

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

INÊS LUCIANE SNAIDER LAU

**ESTUDOS PRELIMINARES PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES
REDUTORES POR MÉTODO ALTERNATIVO UTILIZANDO SMARTPHONE
E ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

IRATI

2024

INÊS LUCIANE SNAIDER LAU

**ESTUDOS PRELIMINARES PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES
REDUTORES POR MÉTODO ALTERNATIVO UTILIZANDO SMARTPHONE
E ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura em
Química do Instituto Federal do Paraná,
Campus Irati.

Orientador: Profa. Dr^a Kristiany Moreira
Diniz

Co-orientadora: Dr^a Juliana Pinto
Viecheneski

IRATI, 2024



INSTITUTO FEDERAL
Paraná

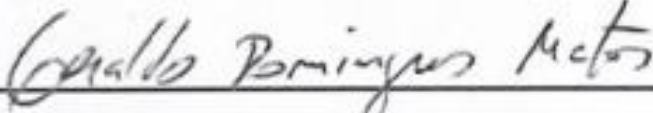


Ministério da Educação

INÊS LUCIANE SNAIDER LAU

**ESTUDOS PRELIMINARES PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES
REDUTORES POR MÉTODO ALTERNATIVO UTILIZANDO SMARTPHONE E
ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

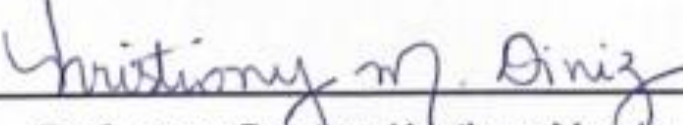
TRABALHO APROVADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE LICENCIADO EM
QUÍMICA, AO CURSO SUPERIOR DE
LICENCIATURA EM QUÍMICA, DO INSTITUTO
FEDERAL DO PARANÁ, AVALIADO PELA SEGUINTE
BANCA EXAMINADORA:



Professor Doutor Geraldo Dominques Matos



Professora Doutora Michele Aparecida Besten



Professora Doutora Kristiany Moreira Diniz

IRATI, 2024

Dedico este trabalho aos membros da minha família, cujo apoio emocional e financeiro foram fundamentais. Dedico também, este trabalho aos meus amigos, pela presença constante, incentivo, apoio e colaboração, que foram essenciais na concretização deste sonho. Sem a presença de vocês, não teria alcançado este ponto.

AGRADECIMENTO

Expresso minha profunda gratidão a Deus por permitir que eu alcance este momento. Agradeço à minha família, em especial ao meu esposo Anderson, pela constante demonstração de amor e paciência, e aos meus filhos João, Júlia e Jackson, que se tornaram minha prioridade. Estendo meus agradecimentos aos meus irmãos Augusto, Nelson, Davi, e aos demais parentes, por acreditarem e apoiarem minha jornada até aqui.

Às amigadas que se tornaram fonte de risos e incentivo pessoal, agradeço pelos momentos de alegria e pelas superações compartilhadas. Vocês foram um apoio valioso, contribuindo significativamente para o meu crescimento emocional e para a construção de histórias que, sem dúvida, me tornaram uma pessoa mais feliz.

Agradeço ao professor Matheus da Silva Pinto, da Concordia University, pela elaboração do desenho de impressão 3D.

À minha orientadora, Professora Kristiany Moreira Diniz, e à co-orientadora, Professora Juliana Pinto Viecheneski, expresso minha gratidão pelos ensinamentos e pela colaboração na realização deste trabalho. A paciência e a crença em meu potencial foram fundamentais.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste sonho. O apoio de cada um foi essencial nessa jornada.

RESUMO

Os monossacarídeos, glicose (dextrose) e frutose são exemplos de açúcares redutores por possuírem grupos carbonílicos e cetônicos, capazes de se oxidarem. O reagente de Benedict é conhecido na literatura por promover uma mudança de coloração do azul para o vermelho na presença de açúcares redutores, e devido a esta propriedade visual, esta metodologia foi utilizada neste trabalho. Como estudo inicial na determinação de açúcares redutores por Espectrofotometria de UV-Vis, foi realizada uma varredura de 200 e 800 nm, cuja banda de maior absorbância foi obtida em 300 nm. Este comprimento de onda foi selecionado para otimização dos principais parâmetros que afetaram a reação, empregando o planejamento Box-Behnken, incluindo três fatores (concentração de Benedict, tempo da reação e tempo de centrifugação). Para a reação, foram utilizados 3,0 mL de dextrose $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, 1,0 mL do reativo de Benedict, em banho de aquecimento a 90°C , seguido de centrifugação a 3200 rpm. Os dados experimentais adequaram-se ao modelo estatístico com 95% de confiança, e as condições otimizadas foram a concentração do reagente de Benedict com a diluição 1/45; tempo de reação e centrifugação, ambos em 10 minutos. Paralelamente a este estudo foi confeccionado um espectrômetro alternativo através de impressão 3D, acoplado a uma câmera endoscópica conectada a um *smartphone* com o aplicativo Photometrix-UVC®, o qual permitiu a construção de uma curva de calibração e determinação de açúcares redutores em amostras de bebidas não alcoólicas, por meio de análises de imagens digitais (cor da solução). As análises comparativas demonstraram que o espectrofotômetro com impressão 3D apresentou desempenho comparável ao instrumento convencional em termos de precisão e sensibilidade, podendo ser utilizado como alternativa didática e em laboratórios que não possuem tal equipamento.

Palavras-chave: Quimiometria. Benedict. Box-Behnken. Impressão 3D.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	10
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1 Os açúcares.....	10
3.2 Espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis.....	13
3.3 Espectrofotômetro alternativo e o uso de smartphones para análises químicas ...	15
3.4 Quimiometria e o planejamento multivariado de experimentos.....	17
4. EXPERIMENTAL.....	19
4.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	19
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES.....	20
4.3 Otimização da determinação dos íons Cu^{2+} em Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-Vis.....	21
4.4 Confecção de um espectrofotômetro alternativo.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Determinação do comprimento de onda dos íons Cu^{2+} em Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-Vis.....	27
5.2 Otimização preliminar multivariada Box - Behnken da identificação de açúcares redutores no Espectrofotômetro de UV-Vis.....	29
5.3 Confecção do espectrofotômetro alternativo.....	33
5.4 Medidas no espectrofotômetro alternativo de impressão 3D.....	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8. ANEXO.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os açúcares são compostos orgânicos encontrados em muitos alimentos e bebidas, conhecidos por conferirem sabor doce, o que os torna um ingrediente popular em muitas receitas culinárias. O açúcar está presente em uma grande variedade de alimentos, como frutas, legumes e grãos, sendo a forma mais comum de açúcar, a sacarose. Outros tipos de açúcares incluem a frutose encontrada em frutas e mel, e a lactose, encontrada no leite. Os açúcares podem ser facilmente digeridos e convertidos em energia pelo corpo humano. No entanto, o consumo excessivo de açúcares pode levar a problemas de saúde, como cáries dentárias, obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. A quantificação de açúcar em produtos alimentícios é uma questão de grande importância, tanto para os fabricantes quanto para os consumidores, pois o açúcar é um ingrediente amplamente utilizado na indústria alimentícia (CRUZ; SARTI, 2011).

Existem vários métodos analíticos disponíveis para a quantificação de açúcar em amostras de alimentos. Esses métodos podem ser categorizados em métodos físicos e químicos. Os métodos físicos são baseados nas propriedades físicas do açúcar e incluem polarimetria, refratometria e densitometria. A polarimetria é um método que mede a rotação do plano de polarização da luz polarizada quando passa por uma solução de açúcar. A refratometria é um método que mede a mudança na direção da luz quando ela passa por uma solução de açúcar devido à refratividade da solução. Já a densitometria mede a densidade óptica de uma solução de açúcar (CALDAS, 2015).

Os métodos químicos incluem titulação, cromatografia e espectroscopia. Titulação é um método que envolve a adição progressiva de um reagente a uma solução de açúcar até que toda a quantidade de açúcar tenha reagido. Cromatografia é um método que separa os componentes de uma solução com base em suas propriedades químicas e físicas, pode em alguns casos fazer a

medida da quantidade de açúcar presente em cada componente separado. A Espectroscopia emprega a luz na forma de energia para examinar a composição, estrutura e propriedades da matéria. Originando-se do termo latino "spectrum", que se traduz como imagem ou aparição, esse conceito teve início na observação da dispersão da luz visível por um prisma. Atualmente, a Espectroscopia abrange uma ampla gama de interações entre radiação e matéria (NIXDORF, 2015).

