NEZIO, M. S.; ARAÚJO, M. C. U.; CENTURIÓN, M. E. **Geographical origin classification of Argentinean honeys using a digital image-based flow-batch system.** Microchem. J., 112, p. 104-108. 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** Anal. Chem. 28:350-356. 1956.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. **Testing for serial correlation in least squares regression II.** Biometrika, v. 38, n. 1-2, p. 159-178. 1951.

FANG, B.; XU, S.; HUANG, Z.; WANG, S.; CHEN W.; YUAN, M.; HU, S.; PENG, J.; LAI, W. **Glucose oxidase-induced colorimetric immunoassay for qualitative detection of danofloxacin based on iron (II) chelation reaction with phenanthroline.** Food Chem., 328, 127099. 2020.

FERNANDES, D. D. S.; ROMEO, F.; KREPPER, G.; Di NEZIO, M. S.; PISTONESI, M. F.; CENTURIÓN, M. E.; ARAÚJO, M. C. U.; DINIZ, P. H. G. D. **Quantification and identification of adulteration in the fat content of chicken hamburgers using digital images and chemometric tools.** LWT, 02/2019, Vol.100, C, p.20-27. 2019.

FERNANDES, D. D. S.; ALMEIDA, V. E.; FONTES, M. M.; ARAÚJO, M. C. U.; VÉRAS, G.; DINIZ, P. H. G. D. **Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA.** Food Chem., 273: 77–84. 2019.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

FILIP, M.; VLASSA, M.; COMAN, V.; HALMAGYI, A. **Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method.** Food Chem., 199:653–659. 2016.

FLORES, D. W. M.; COLNAGO, L. A.; FERREIRA, M. D.; SPOTO, M. H. F. **Prediction of Orange juice sensorial attributes from intact fruits by TD-NMR.** Microchem J. 128:113–117. 2016.

FRANCISCO JUNIOR, W. E. **Carboidratos: Estrutura Propriedades e Funções.** Química Nova na Escola, n.29, 2008.

FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B. **Digital image method smartphone-based for furfural determination in sugarcane spirits.** Food Anal. Methods, 10, p. 508-515. 2017.

FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; MAIA, M. V.; SANTOS, V. B. **Smartphone application for methanol determination in sugar cane spirits employing digital image-based method.** Food Anal. Methods, 10, p. 2102-2109. 2017.

FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B.; RESQUE, I. S. **A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone.** Food Chem., 338, 127800. 2021.

GODOY, A. C.; NAKANO, A. Y.; SIEPMANN, D. A. B.; SCHNEIDER R.; PFRIMER, F. W. D.; SANTOS, O. O. **Snapshots analyses for turbidity measurements in water.** Water Air Soil Pollut, 229 (12), p. 1–11. 2018.

GONZALEZ, R.C.; WOODS, R.E., **Digital Image Processing.** 3 ed., New Jersey, Pearson Prentice Hall, p.954. 2008.

HATANAKA, C.; KOBARA, Y., **Determination of glucose by a modification of the Somogyi-Nelson method.** *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2943-2949. 1980.

HATIBORUAH, D.; DAS, T.; CHAMUAH, N.; RABHA, D.; TALUKDAR, B.; BORA, U.; AHAMAD, K. U.; NATH, P. **Estimation of trace-mercury concentration in water using a smartphone.** *Measurement*, 154, 107507. 2020.

HORI, J. **Bioquímica.** 1 ed. Rio de Janeiro: SESES. 2015.

IISLAN K.; BOYACI I. H.; TOPCU A. **Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy.** *Food Control* 48:56–61. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos,** DOQ-CGCRE-008. 2003.

LATORRE, C. H.; GARCÍA, J. B.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. **Detection and quantification of adulterations in aged wine using RGB digital images combined with multivariate chemometric techniques.** *Food Chem. X.*, 3, 100046. 2019.

LEDESMA, C. M.; KREPSKY, L. M.; BORGES, E. M. **Using a Flatbed Scanner and Automated Digital Image Analysis to Determine the Total Phenolic Content in Beer.** *J. Chem. Educ.*, 96 (10), p. 2315– 2321. 2019.

