



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ÍCARO SACRAMENTO DE ALMEIDA PORTO

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS USANDO IMAGENS DIGITAIS
PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCOS DE
FRUTAS**

SALVADOR
2020

ÍCARO SACRAMENTO DE ALMEIDA PORTO

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS USANDO IMAGENS DIGITAIS
PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCOS DE
FRUTAS**

Dissertação apresentada ao Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como parte do requisito para obtenção do grau de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Costa
Ferreira**

SALVADOR
2020

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar todo sustento necessário e por me manter determinado a alcançar tudo aquilo que almejo.

Ao professor Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira, mais uma vez, pela orientação, disposição e confiança no trabalho que me foi designado.

À João Honorato, por ter me apresentado o fascinante universo de imagens digitais e por toda paciência e dedicação nesse caminho. Muito obrigado!

À professora Daniele Muniz, por me acolher para realização do estágio docente. Gratidão pelo semestre de grande aprendizado e por ter contribuído tão positivamente para minha formação.

Ao grande amigo que fiz nesta caminhada, Júnior (Juninho). Sou grato por todos os conselhos e puxões de orelha e principalmente por todas as vezes que se dispôs a ouvir meus desabafos.

Ao meu consultor de mídia, Rafael Franco, por todas as resenhas e fotos editadas durante esse período. Obrigado por contribuir para manutenção do meu feed organizado nesta correria.

A Cheilane pela benção da nossa amizade e disposição em aprender sobre senso e crossfit. Você vai longe, amiga!

Ao meu GRPQQ! E toda geração que esteve comigo durante o mestrado: Adilson, Adriano, Caio, Júnior, Lucas, Matheus, Michel, Ravena, Rodrigo, Saulo, Shirlei, Thaíse e Vanessa. É incrível a energia boa que vocês emanam!

Aos amigos que entraram no mestrado junto comigo, Filipe e Renata, gratidão por ter a amizade de vocês!

Aos demais amigos da vida, sou grato por todos os momentos de alegria compartilhado, por todo apoio e presença. Em especial a Raquel Cerviño por todo incentivo e preocupação na fase final deste trabalho.

A minha família, por acreditar em mim, em especial ao meu primo/irmão Shasman Carneiro por todo apoio nos momentos difíceis, por me entender e por me apoiar sempre.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu avanço pessoal e científico: o meu muito obrigado!

“Presentemente eu posso me considerar um sujeito de sorte ”

Belchior

RESUMO

Nos últimos anos, diversos métodos espectrofotométricos consolidados na literatura têm sido adaptados para imagens digitais (DI), oferecendo uma alternativa de análise rápida, portátil e de baixo custo. Nesse contexto, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de estratégias analíticas baseadas em imagens digitais para quantificação de ácido ascórbico em amostras de sucos naturais de frutas utilizando os reagentes cromogênicos 1,10-fenatrolina e Br-PADAP 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)fenol. Em meio ácido, o ácido ascórbico reduz o Fe(III) à Fe(II) e esse novo estado de oxidação forma complexos coloridos com os reagentes propostos. Para estabelecimento das melhores condições de análise, foram aplicadas técnicas de otimização multivariadas e univariadas. As imagens foram obtidas através de uma *webcam* com detector CMOS (*Complementary Metal-Oxide Semiconductor*), armazenadas em formato *jpg* e submetidas a *softwares* específicos para extração dos dados. A construção do sinal analítico foi realizada a partir do modelo aditivo de cores RGB (*red, green e blue*) correspondendo as cores vermelho, verde e azul. Foram investigadas duas formas de processamento: uma delas é análoga a lei de Beer e a outra foi definida como o resultado da expressão: $S = 255 - (R, G \text{ ou } B)$, em que R, G ou B, refere-se à intensidade de radiação emitida pelo padrão ou solução amostral em um componente de cor. A precisão do método foi avaliada em termos de desvio-padrão relativo (%RSD) utilizando amostras escolhidas arbitrariamente (n=10), com valores variando entre 1,2% e 8,2%. Utilizando o ligante Br-PADAP, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,004 mg/100g e 1,063 mg/100g, respectivamente. Para o método com o ligante 1,10-fenantrolina obteve-se valores de 0,022 mg/100g (LD) e 2,857 mg/100g (LQ). A exatidão foi avaliada através da comparação com os resultados da espectrofotometria de absorção molecular. Foram avaliadas as concentrações de ácido ascórbico em um total de 13 amostras de frutas, sendo elas: limão, laranja, uva, lima, abacaxi, tangerina, manga, mangostão, ameixa, maracujá, jenipapo, melão e melancia, adquiridas na cidade de Salvador. As concentrações obtidas variaram entre 3,8 mg/100g e 38,1 mg/100g. A análise de imagens digitais produziu resultados precisos, exatos e demonstrou ser uma alternativa promissora no uso de determinações colorimétricas.

Palavras-chave: Imagem digital, Ácido ascórbico, RGB, Frutas

ABSTRACT

In recent years, several spectrophotometric methods consolidated in the literature have been adapted for digital images (DI), offering a fast, portable and low cost analysis alternative. In this context, the present work proposed the development of analytical strategies based on digital images for quantification of ascorbic acid in natural fruit juices using the chromogenic reagents 1,10-phenanthroline and Br-PADAP 2- (5-Bromo-2- pyridylazo) -5- (diethylamino) phenol. In an acidic environment, ascorbic acid reduces Fe (III) to Fe (II) and this new oxidation state forms a complex color with the proposed reagents. To establish the best analysis conditions, multivariate and univariate optimization techniques were applied. The images were typed from a webcam with CMOS detector (Complementary Metal-Oxide Semiconductor), stored in jpg format and submitted to specific software for data extraction. The construction of the analytical signal was performed from the additive model of RGB colors (red, green and blue) corresponding to the colors red, green and blue. Two forms of processing were investigated: one is analogous to Beer's law and the other was defined as the result of the expression: $S = 255 - (R, G \text{ or } B)$, where R, G or B, refers to intensity of radiation emitted by the standard or sample solution in a color component. The accuracy of the method was assessed in terms of relative standard deviation (% RSD) using arbitrarily chosen ($n = 10$), with values ranging between 1.2% and 8.2%. Using the Br-PADAP ligand, the limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.004 mg / 100g and 1.063 mg / 100g, respectively. For the method with the 1.10-phenanthroline ligand it obtained values of 0.022 mg / 100g (LD) and 2.857 mg / 100g (LQ). Aidao was evaluated by comparison with the results of the molecular absorption spectrophotometry. They were evaluated as ascorbic acid taxes on a total of 13 fruits, namely: lemon, orange, grape, lime, pineapple, mandarin, mango, mangosteen, plum, passion fruit, genipap, melon and watermelon, purchased in the city of Salvador. The specifications vary between 3.8 mg / 100g and 38.1 mg / 100g. The analysis of digital images produced precise, accurate and superior results to be a promising alternative in the use of colorimetric determinations.