Cada método possui vantagens e limitações. Por exemplo, a polarimetria é um método simples e rápido, mas a presença de outros componentes em uma amostra pode interferir na precisão da medição. A cromatografia e a espectroscopia são métodos instrumentais mais precisos, no entanto, apresentam uma execução mais complexa e podem ser mais demorados. Portanto, a escolha do método depende das necessidades de quantificação de açúcares nas amostras e dos recursos disponíveis. Além disso, outras técnicas analíticas também podem ser utilizadas, como a espectrometria de infravermelho na região próximo (NIR) (780nm a 2500nm) e médio (MIR, Mid-infrared) (2500 nm a 5000 nm) (RECH; WEILER; FERRÃO, 2018; OLIVEIRA et al., 2014), Raman (IIASLAN; BOYACI; TOPCU, 2015), e a ressonância magnética nuclear de baixo campo (LF-NMR, Low-Field Nuclear Magnetic Resonance) (PEREIRA et al., 2013; FLORES et al., 2016) são técnicas mais recentes e promissoras para a análise de açúcares em alimentos. A espectrometria de NIR e MIR, em particular, não são destrutivas e rápidas, possibilitando a análise de grandes quantidades de amostras em pouco tempo.

Dentre essas técnicas instrumentais, a espectrofotometria no UV-Vis e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), são técnicas que podem ser encontradas com frequência na literatura para a determinação de açúcares redutores. Além disso, a combinação por exemplo do HPLC com diferentes

detectores, como espectrometria de massas, também pode ser útil na análise de açúcares em alimentos (KURZYNAS-ZKLAREK, CYBULSKA ; ZDUNEK, 2022).

A quantificação de açúcar em produtos alimentícios é muito relevante e embora existam diversas metodologias eficientes e precisas para a determinação de açúcares, a espectrofotometria de UV-Vis é frequentemente encontrada em diversos laboratórios devido ao seu custo mais acessível em comparação com a HPLC. Além disso, propostas de metodologias alternativas, com o uso de aplicativos em smartphones para análise de imagens digitais, têm ganhado destaque na literatura para a determinação de diversos tipos de moléculas, incluindo os açúcares redutores. A combinação dessas abordagens torna-se cada vez mais explorada devido à sua praticidade e acessibilidade (SHIBUKAWA *et al* 2016).

2. OBJETIVO

Desenvolver metodologia analítica alternativa para determinação de açúcares redutores em amostras de bebidas não alcoólicas por meio de ferramentas quimiométricas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia analítica alternativa para a quantificação de açúcares redutores, baseada no uso de *smartphones* e tratamento de imagens digitais (cor da solução);
- Verificar as condições experimentais propostas para a reação de açúcares redutores com o reagente de Benedict com a espectrofotometria de UV-Vis;
- Fazer a impressão 3D de uma caixa para a construção de um espectrofotômetro alternativo;
- Utilizar ferramentas quimiométricas para planejar e otimizar os experimentos;
- Avaliar os resultados obtidos durante as análises experimentais e/ou dados teóricos e comparar com valores rotulados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os açúcares

O açúcar é uma substância amplamente consumida em todo o mundo, utilizado como adoçante em bebidas e alimentos diversos. No entanto, essa nomenclatura genérica refere-se a uma variedade de carboidratos, que podem ser encontrados em diferentes tipos, desde carboidratos simples até complexos. Os carboidratos simples, ou monossacarídeos, são os açúcares mais básicos, como a glicose e a frutose. Já os carboidratos complexos, que incluem os dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, são compostos por mais de uma molécula de açúcar e têm maior complexidade na sua estrutura. O conhecimento da classificação dos açúcares se faz importante para entender a sua presença nos alimentos e os seus efeitos na saúde (BRUICE, 2006).

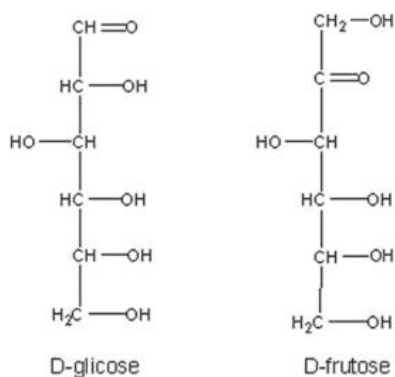
Os monossacarídeos são componentes fundamentais na composição dos carboidratos, sendo formados por uma cadeia de carbono com um grupo carbonila. Dependendo da posição deste grupo, podemos classificá-los como aldose ou cetose. São sólidos cristalinos, solúveis em água e possuem sabor adocicado. Um exemplo comum de monossacarídeo é a glicose, açúcar de seis carbonos, que é a principal aldo-hexose encontrada na natureza. Sua importância se dá pelo fato de servir como constituinte fundamental de diversas estruturas como o amido, celulose e glicogênio. Conhecer as características dos monossacarídeos é fundamental para entender sua relevância e papel na composição de diversos organismos (HORI, 2015).

O açúcar das frutas é metabolizado no fígado, onde é convertida em glicose-6-fosfato e outras moléculas intermediárias que participam da produção de energia. Por essa razão, a frutose é uma importante fonte de energia para o cérebro e outras células do corpo que não podem utilizar gorduras ou proteínas

como fonte de energia. No entanto, o consumo excessivo de frutose pode ser prejudicial à saúde, pois ela é rapidamente absorvida pelo intestino e pode causar picos de glicemia que sobrecarregam o pâncreas e podem levar à resistência à insulina. Além disso, a frutose é metabolizada de forma diferente da glicose e pode levar ao acúmulo de gordura no fígado e outras complicações metabólicas (NIELSEN, 2010).

A frutose e a glicose são monossacarídeos considerados açúcares redutores que tem grande importância no organismo humano, pois são fonte de energia para as células. Essas moléculas são consideradas açúcares redutores por possuírem grupos carbonílicos e cetônicos, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (ASQUIERE *et al* 2003). Uma das principais diferenças entre a frutose e a glicose é que a primeira é uma cetose, ou seja, apresenta um grupo carbonila ligado a um átomo de carbono secundário. Por sua vez, a glicose é uma aldose, possuindo um grupo carbonila ligado a um átomo de carbono primário, como pode ser observado na Figura 1. Essa diferença estrutural impacta diretamente na forma como esses açúcares são processados pelo corpo, assim a sua identificação constitui interesse analítico (DAMODARAN, 2018).

Figura 1. Estrutura química da D-glicose e D-frutose.

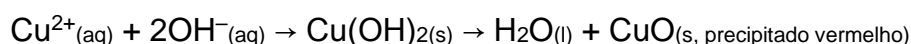


Fonte: Adaptada de Francisco Junior, 2008.

Para a determinação de açúcares redutores no meio alcalino, muitas metodologias clássicas podem ser encontradas, tais como, Método Lane-Eynon, Método de Luff-Schoorl, Método Munson-Walker, Método de Somogyi-Nelson, Método de Benedict, entre outros, que fazem o uso de reagentes na presença de íons Cu^{2+} (ASQUIERE *et al* 2003).

Dentre esses métodos o reagente de Benedict pode ser utilizado para detectar a presença de glicose e outros açúcares redutores fazendo o uso de uma solução contendo carbonato de sódio e citrato de sódio, em detrimento de uma solução alcalina composta por tartarato duplo de sódio e potássio. Esse procedimento torna-se eficaz na análise química, destacando sua composição específica para resultados precisos. Segundo Benedict (1911), esse reagente é mais sensível e menos tóxico do que o reagente de Fehling (Método Lane-Eynon), outro método frequentemente utilizado para detectar açúcares redutores; e mais estável, o que significa que pode ser armazenada por mais tempo sem degradação (BENEDICT, 1911).

O reagente de Benedict é preparado misturando-se carbonato de sódio, citrato de sódio e sulfato de cobre pentahidratado em solução alcalina. A presença de açúcares redutores faz com que o precipitado de óxido de cobre vermelho seja formado. A intensidade da cor do precipitado indica a quantidade de açúcar presente na solução. Assim, o reagente de Benedict consiste, basicamente, de uma solução de sulfato cúprico (CuSO_4) em meio alcalino que em presença de um agente redutor passa a apresentar a coloração castanha devido a formação do óxido cuproso (Cu_2O) (CISTERNAS *et al* 2001). Os íons Cu^{2+} em solução alcalina na presença de açúcares redutores precipitam na forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ e/ ou CuO , segundo a reação:



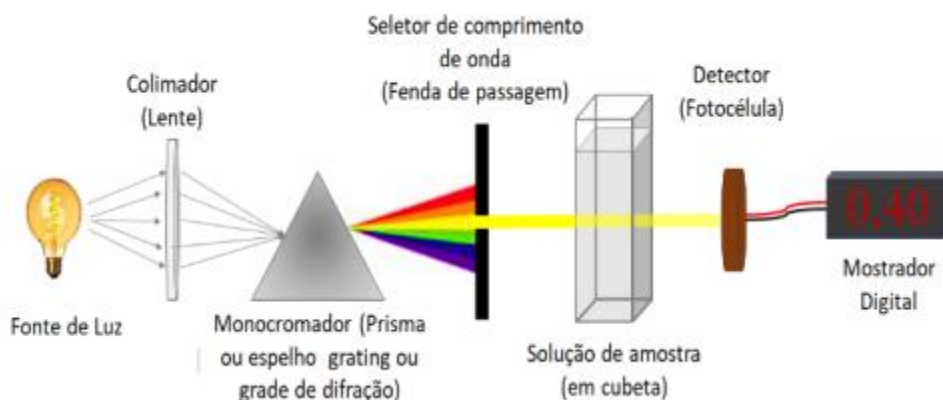
3.2 Espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis

A Espectrofotometria na região UV-VIS (200 a 800 nm do espectro eletromagnético) é uma das técnicas analíticas mais empregadas, devido à robustez e o custo relativamente baixo, podendo ter grande número de aplicações, desde acadêmicas a industriais. Nesse método, a quantidade de luz absorvida por uma solução é relacionada com a concentração da substância presente utilizando a lei de Lambert-Beer, a qual serve de base para medidas de absorção de radiação por amostras nas regiões ultravioleta (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Para as medidas de absorção de radiação, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde A representa a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação transmitida pela amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza específica da espécie absorvente e depende do comprimento de onda da radiação utilizado. A concentração é representada por c e b é o caminho óptico, por onde a radiação passa pela amostra (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

O princípio básico da espectrofotometria é baseado na absorção de radiação eletromagnética pelos elétrons das substâncias. Como pode ser observado na Figura 2, a energia radiante transmitida ou absorvida por uma solução é medida em diferentes comprimentos de onda e captada por um detector, com uma fotocélula, que converte a energia luminosa em um sinal elétrico proporcional à intensidade da luz. Esse sinal elétrico é amplificado, processado por um sistema eletrônico e finalmente convertido em um resultado quantitativo exibido no visor do espectrofotômetro (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Figura 2. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro de UV-Vis



Fonte: Adaptada de ROSA, et al., 2019.

Os resultados quantitativos podem ser determinados utilizando uma curva de calibração, que relaciona as concentrações conhecidas de uma substância chamada de padrão, com as respectivas absorbâncias medidas, permitindo assim, uma extensa aplicação na determinação de diferentes tipos de moléculas e íons em diferentes faixas de comprimento de onda, incluindo os açúcares redutores. A espectrofotometria de UV-Vis é considerada uma técnica de análise versátil e de fácil execução e uma ferramenta importante no controle de qualidade, pesquisa científica e aplicações clínicas (HARRIS, 2005).

3.3 Espectrofotômetro alternativo e o uso de *smartphones* para análises químicas

O desejo de inovação e a falta de recursos para a instrumentação são recorrentes na maior parte das instituições de ensino no Brasil, forçando

pesquisadores e estudantes a criarem estratégias alternativas para aprendizagem e suas respectivas pesquisas. Como exemplificado no trabalho de Lourenço *et al* (2021), a determinação de ferro é comumente feita por espectrofotometria de UV-VIS a partir de um complexo colorido com o Tiocianato de potássio (KSCN) nas aulas de química. Na ausência deste equipamento, a possibilidade desta determinação é inexistente. Com isso, um método alternativo ao uso desse instrumento, foi proposto nesse trabalho exposto, com o uso da câmera de um *smartphone* com o aplicativo PhotoMetrix PRO®, um software livre de análise de imagens digitais que utiliza modelos matemáticos univariados e multivariados para a sua detecção (LOURENÇO *et al* 2021).

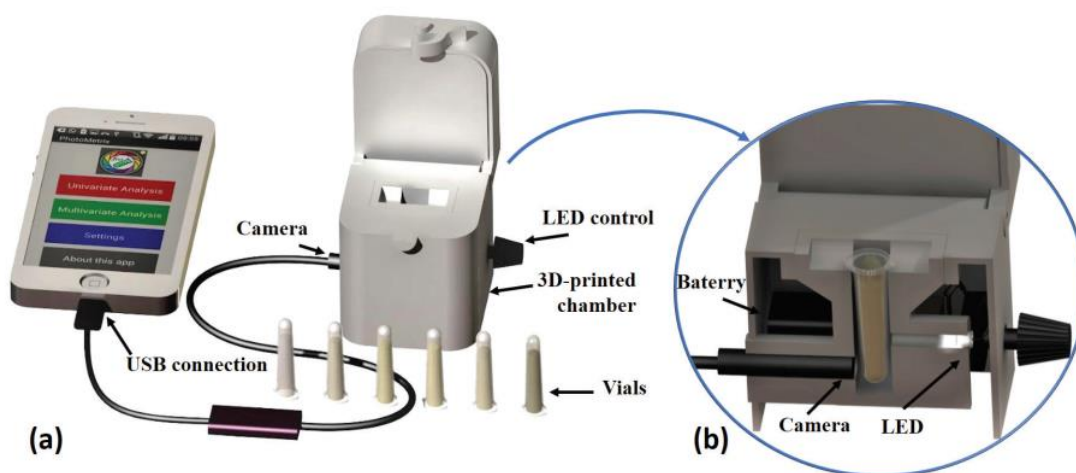
Por meio do uso de aplicativos voltados à pesquisa e ao ensino, os smartphones têm ganhado notoriedade, e consistem de ferramentas pedagógicas associadas ao uso das Tecnologias de Informação e Comunicação (TICs), substituindo em alguns casos computadores e até sendo usados como detectores de equipamentos (LOURENÇO *et al* 2021).

Hosker (2021) afirma que a construção de espectrômetros de UV-Vis alternativos concentram fundamentos de reflexão e absorção de fótons, usando luz vermelha, verde e azul, conhecido como sistema RGB (do inglês, *Red, Green e Blue*); análise de imagens espectrais difratadas (com câmera de *smartphone*); e outras abordagens, explorando fenômenos de absorção com o uso de LED (Diodo Emissor de Luz) como fonte de radiação na estreita faixa de comprimentos de onda da luz emitida por esses materiais (HOSKER, 2018).

A análise colorimétrica em amostras ambientais e alimentícias com captura por *smartphones* vêm ganhando cada vez mais interesse em análises químicas devido à sua simplicidade de uso e fácil adaptação a dispositivos portáteis, podendo ser executadas também fora do laboratório e em tempo real. A viabilidade se dá pela capacidade de se conectar sem fio, como *Wi-Fi* e *bluetooth*; além de estarem disponíveis a um custo razoável de aquisição, permitem o armazenamento e o processamento de dados no mesmo dispositivo (COSTA *et al* 2021).

Um espectrofotômetro alternativo pode ser confeccionado de forma personalizada com materiais de baixo custo, tais como, câmeras e sondas endoscópicas com conexão USB (porta serial universal, do inglês, *Universal Serial Bus*), luzes LED, caixas escuras de papel e até por impressão 3D (HOSKER, 2018; COSTA *et al* 2021) como esquematizado na Figura 3. A construção de um espectrofotômetro alternativo permite acesso a análises de diferentes compostos e moléculas, em locais que não possuem tal instrumento de UV-Vis, sendo uma proposta interessante e inovadora do ponto de vista acadêmico.

Figura 3. Sistema para análise colorimétrica utilizando câmera endoscópica USB (a). Detalhes da câmara (b).



Fonte: Adaptado de Costa, et al., 2021.

3.4 Quimiometria e o planejamento multivariado de experimentos

Pesquisas e análises que envolvem elevada quantidade de dados, como a composição centesimal de alimentos ou grande número de amostras ambientais, por exemplo, podem ser tratadas com o auxílio de ferramentas quimiométricas. A Quimiometria trabalha com a aplicação de métodos

matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar e classificar conjuntos de dados de interesse químico. Dentre as subáreas, pode-se destacar o planejamento de experimentos, reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. No primeiro, se busca geralmente as variáveis que exercem maior influência no sistema em estudo, com o objetivo de otimizar uma determinada metodologia; o segundo visa encontrar um grupo de amostras que são similares entre si, seguindo uma tendência de dados; já o terceiro pretende-se construir um modelo que se relacione com as medidas (NETO *et al* 2006).

No caso de determinações por análises espectrofotométricas de maneira geral, a quantificação é dada a partir de uma curva de calibração com padrões de concentrações conhecidas estabelecendo uma relação de proporcionalidade com a resposta na forma de absorvância, obtida com o cálculo de equações baseadas na Lei de Beer-Lambert, considerando um comprimento de onda máximo de absorção de energia, no próprio sistema. Os experimentos envolvendo análises espectrofotométricas de amostras reais, fornecem muitos dados químicos, e com isso, a possibilidade de interferência espectral com comprimentos de ondas sobrepostos, o que dificulta sua interpretação. Assim, dentre as ferramentas gráficas quimiométricas se destaca o planejamento Box-Behnken que é uma abordagem fundamentada em um planejamento fatorial incompleto que envolve três fatores onde há duas formas de representação (FERREIRA *et al* 2007). O objetivo principal desse modelo é identificar os fatores que possuem maior influência nos resultados e determinar as condições ótimas de operação. Para isso, são realizados experimentos em três níveis dos fatores, utilizando uma matriz de pontos centrais que permite a estimação dos efeitos quadráticos e interações.