LI, Y.; MEHTA, R.; MESSING, J. **A new high throughput assay for determining soluble sugar in sorghum internode-extracted juice.** *Planta*. 248:785. 2018.

LIMA, C. M.; FERNANDES, D. D. S.; PEREIRA, G. E.; GOMES, A. A.; ARAÚJO, M. C. U.; DINIZ, P. H. G. D. **Digital image-based tracing of geographic origin, winemaker, and grape type for red wine authentication.** *Food Chem.* 312:126060. 2020.

LINDSAY, H. **A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid.** *Potato Res.* 16: 176-179. 1973.

LÓPEZ, A. H.; FÉLIX, D. A. S.; SIERRA, Z. Z.; BRAVO, I. G.; DINKOVA, T. D.; ALEJANDRE, A. X. A. **Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict.** *ACS Omega*, 5, 32403-32410. 2020.

LUCHIARI, N. C.; SILVA, G. A.; JÚNIOR, C. A. M.; GOMES, P. C. F. L. **Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone.** RSC Advances, 9 (60), 35033-35038. 2019.

MACHADO, A.; MANEIRAS, R.; BORDALO, A. B.; MESQUITA, R. B. R. **Monitoring glucose, calcium, and magnesium levels in saliva as a non-invasive analysis by sequential injection multi-parametric determination.** Talanta. v. 186, p. 192-199. 2018.

MARINHO, O. R.; LIMA, M. J. A.; ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F., KAMOGAWA, M. Y. **A greener, fast, and cost-effective smartphone-based digital image procedure for quantification of ethanol in distilled beverages.** Microchem. J., 147: 437-443. 2019.

MCINTYRE, A. P.; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. **Reducing values: Dinitrosalicylate gives over-oxidation and invalid results whereas copper bicinchoninate gives no over-oxidation and valid results.** Carbohydr. Res., 380, 118–123. 2013.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Anal. Chem., Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428, Mar. 1959.

MOHAMED, A. A.; SHALABY, A. A. **Digital imaging devices as sensors for iron determination.** Food Chem., 274, p. 360-367. 2019.

MORRISON, R. T.; BOYD R. N. **Química Orgânica.** 2 ed. New York University. Fundo Educativo Interamericano. 1983.

NEGRULESCU, A.; PATRUELA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. **Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating.** J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, Dec. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 6 ed. p. 1292. Porto Alegre: Artmed. 2014.

NELSON, N. A. **Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose.** J. Biol. Chem., v. 153, p.375-380. 1944.

NIELSEN, S. S., Ed., **Food Analysis.** 2 ed., Aspen Publ., Gaithersburg, p. 630. 1998.

- OLIVEIRA, G. A.; CASTILHOS, F.; RENARD, C. M. G. C.; BUREAU, S. **Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit.** Food Res. Int., 60, p. 154-162. 2014.
- PEREIRA, F. M. V.; CARVALHO, A. D. S.; CABEÇA, L. F.; COLNAGO, L. A. **Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics.** Microchem. J. 108, 14–17. 2013.
- PESSOA, K. D.; SUAREZ, W. T.; LOPES, R. P.; DOS REIS, M. F.; FRANCO, M. DE O. K.; DOS SANTOS, V. B. **Development and validation of analytical methodology based on digital images of spot tests for determination of ethanol in cachaça.** J. Eng. and Exact Sci., v. 3, n. 7, p. 0995-1010. 2017.
- PESSOA, K. D.; SUAREZ, M. F. R.; OLIVEIRA, K. M. F.; MOREIRA, R. P. L.; SANTOS, V. B. **A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits.** Spectrochim. Acta Part A – Molec. and Biomolec. Spec., 185, p. 310-316. 2017.
- PHONCHAI, A.; RATTANA, S.; THONGPRAJUKAEW, K. **A portable sol-gel urea colorimetric method for the determination of urea in feedstuffs.** Food Chem., 319, 126545. 2020.
- PORTO, I. S. A.; NETO, J. H. S.; SANTOS, L. O.; GOMES, A. A.; FERREIRA, S. L. C. **Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry.** Microchem. J. 149, 104031. 2019.
- PRATT, W. K. **Digital Image Processing.** Wiley Interscience, 2 ed. 1991.
- RECH, A. M.; WEILER, F. H.; FERRÃO, M. F. **Determination of Total Sugar Content in Soy-Based Drinks Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics.** Food Anal. Methods, 11: 1986-1993. 2018.
- REILE, G. C.; RODRÍGUEZ, M. S.; FERNANDES, D. D. S.; GOMES, A. A.; DINIZ, P. H. G. D.; ANIBAL, C. V. **Qualitative and quantitative analysis based on digital images to determine the adulteration of ketchup samples with Sudan I dye.** Food chem., 328, 127101. 2020.