Keywords: Digital Image, Ascorbic Acid, RGB, Fruits

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ácido ascórbico.....	16
Figura 2 - Isômeros do ácido ascórbico.....	17
Figura 3 - Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico	17
Figura 4 - Reação entre o ácido ascórbico e 2,6-diclorofenol indofenol.....	19
Figura 5 - Estrutura de compostos da família α,α' -diiminas	21
Figura 6 - Formação do complexo Fe(II)-1,10-fenantrolina	21
Figura 7 - Estrutura do Br-PADAP.....	22
Figura 8 - Estrutura do PAR	23
Figura 9 - Espectro eletromagnético: raios luminosos situam-se na ordem de 10^{-9} m	24
Figura 10 - O processo de amostragem.....	27
Figura 11 - O processo de quantização.....	27
Figura 12 - Discretização de uma imagem	28
Figura 13 - Imagens digitais de mesmo tamanho, representando a mesma imagem real e diferentes resoluções: 1-2px; 2-4px, 3-25 px, 4-100px, 5-400px, 6-2500px, 7-10000px.....	29
Figura 14 - Esquema de aquisição de imagem por uma câmera digital (CCD).....	30
Figura 15 - Sensor do tipo CCD	31
Figura 16 - Sensor do tipo CMOS	31
Figura 17 - Entrada de luz em um sensor CMOS tradicional vs retroiluminado	32
Figura 18 - Diferentes tons de cinza em um pixel.....	33
Figura 19 - Arranjo de filtro Bayer sobre um conjunto de Pixel de um sensor de imagem ...	33
Figura 20 - Distribuição espectral de potência.....	34
Figura 21 - Sensibilidade dos sensores da retina em função do comprimento de onda.....	35
Figura 22 - Espaço de cor RGB e CMY.....	36
Figura 23 - Espaço de cor HSV.....	37
Figura 24 - Seleção da ROI.....	38
Figura 25 - Espaço RGB e a posição do vetor v.....	40
Figura 26 - Visão externa do sistema de detecção de imagens	46
Figura 27 - Visão interna do sistema de detector de imagens	47
Figura 28 - Gráfico de Pareto referente a otimização com 1,10-fenantrolina.....	51
Figura 29 - Curvas de calibração usando os canais Red, Green e Blue – 1,10 – fenantrolina	53
Figura 30 - Avaliação do efeito de matriz - 1,10-fenantrolina através do processamento - $\log(p/p_0)$	56
Figura 31 - Avaliação do efeito de matriz - 1,10-fenantrolina através do processamento $S = 255 - B$	56
Figura 32 - Correlação entre dados: Metodologia Ortofenantrolina ($-\log(p/p_0)$).....	58
Figura 33 - Correlação entre dados: Metodologia Ortofenantrolina ($255 - B$).....	59
Figura 34 - Gráfico de Pareto referente a otimização com Br-PADAP	64
Figura 35 - Curvas de calibração usando os canais Red, Green e Blue - Br-PADAP	65
Figura 36 - Correlação entre dados: Metodologia Br-PADAP ($-\log(p/p_0)$).....	68
Figura 37 - Correlação entre dados: Metodologia: Br-PADAP ($255 - G$).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo de soluções-tampão.....	44
Tabela 2 - Matriz do planejamento para reação colorimétrica com 1,10-fenantrolina.....	50
Tabela 3 - Valores reais do planejamento (1,10-fenantrolina).....	50
Tabela 4 - Efeito dos fatores e suas interações	51
Tabela 5 - Influência entre a distância da cubeta e webcam na sensibilidade do método....	52
Tabela 6 - Influência da área da ROI (px ²) na sensibilidade do método.....	53
Tabela 7 - Determinação da curva de calibração - 1,10-fenantrolina	54
Tabela 8 - LD e LQ - 1,10-fenantrolina	55
Tabela 9 - Avaliação da precisão - 1,10 - fenantrolina para amostra de Limão (n=10)	55
Tabela 10 - Avaliação do efeito de matriz - 1,10-fenantrolina	57
Tabela 11 - Determinação de ácido ascórbico em suco natural de frutas - 1,10-fenantrolina	58
Tabela 12 - Teste t para metodologia com 1,10-fenantrolina	60
Tabela 13 - Comparação com outros dados da literatura	61
Tabela 14 – Matriz do planejamento para reação colorimétrica com Br-PADAP.....	63
Tabela 15 - Valores reais do planejamento (Br-PADAP)	63
Tabela 16 - Efeito dos fatores e suas interações	64
Tabela 17 - Determinação da curva de calibração - Br-PADAP	66
Tabela 18 - LD e LQ - Br-PADAP	66
Tabela 19 - Avaliação da precisão - Br-PADAP para amostra de Melão (n=10)	67
Tabela 20 - Determinação de ácido ascórbico em suco natural de frutas - Br-PADAP	67
Tabela 21 - Teste t para metodologia com Br-PADAP	69
Tabela 22 - Comparação com outros dados da literatura	70
Tabela 23 - Informações nutricionais do conteúdo de vitamina C - Adultos	72
Tabela 24 - Informações nutricionais do conteúdo de vitamina C - Crianças e Adolescentes	73

LISTA E ABEVIATURAS E SÍMBOLOS

AA – Ácido Ascórbico.

FAO – *Food and Agriculture Organization*.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

IOM-US – *Institute of Medicine of United States*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Br-PADAP - 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol.

RGB – *Red, Green, Blue*.

LAA – L-Ácido Ascórbico.

DCFI – 2,6 - Diclorofenol Indofenol.

EDTA – Ácidoetilenodiamino Tetra-acético.

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

LC-IT-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Conjunto com Armadilha de Íons.

LIAA – Ácido L-iso-ascórbico

LD – Limite de Detecção.

LQ – Limite de Quantificação.

phen – 1,10 - fenantrolina

bpy - 2,2'-bipiridina

biq - biquinolina

MSFIA – Análise de Injeção de Fluxo com Múltiplas Seringas

PAR – 4-(2piridilazo)-resorcinol

ICP OES – Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado

Pixel – *Picture element*

CCD – *Charge Coupled Device*

CMOS – *Complementary Metal-Oxide Semiconductor*

full HD – *full High Definition*

S – *short*

M – *medium*

L – *long*

CIE - *Commision internationale de l'Éclairage*

ROI – *Region of interest* (Região de interesse)

RSD – Desvio-Padrão Relativo

CRM – Material de Referência Certificado

CMY – *Cyan, Magenta, Yellow*

HSV – *Hue, Saturation, Value*

CMYK – *Cyan, Magenta, Yellow, Preto* (K vem de *key* para não confundir o B, de *Black*, com o B de *blue* no RGB)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*

TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos

IDR – Ingestão diária recomendada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. O NUTRIENTE ÁCIDO ASCÓRBICO	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS.....	16
2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE AA.....	18
3. REAGENTES UTILIZADOS EM DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA	21
3.1 1,10-FENANTROLINA	21
3.2 Br-PADAP	22
4. ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS	24
4.1 ASPECTOS TEÓRICOS	24
4.2 ESPAÇOS DE CORES	34
4.3 PROCESSAMENTO DE DADOS.....	38
5. OBJETIVOS	42
5.1 OBJETIVO GERAL	42
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
6. PARTE EXPERIMENTAL	43
6.1 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	43
6.2 PREPARO DE SOLUÇÕES.....	43
6.2.1 ÁCIDO ASCÓRBICO (10 mg L ⁻¹ e 100 mg L ⁻¹).....	43
6.2.2 1,10 – FENANTROLINA 0,10% (m/v)	44
6.2.3 TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO/ÁCIDO ACÉTICO 1 mol L ⁻¹	44
6.2.4 Br-PADAP (0,015%, 0,020% e 0,025%) (m/v)	45
6.2.5 EDTA (0,05%, 0,10% e 0,15%) (m/v).....	45
6.2.6 TRITON X-100 8% (m/v).....	45
6.3 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS	45
6.4 AQUISIÇÃO E AVALIAÇÃO DE DADOS RGB	46
6.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO ANALÍTICO	47
7. ESTRATÉGIA ANALÍTICA EMPREGANDO 1,10-FENANTROLINA	49
7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	49
7.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA.....	49
7.1.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MEDIDA	52

7.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	53
7.2.1 LINEARIDADE	53
7.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	54
7.2.3 PRECISÃO	55
7.2.4 EFEITO DE MATRIZ.....	55
7.2.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS E EXATIDÃO.....	57
8. ESTRATÉGIA ANALÍTICA EMPREGANDO Br-PADAP	62
8.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	62
8.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA	62
8.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	65
8.2.1 LINEARIDADE	65
8.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	66
8.2.3 PRECISÃO	66
8.2.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS E EXATIDÃO.....	67
9. CONTRIBUIÇÃO NA INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR)	71
10.CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	77

1.INTRODUÇÃO

O AA (ácido ascórbico), comumente conhecido como vitamina C, é um importante nutriente na alimentação humana devido à sua ação antioxidante. Nesse sentido, sua deficiência pode levar à ocorrência do escorbuto, uma doença que manifesta sintomas tais como: fraqueza muscular, perda dentária e erupções cutâneas. Além disso, estudos vêm demonstrando sua associação com o aumento da densidade óssea, relacionando-se assim ao combate da osteoporose [1].