Uma vantagem do Planejamento Box-Behnken é que ele permite uma análise estatística dos dados coletados, por meio da qual é possível determinar a significância estatística dos fatores e suas interações. Isso auxilia na tomada de decisões de forma fundamentada, evitando a utilização de conjecturas ou intuição para aprimorar os resultados. Outra característica importante desse

modelo é sua flexibilidade, pois ele pode ser aplicado em diferentes tipos de experimentos, desde estudos químicos e farmacêuticos até processos industriais. Além disso, o Planejamento Box-Behnken é capaz de lidar com problemas de alta dimensionalidade, ou seja, quando existem muitos fatores envolvidos no processo (KAISER, 2013).

4. EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

A solução estoque padrão de açúcar redutor de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e suas diluições, foram preparadas em balão volumétrico, a partir do reagente D-Glucose (Dextrose) da marca Neon 99%, em água destilada, conforme os cálculos do Anexo 1. A pesagem da dextrose foi conduzida por meio de uma balança analítica da marca Edutec, e para a diluição das soluções foram utilizadas micropipetas de volume 100-1000 μL da marca Biopet e 1000-5000 μL de volume da marca Peguet.

O preparo do reagente de Benedict foi feito de acordo com a literatura (OLIVEIRA *et al* 2014), dissolvendo-se em um béquer 17,30 g de citrato de sódio $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$; 10,00 g de carbonato de sódio anidro Na_2CO_3 com água. Dissolveu-se em um outro béquer 1,73 g de sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A mistura foi diluída em balão volumétrico aferido para 100,00 mL.

Para a reação dos açúcares redutores com o reagente de Benedict, a mistura foi colocada em tubos falcon de 15,0 mL, suportadas em pinças de madeira, dentro de béquer de 200,0 mL e deixadas em uma chapa de aquecimento da marca ACS GOLD, AG-MSH. Após a reação, os tubos contendo a mistura foram levados para a centrífuga de bancada, modelo NT 810 da marca Novatecnica, com velocidade máxima de 4000 RPM. O sobrenadante, contendo

os íons de Cu^{2+} remanescente, utilizado então para as medidas espectrofotométricas foi coletado com pipetas de pasteur e adicionados em cubetas de quartzo.

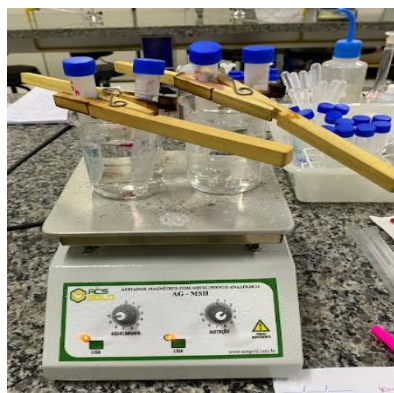
As medidas de curva de varredura e o planejamento Box-Behnken para a otimização foram realizadas no espectrofotômetro de UV-Vis equipado com lâmpada de deutério, marca Nova no modelo 1800 UV Spectrophotometer, utilizando em todas as medidas cubetas de quartzo. Os dados foram tratados no *Software Statística 6.0*.

Para a construção do espectrofotômetro alternativo foi realizada a impressão 3D de uma caixa, na impressora 3D fechada, com tecnologia *Fused Filament Fabrication (FFF)*, utilizando como acessórios a câmera e sonda endoscópica marca Knup, modelo KP-MI800/2M, com diâmetro de 7,0 mm e comprimento da sonda de 3,5 cm; luz LED de alto brilho de 5,0 e 2,0 mm; e as medidas foram registradas em *smartphone* da marca Motorola, modelo motoE da 2^o geração, utilizando o aplicativo gratuito PhotoMetrix-UVC[®], versão 1.0.4.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Para a reação entre o açúcar redutor na forma de dextrose e o reagente de Benedict, foi preparada uma solução na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a partir do estoque de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Foram adicionados em tubos falcon, 3,0 mL de cada solução com 1,0 mL do reagente de Benedict. A mistura foi mantida em banho de aquecimento a 90°C por durante 10 minutos de reação, conforme a Figura 4.

Figura 4. Sistema para reação dos açúcares redutores com Benedict



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Após concluir a reação, os tubos foram levados para a centrífuga, dando início ao processo de separação com um tempo de aceleração de 40 segundos, seguido por uma frenagem de 60 segundos, a uma velocidade de 3200 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras na forma de sobrenadante contendo íons de Cu^{2+} remanescente foram separadas dos seus precipitados contendo CuO , com uma pipeta de pasteur e adicionadas em cubetas de quartzo; posteriormente foram encaminhadas para as medidas no espectrofotômetro de UV-Vis a fim de se determinar a banda de maior absorção, realizando uma varredura de comprimentos de onda na faixa entre 200 nm a 800 nm, com intervalos de 5 nm. Os valores obtidos foram tratados no software Excel.

4.3 Otimização da determinação dos íons Cu^{2+} em Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-Vis

A otimização da reação de açúcares redutores com o reagente de Benedict, foi realizada selecionando três níveis de variação para cada fator que exercia influência na reação. Os três fatores que influenciavam diretamente o sistema proposto, foram a concentração do reagente de Benedict (CB), o tempo da reação (TR) e o tempo de centrifugação (TC), conforme o quadro 1. A temperatura da reação foi selecionada de acordo com a literatura.

Quadro 1. Fatores e níveis estudados na reação de identificação de açúcares redutores pelo método de Benedict

Fatores que influenciam na reação	Menor nível investigado (-1)	Nível intermediário Investigado (ponto central) (0)	Maior nível investigado (+1)
Concentração do reagente de Benedict (CB)	Diluição 1:45	Diluição 1:25	Diluição 1:5
Tempo da reação (TR)	5 minutos	10 minutos	15 minutos
Tempo de centrifugação (TC)	5 minutos	10 minutos	15 minutos

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Para este estudo foi selecionado a ferramenta quimiométrica planejamento Box - Behnken, a qual permite por meio da combinação de experimentos que alternam as condições de investigação, cruzar as informações entre todos os fatores que poderiam influenciar no sistema de estudo e identificar os principais efeitos que esses exerciam de forma multivariada. Essa ferramenta permite de forma prática e objetiva através 16 experimentos, realizar a triagem e otimização da reação, a qual diferente de metodologias de estudos individuais, conhecidos também como estudos univariados. Estudos univariados geralmente tem a tendência a usar maior número de experimentos, ocasionando maior gasto de reagentes e materiais e gerando maior quantidade de resíduos. Para isto, foi buscado na literatura o quadro 2 codificada do planejamento multivariado Box – Behnken.

Quadro 2. Tabela com valores codificados do planejamento Box-Behnken

Ordem do Experimento	Fator A*	Fator B*	Fator C*
	Concentração do reagente de Benedict (CB)	Tempo da reação (TR)	Tempo de centrifugação (TC)
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1

Ordem do Experimento	Fator A*	Fator B*	Fator C*
	Concentração do reagente de Benedict (CB)	Tempo da reação (TR)	Tempo de centrifugação (TC)
1	-1	-1	0
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

*Os valores dos Fatores A, B e C, são valores codificados que indicam, (-1) = menor nível investigado; (0) = nível intermediário estudado ou ponto central; e (+1) = maior nível investigado.

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Observando o Quadro 1 com os fatores e níveis estudados, foi possível completar o Quadro 2, substituindo os valores codificados por valores experimentais. Os valores utilizados em cada experimento de 1 a 15, podem ser observados no Quadro 3; onde cada experimento segue uma combinação de níveis diferentes, por exemplo, no experimento 1 a concentração do reagente de Benedict foi de 1:45, o tempo da reação foi de 5 minutos e o tempo de centrifugação foi de 10 minutos; no experimento 2 a concentração do reagente de Benedict foi de 1:5, o tempo da reação foi de 5 minutos e o tempo de centrifugação foi de 10 minutos; assim como nos experimentos 1 e 2, as condições de reação no experimento 3 até chegar no experimento 12, podem ser observadas diferenças. Os experimentos 13, 14 e 15 são chamados de ponto central, e a repetição corresponde a uma triplicata.