SÁ, I. C.; FEITEIRA, F. N.; PACHECO, W. F. **Quantification of the Food Dye Indigo Carmine in Candies Using Digital Image Analysis in a Polyurethane Foam Support.** *Food Anal. Methods*, 13:962–969. 2020.

SANTOS, P. M.; PEREIRA FILHO, E. R. **Digital image analysis – An alternative tool for monitoring milk authenticity.** *Anal. Methods*, 5, p. 3669-3674. 2013.

SANTOS, V. B.; SILVA E. K. N.; OLIVEIRA, L. M. A.; SUAREZ, W. T. **Low cost *in situ* digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits.** *Food Chem.* 285:340–346. 2019.

SANTOS, V. B., VIDAL, D. T. R., FRANCISCO, K. J. M., DUCATI, L. C., LAGO, C. L. **Formation of isomers of anionic hemiesters of sugars and carbonic acid in aqueous medium.** *Carbohydr. Res.*, 16;428, p. 18-22. 2016.

SHAHVAR, A.; SARAJI, M.; GORDAN, H.; SHAMSAEI, D. **Combination of paper-based thin film microextraction with smartphone-based sensing for sulfite assay in food samples.** *Talanta*, 197, p. 578-583. 2019.

SHAHVAR, A.; SHAMSAEI, D.; SARAJI, M. **A portable smartphone-based colorimetric sensor for rapid determination of water content in ethanol.** *Measurement*, 150, 107068. 2020.

SHAO, Y.; LIN, A. H. M. **Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate.** *Food Chem.* 240:898–903. 2018.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. **An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples).** *Biometrika*, 52, p. 591-611. 1965.

SHARIATI-RAD, M.; GHORBANI, Z. **Carbon dot-based colorimetric sensor array for the discrimination of different water samples.** *Anal. Methods*, 11, 5584–5590. 2019.

SILVA, A. F. S.; GONÇALVES, I. C.; ROCHA, F. R. P. **Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant.** *Food Control*, v. 125, p. 107956. 2021.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. **A procedure to assess linearity by ordinary least squares method.** Anal. Chim. Acta, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

SUMNER, J. B.; GRAHAM, V. A. **Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine.** J. Biol. Chem., v. 47, n.1, p. 5-9. 1921.

TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; LEITÃO, V. S. F.; BON, E. P. S. **Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements.** Carbohydr. Res., 363, p. 33-37. 2012.

TOMA, R. B.; LEUNG H. K. **Determination of reducing sugars in French fried potatoes by 3,5- dinitrosalicylic acid.** Food Chem. 29-33. 1987.

VIDAL, M.; ARRONA, R. G.; BORDAGARAY, A.; OSTRÁ, M.; ALBIZU G. **Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis.** Talanta. 184, p. 58-64. 2018.

WASNIK, P. G.; MENON, R. R.; SURENDRA, N. B.; BALASUBRAMANYAM, B. V.; MANJUNATHA, M.; SIVARAM, M. **Development of mathematical model for prediction of adulteration levels of cow ghee with vegetable fat using image analysis.** J. Food Sci. Technol., 55, p. 2320–2325. 2019.

WONGTHANYAKRAM, J.; HARFIELD, A.; MASAWAT, P. **A smart device-based digital image colorimetry for immediate and simultaneous determination of curcumin in turmeric.** Comp. and Elect. in Agric., 166, 104981. 2019.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 p. 2008.