A *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendam a ingestão diária de 45 mg de vitamina C para adultos na faixa etária de 19 à 65 anos – valores suficientes para promover a saturação de até 97,5% dos tecidos corporais [2]. O *Institute of Medicine* (IOM-US) preconiza que para adultos a partir de 19 anos, o consumo diário seja de 75 mg e 90 mg para mulheres e homens, respectivamente [77].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o consumo diário de 60 mg suficientes para adultos, independente do sexo [76]. Entretanto, a maioria dos especialistas recomenda a ingestão diária em torno de 100 mg a fins de otimizar os benefícios e orienta que seja feita ao longo do dia através de alimentos vegetais e frescos, evitando assim a necessidade de suplementação.

Frutas e legumes são as principais fontes de AA. Como exemplos destacam-se acerola, cajú, morango, laranja, limão, lima, brócolis, espinafre e ervilha [1]. A ingestão desses alimentos, quando o propósito é aproveitar o máximo do nutriente, é recomendada na forma natural uma vez que o AA é instável e reage facilmente como redutor.

Em química analítica, diversas técnicas são conhecidas para determinação de ácido ascórbico, entre elas: volumétricas, eletroanalíticas, cromatográficas e espectrofotométricas. A análise de imagens digitais vem ganhando destaque nos últimos anos e muitas metodologias consolidadas por técnicas espectrofotométricas vêm sendo adaptadas. A possibilidade de aquisição de imagens através de *webcams*, *smartphones*, *scanners*, câmeras fotográficas, entre outros, torna tal metodologia atrativa principalmente pela rapidez e redução de custos [3].

Por colorimetria, entende-se como sendo o estudo dos processos relacionados à alteração de cor, que permitem a realização de análises a níveis

qualitativos e/ou quantitativos. A cor é entendida como estímulo visual, fisicamente definido, podendo ser quantificado numericamente através de métodos e espaço de cores [4]. A análise de imagens digitais agrega então a possibilidade de variadas formas de processamento de dados.

Segundo a teoria tricromática da cor, qualquer cor é formada combinando três cores adequadamente escolhidas [5]. Em dispositivos de capturas, o espaço RGB é o mais comum. Considerando esse espaço, a percepção visual que incide na retina é formada pela soma ponderada dos componentes primários R (*red*), G (*green*) e B (*blue*), ou seja, cada componente primário contribui para percepção da cor neste espaço [6]. Outros espaços de cores são conhecidos e originários através de coordenadas que surgem neste espaço inicial.

Uma das alternativas para análise colorimétrica de ácido ascórbico é a determinação indireta através da reação de oxirredução com Fe (III) em meio ácido. O íon Fe (III) é reduzido à Fe (II) e esse estado de oxidação forma complexos estáveis com reagentes orgânicos com absorção de radiação na região visível. *Lau e Luk*, desenvolveram método espectrofotométrico para determinação de ácido ascórbico utilizando o complexo Fe(II)-1,10-fenantrolina aplicando à amostras de refrigerantes e frutas [7]. *Ferreira et al.* propuseram determinação indireta usando o complexo Fe(II)-2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP) [8].

Com base no exposto, o presente trabalho propõe a adaptação de duas metodologias de determinação indireta de ácido ascórbico aplicando-as a imagens digitais, utilizando os reagentes 1,10-fenantrolina e Br-PADAP. As metodologias desenvolvidas foram investigadas individualmente empregando diferentes formas de processamento de dados, utilizando o modelo aditivo de cores RGB e comparadas entre elas considerando aspectos de validação analítica.

2. O NUTRIENTE ÁCIDO ASCÓRBICO

2.1 HISTÓRICO

Os primeiros registros científicos associados ao ácido ascórbico estão relacionados à ocorrência do escorbuto, definido como redução da capacidade do organismo em produzir colágeno. Hieróglifos egípcios datados de 300 a.C já continham descrições de sintomas que provavelmente seriam desta doença [9]. No século XVIII, devido às grandes viagens marítimas, muitos marinheiros morriam de escorbuto por permanecerem longos períodos embarcados [10].

Pacientes com esta doença podem apresentar diversos sintomas, os quais incluem: sonolência, anemia, dores nas articulações, retardo na cicatrização de ferimentos, vertigem, entre outros. Em sua forma mais severa, pode ocasionar perda dos dentes, hemorragia interna, danos nos ossos e infecções, com possibilidade de levar o indivíduo à morte [9].

Em 1747, o médico da marinha britânica *James Lind* (1716-1794), realizou um estudo visando descobrir possíveis formas de tratamento da doença. Nessa época, era aceitável a hipótese de que a causa do escorbuto seria devido a um desequilíbrio corporal ácido e alcalino. O estudo consistiu em dividir seis grupos de pessoas que manifestava sintomas. Um desses grupos foi tratado com duas laranjas e um limão diariamente enquanto que os demais receberam tratamento com sidra de maçã, ácido sulfúrico, vinagre, água do mar e pasta medicinal. Foi observado que o primeiro grupo reduziu os sintomas drasticamente em uma semana, e assim, as frutas cítricas passaram a ser conhecidas como alimentos que continham propriedades antiescorbúlicas [11].

A primeira vez que a referida substância foi isolada ocorreu em *Cambridge* (1928) pelo cientista Húngaro *Albert Szent-Györgyi* (1893-1986) buscando encontrar um composto atuante como agente redutor em sistemas bioquímicos, utilizando laranja, repolho e glândulas suprarrenais [9]. *Szent-Györgyi* conseguiu comprovar que tal substância tinha estrutura semelhante à de açúcares simples (hexoses). Por esse motivo, foi dado o nome de ácido hexurônico [12]. Neste mesmo período se disseminou o conceito de vitamina, proposto por *Casimir Funk*, referente à

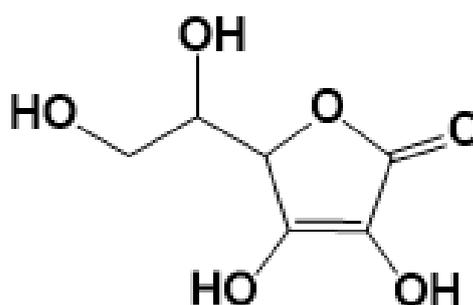
substâncias alimentares imprescindíveis a saúde, e o fator antiescorbútico, também passou a ser conhecido como vitamina C [10].

Posteriormente, outros cientistas desenvolveram trabalhos com o intuito de isolar o material puro utilizando o sumo de limão e outros alimentos antiescorbúticos. *Charles Glen King* (1896-1988) foi o primeiro a obter êxito, comprovando efetivamente que o composto isolado por Szent-Györgyi era o chamado ácido hexurônico [11]. Coube a *Hirst e Haworth*, um ano depois, a proposta da estrutura real da vitamina C e, adicionalmente, propuseram o nome de ácido ascórbico, uma referência a sua já conhecida ação para cura do escorbuto [9,11]. Com as pesquisas de *Linus Pauling* (1901-1994), a vitamina C passou a ser amplamente conhecida e o seu consumo diretamente associado à prevenção de gripes, resfriados e viroses [10].