Quadro 3. Valores codificados e experimentais do planejamento Box-Behnken

Ordem do Experimento	Fator A*	Fator B*	Fator C*
	Concentração do reagente de Benedict (CB)	Tempo da reação (TR)	Tempo de centrifugação (TC)
1	-1 = 1:45	-1 = 5	0 = 10
2	+1 = 1:5	-1 = 5	0 = 10
3	-1 = 1:45	+1 = 15	0 = 10
4	+1 = 1:5	+1 = 15	0 = 10
5	-1 = 1:45	0 = 10	-1 = 5
6	+1 = 1:5	0 = 10	-1 = 5
7	-1 = 1:45	0 = 10	+1 = 15
8	+1 = 1:5	0 = 10	+1 = 15
9	0 = 1:25	-1 = 5	-1 = 5
10	0 = 1:25	+1 = 15	-1 = 5
11	0 = 1:25	-1 = 5	+1 = 15
12	0 = 1:25	+1 = 15	+1 = 15
13	0 = 1:25	0 = 10	0 = 10
14	0 = 1:25	0 = 10	0 = 10
15	0 = 1:25	0 = 10	0 = 10

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Para a realização dos experimentos de 1 a 15; foram adicionados 3,0 mL da solução de dextrose na concentração de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,0 mL do reagente de Benedict com suas respectivas diluições em água (1:45; 1:25; e 1:5) de acordo com cada experimento; dentro de tubos falcon em duplicata. Os tubos foram posicionados em béqueres sobre a chapa aquecedora em banho-maria a 90°C para a completa a reação. Foram estudados três intervalos de tempo de reação distintos, correspondendo a períodos de 5, 10 e 15 minutos, respectivamente, de acordo com a combinação do experimento.

Após concluir a reação, os tubos foram encaminhados para a centrifugação, dando início ao processo com um tempo de aceleração de 40

segundos, seguido por uma frenagem de 60 segundos, a uma velocidade de 3200 rotações por minuto (rpm). Foram realizados diferentes tempos de centrifugação, com duração de 5, 10 e 15 minutos, respectivamente, de acordo com os níveis estudados. Em seguida, as amostras foram separadas em precipitados, descartados; e sobrenadantes, os quais foram adicionados em cubetas de quartzo e encaminhadas para o espectrofotômetro de UV-Vis no comprimento de onda 300 nm a fim de obter os valores de absorbância correspondente a cada experimento. Foram obtidos 16 valores de absorbância de cobre remanescente, em duplicata.

4.4 Confecção de um espectrofotômetro alternativo

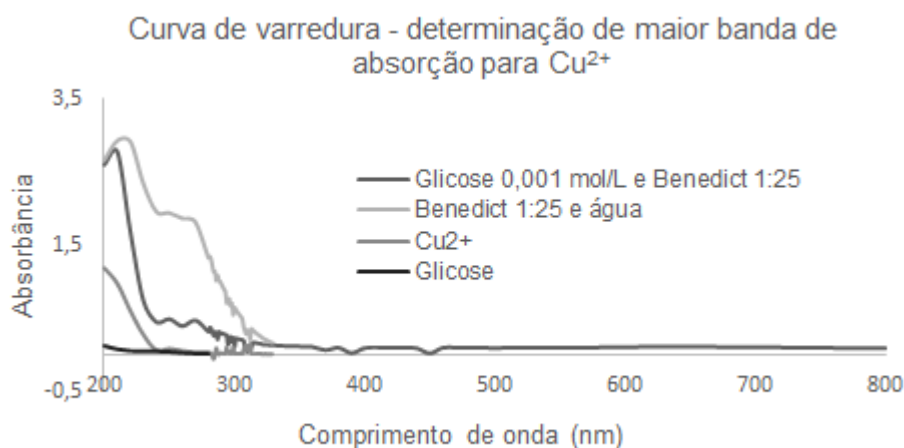
Para a construção do espectrofotômetro alternativo, foram utilizados materiais de baixo custo e de fácil acesso no mercado local ou *e-commerce*. Inicialmente, foi desenvolvido um modelo de caixa para simular a estrutura do instrumento por meio de impressão 3D, utilizando-se de impressora 3D disponível no IFPR-Campus Irati. Foi utilizada uma impressora 3D fechada, com tecnologia *Fused Filament Fabrication(FFF)*, *software* de fatiamento *Simplify3D*, notebook com o *software Simplify3D* instalado e com configuração para desenvolvimento de projetos em 3D. Os materiais para impressão testados foram filamentos PETG para a caixa preta e filamentos ABS para a caixa branca. O desenho da caixa foi desenvolvido com dimensões aproximadas de 11 cm de largura, 11 cm de profundidade e 11cm de altura. Para a fonte de radiação, luzes LED conectadas à bateria foram adquiridas; e para o compartimento de amostras foram utilizados tubos de ensaio com 1 cm de diâmetro. A captura de imagens foi feita com uso de uma câmera endoscópica com entrada USB conectada a um *smartphone*. As imagens obtidas foram capturadas e tratadas no aplicativo *PhotoMetrix-UVC®* e comparados com resultados experimentais de UV-Vis quando possível.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do comprimento de onda dos íons Cu^{2+} em Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-Vis

A determinação do comprimento de onda de maior absorbância foi observado na região do UV-Vis entre 200 e 800 nm com intervalos de 5 nm. Na Figura 5, pode-se observar as diversas soluções analisadas: somente a solução padrão de açúcar redutor na forma de dextrose; solução padrão de Cu^{2+} em água destilada; o reagente de Benedict em água; e a reação entre a dextrose e o reagente de Benedict. Essas medidas foram realizadas com a finalidade de identificar o comprimento de onda de maior absorbância para os íons de Cu^{2+} residuais, após a reação, pois ao reagir a dextrose com o reagente de Benedict esse forma CuO na forma de precipitado, o qual foi descartado. Desta forma, o sobrenadante contendo íons Cu^{2+} remanescentes que não reagiram com o açúcar redutor foram medidos. A banda de maior absorção que foi observada foi ao redor de 300 nm para as três soluções que tinham íons Cu^{2+} , exceto na solução padrão de dextrose.

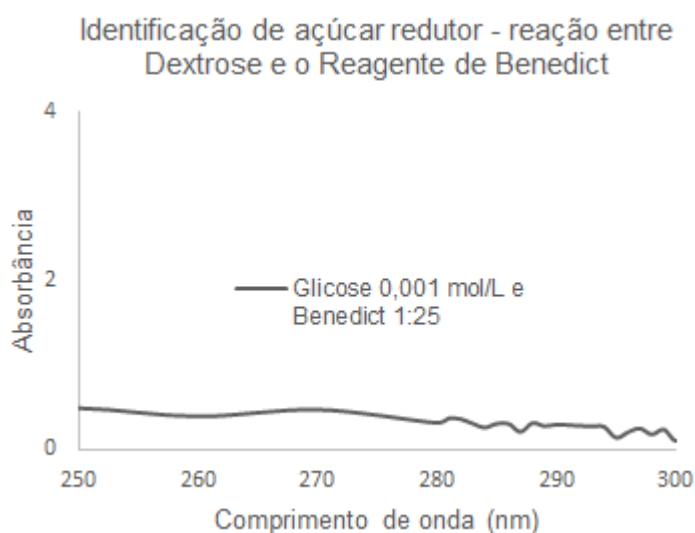
Figura 5. Varredura dos comprimentos de onda na região do UV-Vis



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

O comprimento de onda para a reação entre o reagente de Benedict e a dextrose, foi destacada no Figura 6. Seguindo o perfil sugerido na literatura (OLIVEIRA *et al* 2020) para a identificação de íons Cu^{2+} em Espectrofotometria de UV-Vis, indicando que o comprimento de onda de maior absorção para o cobre, pode ser observado a partir de 240 nm até 300 nm. Sendo adotado o comprimento de onda de 300 nm para todos os estudos posteriores. É importante mencionar que essas soluções em altas concentrações assumem coloração azul intensa, o que pode interferir nas medidas espectrofotométricas, justificando as baixas concentrações utilizadas para o estudo e provando a sensibilidade técnica nas medidas.

Figura 6. Varredura dos comprimentos de onda na região do UV-Vis para a reação entre a dextrose e o reagente de Benedict



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

5.2 Otimização preliminar multivariada Box - Behnken da identificação de açúcares redutores no Espectrofotômetro de UV-Vis

Os fatores que exercem influência na metodologia de identificação de açúcares redutores utilizando o reagente de Benedict; tais como, a concentração do reagente de Benedict (CB), o tempo da reação (TR) e o tempo de centrifugação (TC); foram avaliados em três níveis, menor, intermediário (ponto central) e o maior de cada fator, por meio de uma combinação de experimentos diferentes, afim de se obter as melhores condições para a reação. Cada experimento foi realizado em duplicata, e a ordem de execução foi aleatória, para minimizar a tendência de erros nos experimentos. As absorbâncias obtidas em cada experimento podem ser observadas no Quadro 4, onde esperava-se que quanto menor fossem os valores de absorbância em função da determinação de íons Cu^{2+} , melhor seria a combinação de condições experimentais para a identificação de açúcares redutores. Isso porque baixas concentrações de cobre remanescente no sobrenadante levado para a análise espectrofotométrica, indicam que houve maior formação de precipitado na forma de CuO , ou seja, maior reação com os açúcares.

Quadro 4. Combinação de experimentos do planejamento Box - Behnken

Experimentos	(CB) (fator de diluição)	(TR) (minutos)	(TC) (minutos)	Abs. A	Abs. B
1	1/45	5 min	0 min	0,282	0,267
2	1/5	5 min	10 min	2,257	1,957
3	1/45	15 min	10 min	0,211	0,187
4	1/5	15 min	10 min	0,831	0,972
5	1/45	10 min	5 min	0,273	0,207

6	1/5	10 min	5 min	1,224	0,872
7	1/45	10 min	15 min	0,239	0,225
8	1/5	10 min	15 min	1,221	1,080
9	1/25	5 min	5 min	0,650	0,646
10	1/25	15 min	5 min	0,305	0,437
11	1/25	5 min	15 min	0,700	0,568
12	1/25	15 min	15 min	0,284	0,302
13	1/25	10 min	10 min	0,309	0,283
14	1/25	10 min	10 min	0,313	0,294
15	1/25	10 min	10 min	0,306	0,292

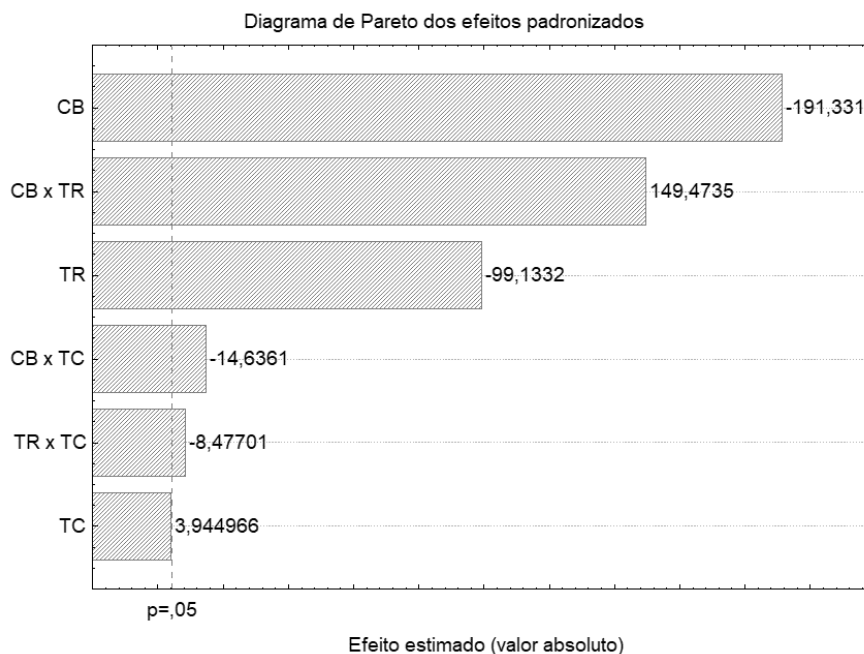
Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Como observado no Quadro 4, os menores valores de absorvância foram observados nos experimentos 1, 3, 5, e 7, que tinham a maior diluição do reagente de Benedict (1/45), ou seja, a menor concentração desse. Isso indica que esse fator estudado, exerceu grande influência na reação, e quanto menor a sua concentração maior é interação com o açúcares redutores. E isso possivelmente ocorre, pois a concentração de açúcares redutores foram fixadas em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em todos os experimentos, e o excesso de reagente de Benedict contendo íons Cu^{2+} que não reagiram nos demais experimentos, aumentaram portanto, a absorvância.

Para se observar a influência de cada fator estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 95%, os dados de absorvância da otimização Box - Behnken foram levados para o *Software*

Statística 6.0. Foi obtido graficamente nesse programa o diagrama de Pareto, observado na Figura 7.

Figura 7. Diagrama de Pareto dos efeitos no planejamento Box - Behnken



CB = concentração do reativo de Benedict; TR = tempo da reação; e TC = tempo de centrifugação.

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Nesse formato de gráfico, pode-se notar que o limite da linha vertical pontilhada, representa que os fatores estudados são significativos no sistema, exercendo influência na metodologia proposta. Portanto, quando a linha horizontal representando o efeito de cada fator, não cruza esta linha pontilhada, aquele fator não exerce nenhuma significância no sistema. O efeito de cada fator foi calculado automaticamente pelo *software*, seguindo a Equação 1, onde o Efeito é a diferença entre $\underline{y}(+)$ (média das respostas em seu maior nível investigado (+1)) e $\underline{y}(-)$ (média das absorvâncias no menor nível investigado (-1)). Quando

o valor do Efeito calculado representado pela linha horizontal é positivo, maior seria o nível ideal, e quando o valor do Efeito for negativo, menor seria o valor experimental ideal para o estudo.

$$Efeito = \underline{y}(+) - \underline{y}(-) \quad (\text{Equação 1})$$

Com isso, observou-se na Figura 8, que a concentração do Benedict (CB) e o tempo de reação (TR), ultrapassaram a linha de significância, ou seja, foram fatores importantes no sistema. O efeito do CB apresentou o valor calculado de -191,331 e o efeito do TR -99,1332. Estes valores negativos, indicam que os menores níveis estudados, são mais adequados para a metodologia. O menor nível de CB foi a diluição 1/45 e o TR de 5 minutos, observados na Tabela 1, supramencionada. Já o tempo de centrifugação (TC) embora tenha um efeito positivo de 3,944966, não foi estatisticamente significativo, ou seja, não exerce influência nas condições de estudo, refletidas nas absorvâncias obtidas. A interação dos efeitos CB x TR foi positiva e significativa, indicando que realmente, uma melhor resposta experimental foi obtida com os dois fatores de maior influência, e nas interações as quais o TC aparecem, CB x TC e TR x TC, foram negativas, provando que o tempo de centrifugação não contribui de forma significativa na otimização.

Dessa forma, a maior diluição (menor concentração) do reagente de Benedict (CB) de 1/45 foi adotada para os próximos experimentos, visando menor consumo do reagente, e a eficiência na reação. Já o melhor tempo de reação observado pelos resultados do pareto foi de 5 minutos, no entanto, pode-se observar que o tempo de 10 minutos no nível intermediário (ponto central) não diferente tanto, assim, experimentalmente o tempo de 10 minutos pode ser adotado também para ensaios futuros para a completa reação. Como o tempo de centrifugação não exerceu influência no sistema de otimização, optou-se pelo uso de 10 minutos, sempre observando experimentalmente a ausência de

partículas e solução turva, em testes posteriores, e sendo necessário, o processo pode ser repetido.

Além desses resultados, cabe salientar que esses dados são de uma otimização preliminar, e uma maior exploração estatística pode ser feita a partir dos dados de absorvância do Box-Behnken; ainda, novos estudos podem ser propostos utilizando outras ferramentas quimiométricas para uma otimização mais abrangente. Ademais, as informações obtidas são suficientes para comprovar que a reação química entre os açúcares redutores representados pelo padrão de dextrose com o reagente de Benedict realmente aconteceu, pois houve a presença de íons Cu^{2+} remanescentes no sobrenadante em diferentes concentrações, comprovados pela Espectrofotometria no UV-Vis e a formação do precipitado vermelho tijolo; e essa investigação preliminar foi muito relevante para servir de base na continuidade do estudo, propondo a construção de um espectrofotômetro alternativo.

5.3 Confeção do espectrofotômetro alternativo

Paralelamente ao estudo em Espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis, foi confeccionado, um espectrômetro alternativo através de impressão 3D de uma caixa. Inicialmente, realizou-se a modelagem da caixa no software *SolidWorks®* com as medidas de 10,0 cm de largura, 10,0 cm de altura e 10,0 cm de comprimento, com duas aberturas laterais cilíndricas com os diâmetros de 1,0 cm para o posicionamento da câmera endoscópica e 0,7 cm para o encaixe do LED, respectivamente; e uma abertura superior para o encaixe de um tubo de ensaio ou eppendorf com o diâmetro de 1,0 cm. O projeto contou com três peças, a base da caixa, a entretampa para encaixar as amostras e uma tampa.

A impressão das peças foi feita com o *software* de fatiamento *Simplify3D®* e uma impressora 3D fechada, utilizando o filamento ABS (acrilonitrila butadieno estireno) na cor preta, como na Figura 9. O ABS possui excelentes propriedades mecânicas e pode ser considerado ideal para a impressão de objetos que requerem firmeza e durabilidade. No entanto, logo após a impressão, o encaixe da tampa acabou quebrando devido à essa alta rigidez do material. O que foi uma característica indesejável, pois a tampa precisava ser maleável para a troca das amostras entre as medidas.