2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

O ácido ascórbico é um sólido cristalino, inodoro, solúvel em água de fórmula molecular $C_6H_8O_6$. Estruturalmente, corresponde à classe de compostos orgânicos denominados lactonas (ésteres cíclicos) e também conta com os grupos funcionais álcool e enol, como pode ser visto na figura abaixo:

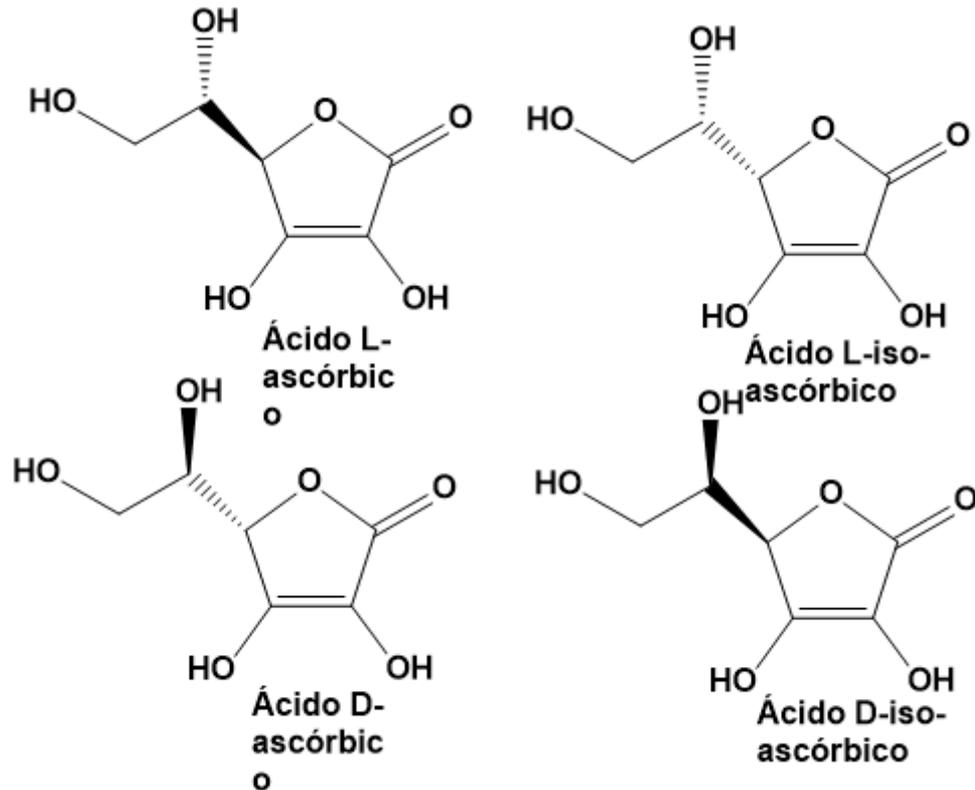
Figura 1 - Estrutura do ácido ascórbico



. Por apresentar dois centros quirais, possui quatro formas isoméricas (figura 2). Em alimentos, predomina-se o isômero ácido L-ascórbico ou L-treo-2-hexenona-1,4-lactona (LAA) que também é o responsável pela atividade pró-vitamínica, contudo, todos os isômeros possuem as mesmas propriedades antioxidantes. Nesse sentido, essas espécies isoméricas, são de importância considerável para indústria alimentar, podendo ser adicionado como antioxidante em produtos alimentícios

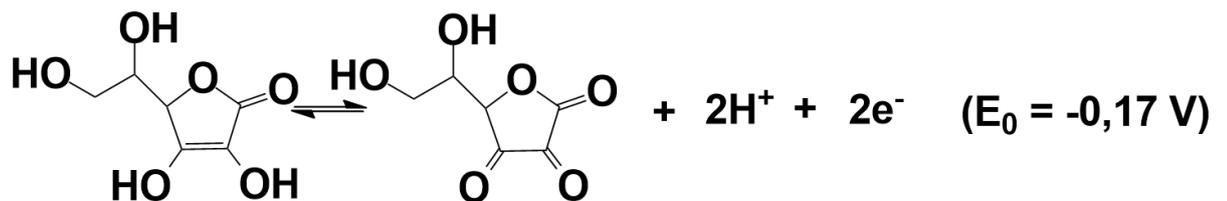
como bebidas, carnes, vinhos, entre outros, minimizando custos do uso do isômero LAA [13].

Figura 2 - Isômeros do ácido ascórbico



A acidez do AA é proveniente dos grupamentos enólicos presentes na molécula (hidroxilas ligadas a carbonos insaturados). Após reação de oxirredução, a estrutura perde dois hidrogênios na forma de próton e libera dois elétrons a serem transferidos para espécie oxidante, dando origem ao ácido dehidroascórbico (figura 3).

Figura 3 - Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico



A elevada capacidade redutora do ácido ascórbico é fundamental em várias reações bioquímicas, caracterizando sua função biológica. É capaz de reduzir

espécies reativas de oxigênio, que podem estar direta ou indiretamente relacionada à doenças respiratórias [14]. Atua também na síntese de alguns componentes hormonais do sistema nervoso, como dopamina e noradrenalina, neurotransmissores relacionados a emoções, atenção, aprendizado e sono [9].

Outra importante atribuição do AA consiste na formação do colágeno, atuando como cofator na reação de hidroxilação da prolina. Nesse sentido, é fundamental para formação da matriz conjuntiva óssea e cartilaginosa e também na cicatrização de ferimentos [15].

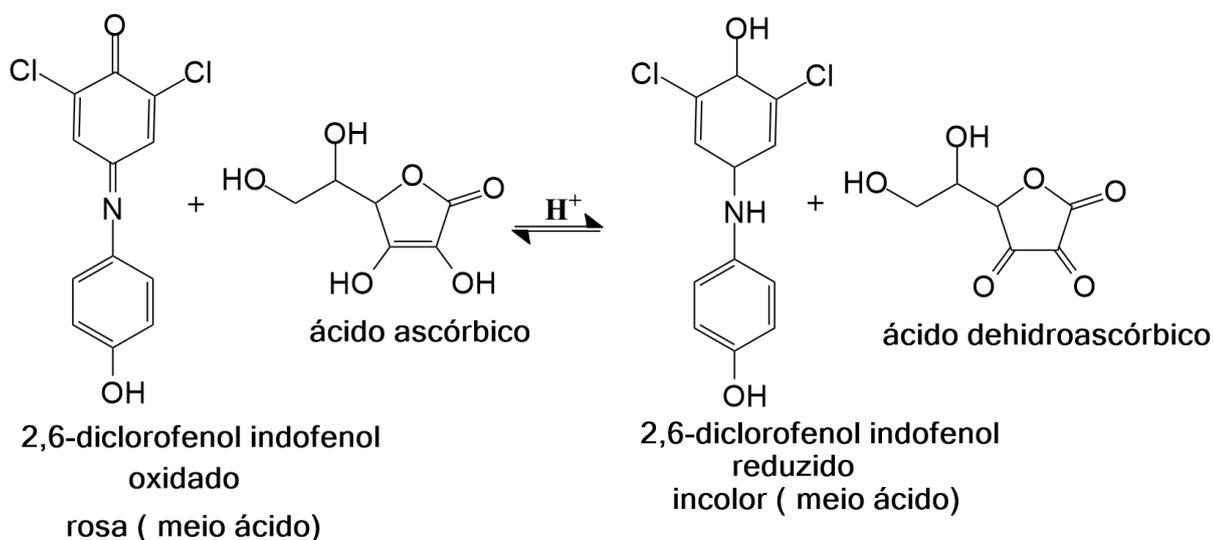
A biodisponibilidade de ferro, isto é, fração efetiva que foi absorvido, digerido e encontra-se disponível para funções metabólicas, também pode ser melhorada com o consumo de alimentos ricos em AA [15,16]. O ferro não heme tem baixa taxa de biodisponibilidade, porém, quando associado ao AA, é mantido no estado ferroso formando o quelato ferro-ascorbato. Este é mais solúvel e, portanto é facilmente absorvido, sendo então uma alternativa no tratamento de anemia ferropriva [16].

Estudos realizados por *Linus Pauling*, na década de 70, tiveram resultados positivos para tratamento de pessoas com câncer [17]. Uma das hipóteses levantadas para o sucesso desse experimento é a de que a vitamina C atua como agente pró-oxidante na formação de peróxido de hidrogênio sendo então viabilizada a formação de espécies reativas com atividade citotóxica em células cancerígenas [17]. Os pacientes receberam alta dose intravenosa da vitamina, entretanto, esses resultados foram severamente criticados, pois se questionava vários aspectos metodológicos empregados na análise, tais como coleta e tratamento de dados. Outros estudos foram realizados via suplementação oral, mas não foi possível obter os mesmos êxitos [18].

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE AA

A determinação de ácido ascórbico é tradicionalmente realizada através da metodologia de Tillmans que consiste em uma titulação volumétrica baseada na redução do reagente 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI) (figura 4) [19,20]. O DCFI, em meio ácido, apresenta coloração rosa e sua forma reduzida é incolor:

Figura 4 - Reação entre o ácido ascórbico e 2,6-diclorofenol indofenol



Após o consumo total do AA, o excesso de DCFI torna a coloração da solução rosa, indicando o ponto final da titulação. Contudo, esta metodologia tem fatores limitantes como a impossibilidade de ser aplicada em matrizes que contenham nitrito em sua composição e outros agentes redutores. Outro inconveniente é a coloração da matriz que pode interferir na observação do ponto final da titulação [19].

Oliveira e colaboradores propuseram modificações na metodologia de *Tillmans* para aplicação em amostras com coloração [21]. Os autores trabalharam com geléias de frutas, aplicando etapas de extração com ultrassom e centrifugação. A amostra foi empregada como titulante e o DCFI foi titulado. Além de eliminar as interferências da pigmentação das amostras, relataram também menor uso do reagente e redução na geração de resíduos.

A Espectrofotometria de absorção molecular também é uma técnica frequentemente empregada para determinação de ácido ascórbico. Possui sensibilidade adequada, dispensando necessidade de grandes diluições da amostra. *Lau* e colaboradores desenvolveram procedimento espectrofotométrico para determinação de ácido ascórbico, utilizando o complexo Fe(II)-1,10-fenantrolina, cujo comprimento de onda de absorção situa-se na faixa de 510nm [7]. Aplicaram a amostras de sucos em conserva e refrigerantes obtendo valores de precisão de 0,9%. A interferência do ácido cítrico foi avaliada, uma vez que é um aditivo geralmente presente nessa amostra, contudo, concluíram que não causam problemas para análise.

Ferreira e colaboradores otimizaram um procedimento espectrofotométrico utilizando o complexo Fe(II)-Br-PADAP para determinação de AA em sucos naturais de frutas e formulações farmacêuticas [8]. Para eliminar possíveis interferências de íons metálicos, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi utilizado como mascarante. O complexo absorve nas regiões de 560nm e 748nm. A metodologia foi comparada com o sistema Fe(II)-1,10-fenantrolina, obtendo sensibilidade seis vezes superior e desvio padrão inferior a 1%.

Metodologias envolvendo reações de oxirredução são limitadas no que diz respeito à determinação da forma oxidada do AA (ácido dehidroascórbico) que, eventualmente, podem já ter reagido com concomitantes da matriz ou em contato com o ar. Nesse sentido, estratégias podem ser pensadas aplicando técnicas eletroanalíticas. *Mazurek* e colaboradores aplicaram polarografia por pulso diferencial na determinação de vitamina C e ácido dehidroascórbico em amostras alimentícias [22]. Para isso, fizeram uso do reagente ditioneitol para reduzir o ácido dehidroascórbico ao ácido ascórbico. Possíveis interferências do redutor foram eliminadas com o uso do reagente de Carrez. A validação foi alcançada aplicando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector espectrofotométrico.

A maioria das técnicas empregadas não é capaz de discriminar o ácido ascórbico entre seus isômeros. Sendo assim, quando se tem como objetivo realizar tal feito as técnicas cromatográficas são as alternativas mais comuns. A cromatografia em papel e camada delgada apresenta resultados bons, entretanto, são pouco utilizadas. A cromatografia gasosa apresenta boa especificidade, porém, o procedimento é mais trabalhoso. A cromatografia líquida é então a técnica mais aplicada, conferindo alta sensibilidade, especificidade e procedimentos mais simples [13].

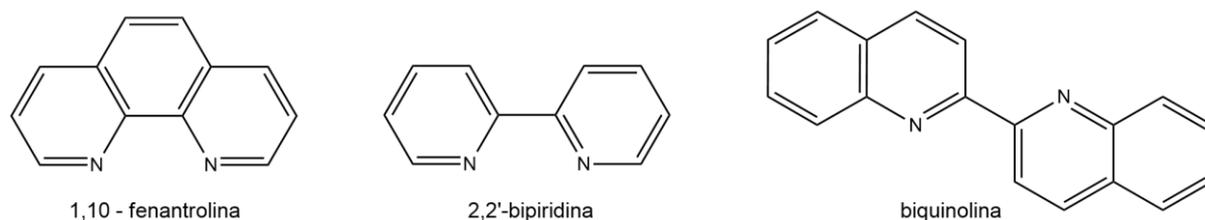
Boonpangrak e colaboradores aplicaram cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em conjunto com armadilha de íons (LC-IT-MS/MS) para determinação simultânea dos isômeros ácido L-ascórbico (LAA) e ácido L-iso-ascórbico (LIAA) em amostras de sucos de frutas locais e industrializados na Tailândia [23]. Utilizaram coluna de fase reversa (C₁₈) e condições isocráticas simples de ácido fórmico 0,1%. As recuperações foram entre 88% e 108% e limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 0,6 e 1,8 µg mL⁻¹.

3. REAGENTES UTILIZADOS EM DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA

3.1 1,10-FENANTROLINA

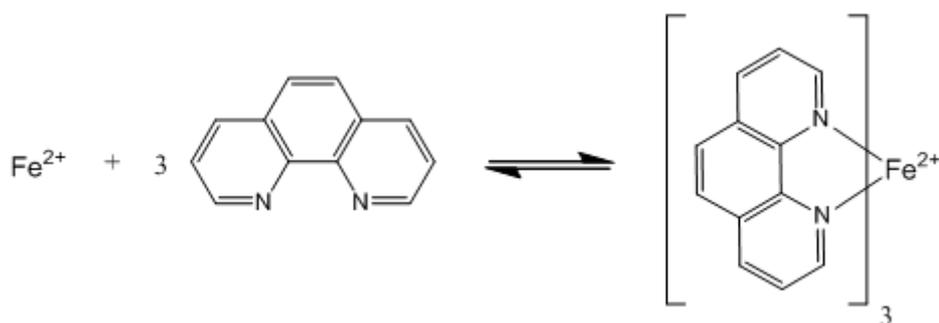
A 1,10-fenantrolina (*phen*) é um composto orgânico heterocíclico policondensado, rígido e plano. Junto com a 2,2'-bipiridina (bpy) e biquinolina (biq), compõe uma importante classe de agentes quelantes da família α,α' -diiminas (figura 5) [24].

Figura 5 - Estrutura de compostos da família α,α' -diiminas



É considerado um ligante bidentado por possuir dois átomos doadores de pares de elétrons em sua estrutura, sendo estes os átomos de nitrogênio. A 1,10-fenantrolina reage com o Fe(II) formando um complexo estável de coloração vermelho-alaranjado, na proporção três ligantes para um centro metálico. A reação (figura 6) ocorre em meio ácido, a fins de evitar a hidrólise do íon ferroso [25].

Figura 6 - Formação do complexo Fe(II)-1,10-fenantrolina



Em 1888, Blau sintetizou a 2,2'-bipiridina observando sua capacidade de formar compostos coloridos com sais de ferro. Seguindo os estudos sobre este composto, chegou a estrutura 1,10-fenantrolina concluindo que, assim como a 2,2'-

bipiridina, possuía reatividade semelhante frente aos sais de ferro. Esses estudos foram fundamentais para a elucidação da química do ferro entre outros elementos [26].