Figura 8. Imagem da caixa 3D com filamento ABS na cor preta



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

A impressão da caixa preta, apresentou experimentalmente medidas muito compactas ao encaixar os acessórios necessários, o LED e a câmera; o que não impediu inicialmente o uso. Embora fisicamente, esta primeira impressão tenha chegado muito próximo do esperado, ao capturar as imagens com a câmera endoscópica, essas não apresentaram nitidez, devido a coloração escura da caixa.

Assim, para melhorar as condições práticas, o projeto todo foi aumentado em 10%, e para uma nova impressão optou-se pelo filamento PETG (Politereftalato de Etileno Glicol) um copolímero que resulta da combinação do PET com o glicol, proporcionando a impressão final alta resistência mecânica e química. Essas características são importantes, pois o material precisou ter mobilidade de abertura na tampa; e devido ao uso de reagentes químicos, que eventualmente poderiam entrar em contato, essa resistência foi imprescindível no projeto. Para melhorar a nitidez das cores das amostras nas imagens obtidas, essa segunda impressão foi feita com o filamento PETG na cor branca, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 9. Imagem da caixa 3D com filamento PETG na cor branca



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Após a impressão da caixa foi acoplado a uma câmera endoscópica conectada a um smartphone com o aplicativo PhotoMetrix-UVC®, o qual permitiu a construção de uma curva de calibração e determinação de açúcares redutores em amostras de bebidas não alcoólicas, por meio de imagens digitais (cor da solução), conforme a Figura 10.

Figura 10. Montagem do Espectrofotômetro alternativo de impressão 3D



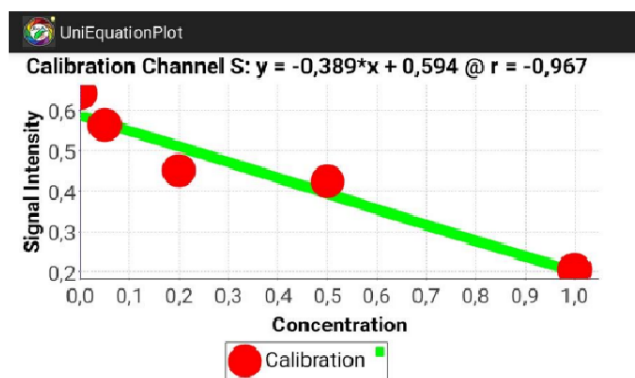
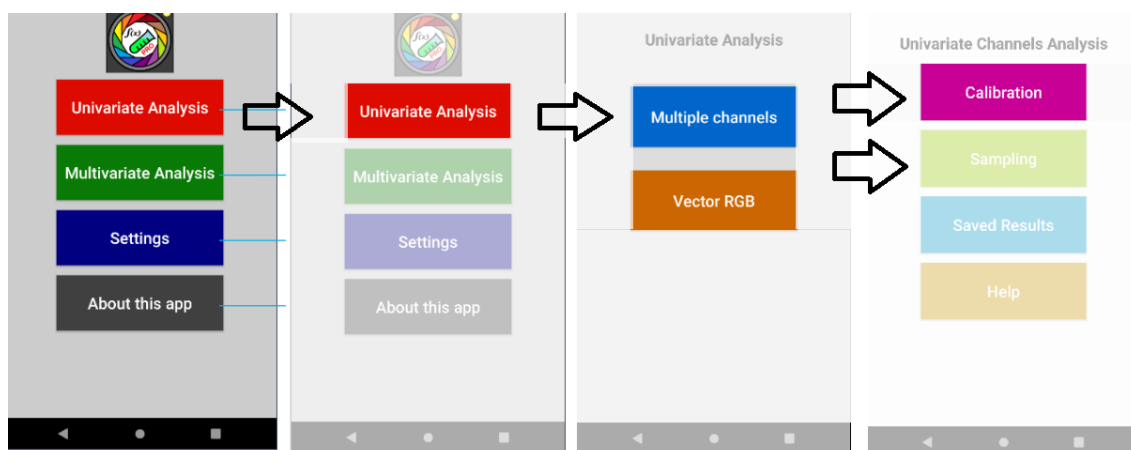
Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

5.4 Medidas no espectrofotômetro alternativo de impressão 3D

Para a quantificação de açúcares redutores utilizando a caixa de impressão 3D simulando um espectrofotômetro alternativo, o aplicativo gratuito PhotoMetrix-UVC® foi utilizado com a resolução de 64 x 64 pixels, para a análise de imagens capturadas por uma câmera sonda endoscópica em tempo real da medida, seguindo a interface mostrada na Figura 11. Conforme os dados descritos no tutorial fornecido disponível *on-line* pelo criador para o procedimento

montagem de uma curva de calibração e posteriormente as medidas das amostras.

Figura 11. Interface do aplicativo PhotoMetrix-UVC®



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

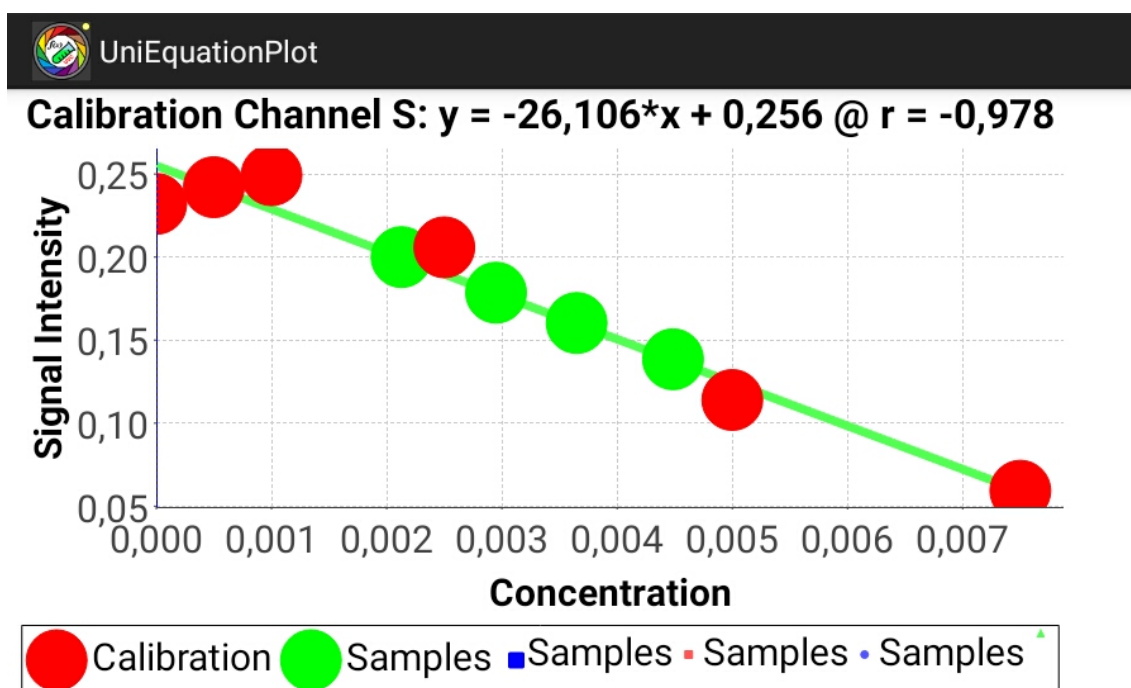
Inicialmente, foi preparada uma curva de calibração analítica na faixa de concentração de $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,0075 \text{ mol L}^{-1}$ de açúcar redutor, testando também a solução do branco. A reação química entre os açúcares redutores e o reagente de Benedict, foi preparada com 3,0 mL das soluções do padrão de dextrose nas concentrações adequadas, e 1,0 mL do reagente de Benedict; adicionados dentro de tubos falcon, mantidos em banho de aquecimento por 10 minutos a 90°C e centrifugados a 3200 rpm por 10 minutos, de acordo com a otimização da reação verificada por espectrofotometria de UV-Vis, discutida no item 5.2. Após a centrifugação os sobrenadantes foram coletados com pipeta de pasteur e depositados em tubos de ensaio de vidro, com 1,0 cm de diâmetro, posicionados um de cada vez, seguindo a ordem crescente da curva, dentro do espectrofotômetro alternativo.

A curva de calibração esperada foi decrescente e com linearidade r próximo de 1, pois ao aumentar a quantidade de açúcares redutores na solução, pretende-se consumir o reagente de Benedict formando um precipitado vermelho-tijolo, clareando gradativamente o sobrenadante. Portanto, nestas medidas, avalia-se as imagens em função da alteração de coloração do sobrenadante e como resultado o aplicativo fornece múltiplos canais com as curvas de calibração.