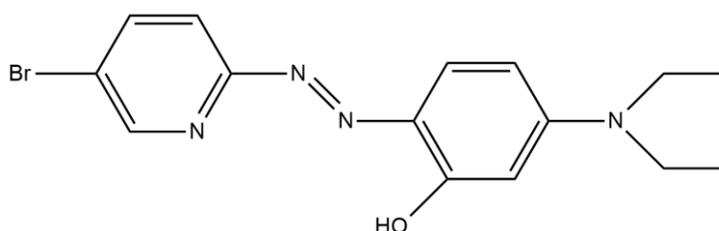
O sistema Fe(II)-1,10-fenantrolina é bastante conhecido em química analítica nas mais diversas aplicações espectrofotométricas. O primeiro método foi desenvolvido em 1938 por Fortune e colaboradores [27], utilizando cloreto de hidroxilamina como redutor. O complexo foi determinado em 508 nm, sendo estável por cerca de seis meses.

O sistema também já vem sendo aplicado a metodologias de análises digitais. Santos Neto e colaboradores realizaram especiação de ferro em vinho branco utilizando cloridrato de hidroxilamina como agente redutor [28]. A região de interesse analisada foi decomposta pelo modelo de cores RGB, sendo o canal azul o que apresentou curva de calibração com melhores parâmetros para análise. Obtiveram valores de limites de detecção de $0,042 \text{ mg mL}^{-1}$ e limites de quantificação de $0,141 \text{ mg mL}^{-1}$ na determinação do ferro(II).

3.2 Br-PADAP

O 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol, mais conhecido como Br-PADAP (figura 7), é um sólido cristalino, avermelhado, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos.

Figura 7 - Estrutura do Br-PADAP



O Br-PADAP é um ligante polidentado e reage com ferro em seus dois estados de oxidação mais comuns, Fe(III) e Fe(II). Com o Fe(II), forma complexo na proporção de um centro metálico para dois ligantes. O complexo possui coloração acastanhada e pela capacidade de ligar-se a uma série de íons metálicos (manganês, cromo, cobre, cobalto, íon férrico, entre outros) geralmente faz-se

necessário o uso do ácido etilediamino tetra acético (EDTA) (figura 8) como mascarante que também é um ligante polidentado [8,29].

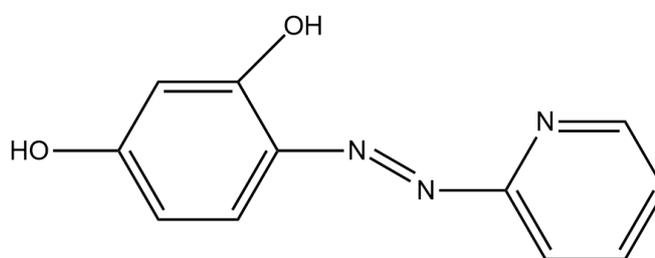
Danchana e colaboradores desenvolveram metodologia espectrofotométrica por injeção de fluxo de múltiplas seringas (MSFIA) para análise de Urânio através do sistema ternário U(VI)-(Br-PADAP)-F. A metodologia foi aplicada em amostras de água obtendo-se recuperação entre 80% e 102% [30].

Rui-qin e colaboradores utilizaram o sistema Zn-(Br-PADAP) para determinação da quantidade de zinco deixada nas mãos após contato com estruturas revestida com o referido metal. As condições otimizadas incluíram uso do tampão borato em pH 8,0 e preparo da solução complexante com uso do surfactante Triton X-100. Observaram que a quantidade de zinco após 7 horas de contato reduz em 90% [31].

Khamirchi e colaboradores sintetizaram um adsorvente de íon U(VI) impregnado com Br-PADAP em nanotubos de carbono para determinação de urânio em amostras ambientais. Posteriormente, empregou extração em fase sólida com coluna empacotada com o reagente e analisou os níveis vestigiais do metal através de Espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [32].

O Br-PADAP possui estrutura quelante igual ao do ligante 4-(2piridilazo)-resorcinol (PAR), representado na figura 9, contudo, estudos vem demonstrando que o uso dos complexos de Br-PADAP na determinação de metais tem produzido resultados mais sensíveis que outros ligantes em comparação [8,29].

Figura 8 - Estrutura do PAR



4. ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS

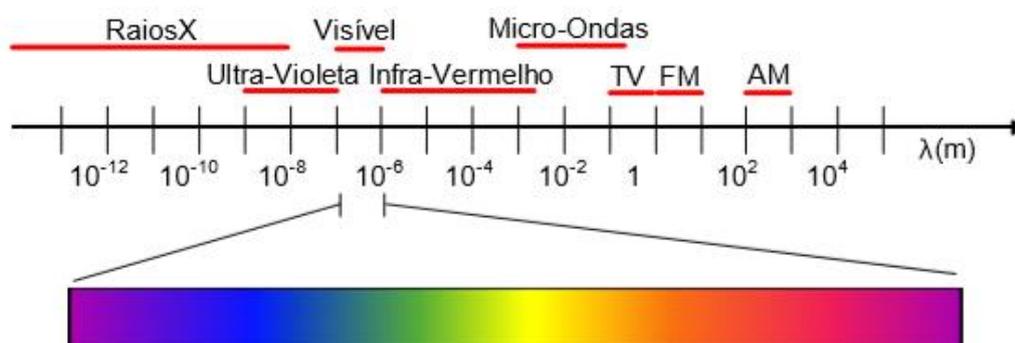
4.1 ASPECTOS TEÓRICOS

A natureza apresenta uma infinidade de cores e, nesse sentido, os objetos ao nosso redor são geralmente caracterizados pela coloração observada ao olharmos para eles. Entretanto, isso pode induzir uma interpretação errada do conceito, levando ao entendimento de que cor possui existência material quando é na verdade uma percepção sensorial [33].

A teoria da cor pressupõe o seu estudo com base em três aspectos importantes interligados entre si. O primeiro deles diz respeito à construção física da cor, relacionando-se a o que ocorre externo ao observador, ou seja, é independente dele. Os demais aspectos possuem interferência do ser humano e são responsáveis pela construção da sua significância. São os aspectos fisiológicos e culturais simbólicos. Quando os raios luminosos atingem os olhos, ocorrem efeitos químicos que influenciam a construção simbólica em cada indivíduo utilizando-os na comunicação, constituindo parte da cultura [51].

Considerando o primeiro aspecto, define-se cor como sendo a sensação percebida em certas organizações nervosas a partir do estímulo da luz. Os raios luminosos (figura 10), ao incidir nos objetos, sofrem fenômenos de absorção, reflexão e emissão sendo que a parcela que chega ao olho humano é suscetível a reações químicas e fisiológicas, que fazem uma primeira interpretação da síntese de raios oriundas das propriedades físicas do objeto [33,51]

Figura 9 - Espectro eletromagnético: raios luminosos situam-se na ordem de 10^{-9} m



Fonte: Google Imagens

As reações que conduzem o aparecimento ou desaparecimento de coloração permitindo a realização de análises quantitativas e qualitativas é o foco de estudo da colorimetria. Quando são investigadas por meio de imagens digitais, a variação da cor oriunda da alteração das soluções é analisada utilizando instrumentos de captura de imagem (*smartphones*, *webcams*, *scanners*, câmeras fotográficas). Essas imagens são armazenadas em formatos específicos e submetidas à decomposição no modelo de cor adotado ou associado a algum parâmetro relacionado para a construção do sinal analítico [4].

Uma imagem é definida basicamente como representação visual de um objeto. Entretanto, para se definir imagem digital torna-se necessário o entendimento sobre funções contínuas e discretas. Matematicamente falando, uma imagem é uma função bi-dimensional $f(x,y)$ de intensidade de luz no qual o par ordenado expressa a intensidade de luz em um determinado ponto de coordenada espacial, conforme a seguinte condição:

$$0 < f(x, y) < \infty \quad Eq(01)$$

A aquisição de uma imagem digital é um processo físico, isto é, ocorre através da detecção física da luz refletida pelo objeto. Sendo assim, a natureza de $f(x,y)$ é caracterizada pelos elementos: quantidade de luz incidente e quantidade de luz refletida pelos elementos presentes na cena. Tais elementos são definidos, respectivamente, por **iluminância** $i(x,y)$ e **reflectância** $r(x,y)$. Assim sendo, a função passa a ser compreendida como um produto da interação entre iluminância e reflectância, conforme ilustrado na equação 02 [34]:

$$f(x, y) = i(x, y).r(x, y) \quad Eq(02)$$

A reflectância pode assumir valores entre zero (total absorção) e um (total reflexão). Já a iluminância compreende intervalo entre zero (sem incidência de luz na cena) até um valor limite de incidência, determinado pela fonte de luz. Têm-se as seguintes condições:

$$0 < r(x, y) < 1 \quad Eq(03)$$

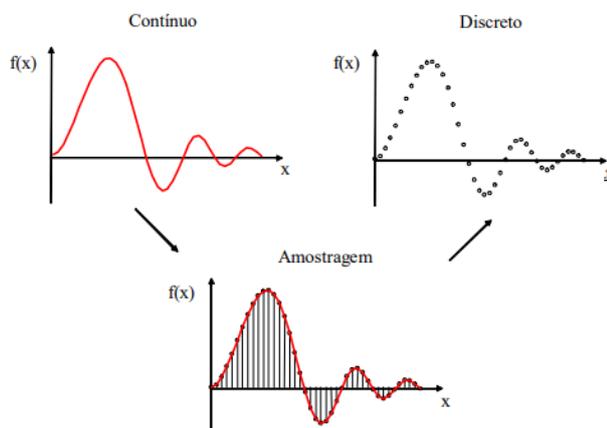
$$0 < i(x, y) < \infty \quad Eq(04)$$

Como demonstrado, uma imagem é matematicamente uma função contínua de duas dimensões (2D) obtida através de um processo físico. Por esse motivo, assumem valores contínuos tanto sobre o eixo x quanto o eixo y [6]. Para se produzir uma imagem digital, esses dados precisam ser convertidos em valores discretos, ou seja, é necessário converter a $f(x,y)$ em função discreta.

Essa necessidade parte do princípio de que o computador só é capaz de trabalhar com números inteiros, e, na melhor das hipóteses, uma aproximação de um número real, chamado de ponto flutuante [35]. Ou seja, cada par ordenado da função imagem que não seja expressa por números inteiros, precisa ser discretizado para que assim possa ser interpretado. Posteriormente, esses pontos são convertidos em linguagem binária, armazenados em *bits*, unicamente expressos pelos números 0 e 1. Para melhor simplificar, juntou-se 8 bits formando a palavra *byte*. Um *byte* é capaz de assumir até $2^8 = 256$ valores distintos variando entre 0 e 255 [36].

A discretização da função imagem ocorre através de dois processos: **amostragem** e **quantização**. A amostragem consiste em tornar pontuais os valores ao longo dos eixos x. A forma mais adotada na maioria dos dispositivos de captura é a uniformemente espaçada, onde cada amostra é repartida em intervalos iguais (figura 11):

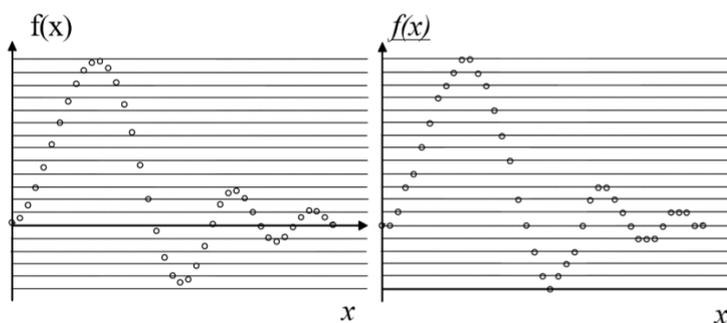
Figura 10 - O processo de amostragem



Fonte: Scuri (2002)

Feita a amostragem, é preciso atribuir valores discretos também para cada $f(x)$ correspondente. O método mais comum consiste em dividir o intervalo entre o valor máximo e mínimo da função em segmentos iguais de acordo com a quantidade de bits definidos para armazenamento da amostra. O número de valores possíveis é 2^{nbits} (Figura 12) [6]:

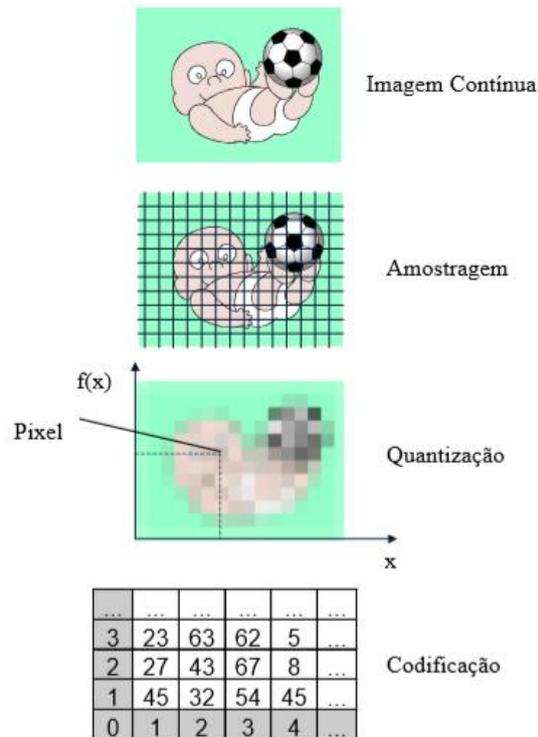
Figura 11 - O processo de quantização



Fonte: Scuri (2002)

A imagem digital gerada continua sendo representada pela mesma função, só que agora com valores inteiros. Esses valores são organizados em uma matriz de dados que representa a cor. A cada ponto dessa matriz, é dado o nome de **pixel** (*Picture element*). A figura 13 mostra de maneira sintetizada o processo de discretização de uma imagem:

Figura 12 - Discretização de uma imagem



Fonte: Scuri (2002)

O pixel é uma grandeza adimensional e quanto maior for o número de elementos amostrados, maior será a sua quantidade na matriz de dados. Configura o menor elemento visual de um dispositivo de visualização de imagem, seja um computador, celular, televisão, entre outros. O seu tamanho é variável conforme a capacidade do aparelho em questão. Assim, os pixels exibidos em uma televisão com resolução full HD de 42 polegadas, por exemplo, são maiores que aqueles exibidos em um smartphone qualquer.