Assim, o aplicativo forneceu 8 curvas, e a curva que apresentou melhor linearidade foi a do canal S (*Channel S*) com $r = -0,978$. A letra S do canal, vem do inglês indicando as cores “salmon” e “sepia”, que por tradução significam, salmão e amarelo escuro, respectivamente, que são as cores semelhantes ao sobrenadante obtido. Essa curva foi selecionada para aplicar também as amostras, como pode ser observado na Figura 12. A curva de calibração representada pelos pontos em vermelho seguiram a tendência esperada e a curva foi linear. Os três primeiros pontos da curva, representados graficamente na cor vermelha; o branco ($0,0 \text{ mol L}^{-1}$), o $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e o $0,0010 \text{ mol L}^{-1}$

obtiveram um perfil semelhante na curva, pois são concentrações baixas e muito próximas, o que possivelmente não causou diferença significativa na coloração da solução e por conseguinte nas imagens obtidas pela câmera; diminuindo a linearidade.

Figura 12. Curva de calibração no Photometrix-UVC®



*As esferas vermelhas representam os pontos da curva de calibração; e as esferas verdes, correspondem às amostras testadas.

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

Foram testadas três amostras líquidas, duas incolores, refrigerante e o energético; e uma amostra com coloração, café coado; para identificar possíveis alterações na cor final do sobrenadante após a reação. As amostras foram diluídas com a adição de 250,0 µL em balão volumétrico aferido com água destilada para 25,0 mL. As duas amostras incolores apresentaram valores de 14,4 g de açúcar para cada 200,0 mL de bebida, sendo um valor muito próximo

dos rótulos encontrados nos supermercados, entre 12,0 e 20 g de açúcar por 200,0 mL. Esses valores estão destacados no Quadro 5, onde os valores obtidos com a curva de calibração em mol L⁻¹ foram convertidos em concentração de g 200 mL⁻¹, para fins de comparação com os rótulos. Para verificar se a curva estava adequada um ponto foi medido junto com as amostras, e esse acabou se sobrepondo na Figura 12, provando que a quantificação foi eficiente. Com os dados esperados para essas determinação, comprovando que a metodologia proposta pode ser utilizada na determinação de açúcares redutores.

Quadro 5. Aplicação das amostras na curva de calibração obtida no PhotoMetrix-UVC ®

Amostras	Concentração obtida com a curva de calibração (mol L ⁻¹)			Concentração final em (g 200 mL ⁻¹)
Refrigerante	0,004	0,004	0,004	14,4 ± 0
Energético	0,004	0,004	0,004	14,4 ± 0
Café coado*	0,003	0,003	0,003	-
Ponto da própria curva de 0,0025 mol L ⁻¹	0,002	0,002	0,002	7,2 ± 0

* O café coado não foi considerado, pois sua coloração escura inicial pode ter interferido na medida.

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2024)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas análises realizadas, fica evidente que o espectrofotômetro com impressão 3D apresentou um desempenho equiparável ao instrumento convencional na determinação de açúcar redutor pelo método de Benedict. Isso sugere que o uso dessa tecnologia pode ser uma alternativa viável e econômica, especialmente em ambientes educacionais e laboratórios que não dispõem do equipamento convencional. Para as condições experimentais, os dados de otimização podem ser mais explorados utilizando outras ferramentas quimiométricas disponíveis na literatura. Além disso, a metodologia pode ser utilizada para a aplicação em outras amostras que possuem coloração, pois os resultados obtidos durante as análises experimentais estavam de acordo com os valores rotulados.

Adicionalmente, o desenvolvimento de uma metodologia analítica alternativa baseada no uso de smartphones e tratamento de imagens digitais promete trazer ainda mais versatilidade e acessibilidade às análises de açúcares redutores. A utilização de ferramentas quimiométricas para planejamento e otimização dos experimentos contribuirá para o desenvolvimento e precisão dos resultados. Em suma, esse estudo oferece uma contribuição significativa para a área da análise de açúcares redutores, apresentando alternativas inovadoras e acessíveis que podem ser aplicadas em diversos contextos científicos e educacionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASQUIERE, E. R.; SILVA, R. do N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D'Arc X.; ASSIS, E. M. **Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 23, n.3, p. 337 – 341, 2003.

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.

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

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.

CISTERNAS, J.R.; VARGA, J. e MONTE, O. **Fundamentos de Bioquímica Experimental.** 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

COSTA, A. B. da; HELFER, GILSON, A.; BARBOSA, J. L. V.; TEIXEIRA, I. D.; SANTOS, R. O.; SANTOS, R. B. dos; VOSS, M.; SCHLESSNERD, S. K.; BARIN, J. S. **PhotoMetrix UVC: A New Smartphone-Based Device for Digital Image Colorimetric Analysis Using PLS Regression.** J. Braz. Chem. Soc., v. 32, n. 3, p.675-683, 2021.

CRUZ, S. H.; SARTI, D. **A química do açúcar, texto do CRQ IV Região**, 2011.

Disponível em: https://www.crq4.org.br/quimicaviva_acucar. Acesso em: 03 de out. de 2023.

DAMODARAN, Srinivasan. **Química de alimentos de Fennema**. 5 Ed. Porto Alegre: ArtMed, 2018. Recurso online. ISBN 9788582715468

FERREIRA, S. L.C.; BRUNS, R. E. FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDAO, G.C.; SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; REIS, P. S. SOUZA, A.S.; SANTOS, W.N.L. **Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods** *Anal. Chim. Acta*, p 179-575 ,2007.

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.* v. 128. P.113–117, 2016.

FRANCISCO, J. W. E. **Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções**. *QUÍMICA NOVA NA ESCOLA*, n. 29, 2008.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 6. Ed, Rio de Janeiro, LTC, p.876, 2005.

HOESKER, B. S. **Demonstrating Principles of Spectrophotometry by Constructing a Simple, Low-Cost, Functional Spectrophotometer Utilizing the Light Sensor on a Smartphone**. *Journal of Chemical Education*, v.95, p.178, 2018.

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

LOURENÇO, E. C.; PAULA, S.; SETTI, G. O.; TOCI, A. T.; PADILHA, J. C.; SILVA, E. M. BOROSKI, M. **Determinação do Teor de Ferro Utilizando o Aplicativo PhotoMetrix PRO®: a Tecnologia a favor do Ensino de Química.** Rev. Virtual Quim., v. 13, n.1, p.192-206, 2021.

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

KAISER, S. *et al.* Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box-Behnken design. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 153-161, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669013001866>.

KURZYNA-SZKLAREK, M.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. **Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – An overview of methods.** Food Chemistry, v. 314, 2022. ISSN 0308-8146. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133466>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622014285?via%3Dihub>.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria.** 2 Ed., Campinas: Unicamp, 2006.

NIELSEN, S.S. **Food analysis.** 4 Ed. New York: Springer, p. 602, 2010.

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.

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.,v. 60, p. 154-162, 2014.

OLIVEIRA, R. W. S.; GOMES P. R. B.; RIBEIRO J.; DINIZ, J. B. R.; FONTENELE M. A.; EVERTON G. O.; LYRA W. da S.; LOUREIRO H. C.; PAULA M. do L. de; FILHO, V. E. M. Filho. **Determinação espectrofotométrica de Cobre(II) em aguardente de mandioca (Tiquira).** Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., v. 49, n.2, p. 355-373, 2020.

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. v.108, p.14–17, 2013.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA L.S.G.; **Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria.** Quím Nova ,v.27, n.5, p.807, 2004.

ROSA, C. L.; MARTINS F. P.de O. S.; ARANTES, R. dos S. V.; SILVA, M.; OLIVEIRA, T. M.; SALIBA, W. A. **Construção de espectrofotômetro visível para fins didáticos.** Journal of Exact Sciences. v.21, n.1, p.20-25, 2019.

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,v. 11, p. 1986-1993, 2018.

SHIBUKAWA, M.; NOBUSHIMA, D.; SAKUMA, S.; SASAKI, M.; NAKAMURA, K.; MATSUTANI, Y.; SAITO, K.; SAITO, S. **Selective Spectrophotometric**

Determination of Trace Amounts of Cadmium in Soil and Sediment Samples Using a Green Aqueous Biphasic Extraction. Anal. Sci.;v.32, p.1095-1100, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T .A. **Princípios de Análise Instrumental.** 5 Ed, Bookman, Porto Alegre, 2002.

ANEXO

Solução estoque $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de Dextrose:

1 mol de dextrose.....180 gramas

1,0 mol de dextrose... X

X= 180 gramas/L

180 gramas 1000mL

Y gramas..... 25 mL

Y= 4,5 gramas de dextrose

Diluição do Reagente de Benedict:

Diluição = $1/45$

Utilizou-se 0,550 mL de reagente de Benedict, completou-se com água destilada usando balão volumétrico de 25 mL

Diluição = $1/25$

Utilizou-se 1,0 mL de reagente de Benedict, completou-se com água destilada usando balão volumétrico de 25 mL.

Diluição = $1/5$

Utilizou-se 5 mL de reagente de Benedict e 20 mL de água destilada em balão volumétrico de 25 mL.