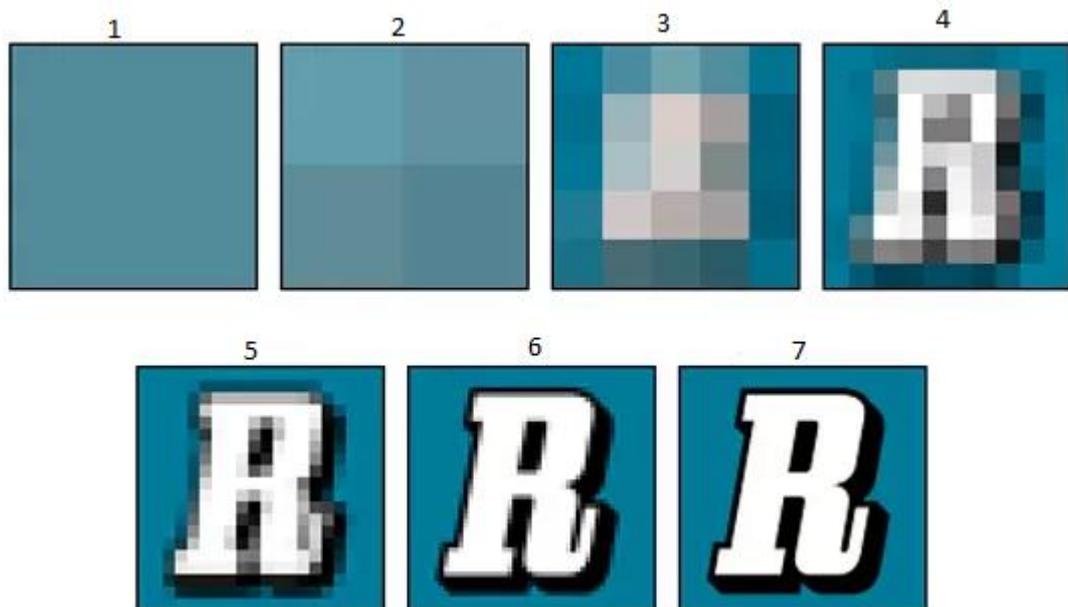
Uma melhor capacidade de gerar pixels maiores não implica em uma boa qualidade de imagem. Na realidade, dispositivos de exibição de imagem maiores fornecem imagens de maiores dimensões o que não significa necessariamente que a qualidade visual é superior quando comparada à dispositivos mais simples.

É possível conhecer uma medida de qualidade da amostragem calculando a razão entre o número de pixels e o tamanho da imagem digital (Equação 05) e a este resultado, dá-se o nome de **resolução** [6,34]. O tamanho da imagem é geralmente expresso por polegadas, onde 1 polegada equivale à 25,4 milímetros.

Quanto mais elementos forem amostrados por polegada (figura 14), melhor será sua qualidade e mais resolvida.

$$\text{Resolução} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ Pixels}}{\text{Tamanho da imagem}} \quad \text{Eq(05)}$$

Figura 13 - Imagens digitais de mesmo tamanho, representando a mesma imagem real e diferentes resoluções: 1-2px; 2-4px, 3-25 px, 4-100px, 5-400px, 6-2500px, 7-10000px



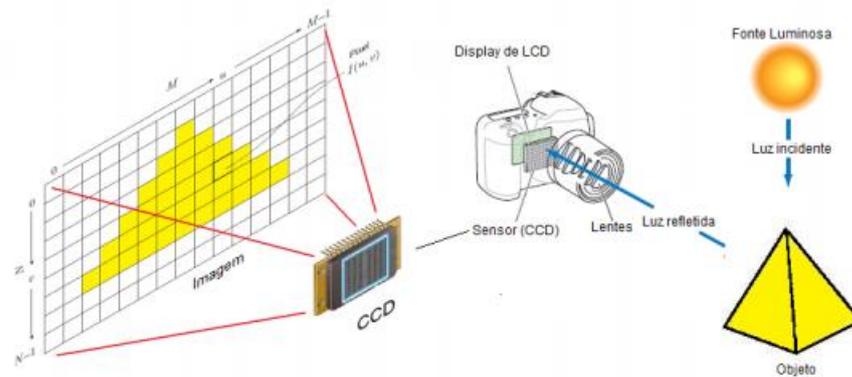
Fonte: TechTudo

A quantidade de pixels amostrados em instrumentos de captura depende das características do sensor presente. Basicamente, os sensores são estruturas fotossensíveis que captam a energia luminosa advinda da lente, converte em carga elétrica e posteriormente em sinal elétrico. Cada unidade de conversão é responsável por gerar um pixel então, quanto maior o número de células do sensor espera-se que haja uma melhor resolução [34].

Isso ocorre porque o processo de aquisição de uma imagem digital (figura 15) não depende exclusivamente do sensor, mas também dos demais componentes da câmera. A natureza da lente e a intensidade de exposição à radiação luminosa,

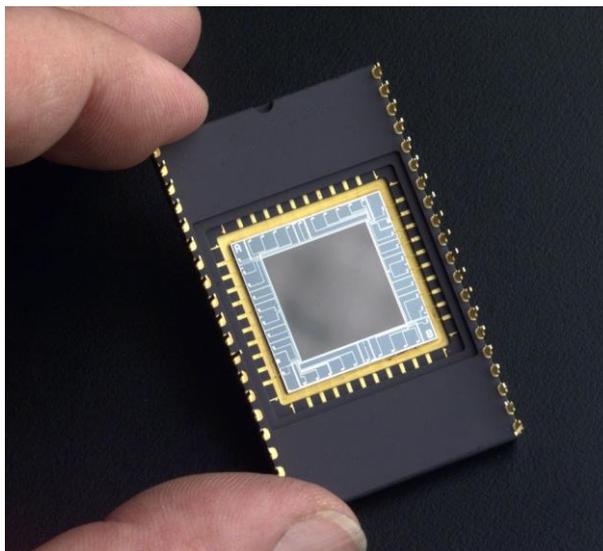
podendo levar ao aquecimento do sistema, são parâmetros que podem ocasionar a geração de ruídos e interferir na qualidade das imagens [58].

Figura 14 - Esquema de aquisição de imagem por uma câmera digital (CCD)

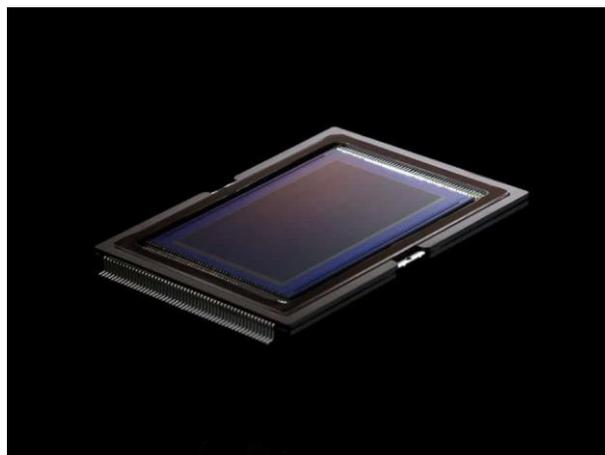


Fonte: Santos, J. L. O. (2013)

Há dois tipos comuns de sensores: o CCD (*Charge Coupled Devices*) (figura 16) e o CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) (figura 17). A principal diferença entre eles é o mecanismo utilizado na geração dos sinais elétricos. Em um sensor do tipo CCD, cada unidade de conversão transfere a carga em forma de sinal analógico para fora do sensor. Dessa forma, a conversão em sinal digital ocorre externamente ao sensor. Em um CMOS, cada estrutura de conversão de sinal possui seu sistema de amplificação de modo que, para fora do sensor, já é enviado o sinal digital [52,53,55].

Figura 15 - Sensor do tipo CCD

Fonte: Blog eMania

Figura 16 - Sensor do tipo CMOS

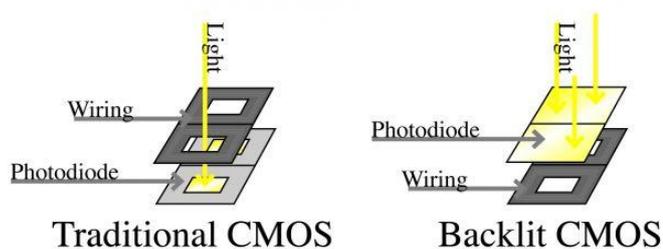
Fonte: Blog eMania

Entre os anos 90 e 2000, quando a fotografia digital começava a se disseminar, os sensores CCD exerciam certo domínio na produção de câmeras e dispositivos de imagem. Isso porque, embora fossem mais custosos que os sensores CMOS, produziam imagens com melhores resoluções e eram menos suscetíveis a ruídos, devido à existência de um único amplificador externo [56]. A vantagem da utilização de um CMOS consistia em um menor custo e consumo de energia, entretanto, com qualidade inferior.

A situação começou a mudar mais recentemente, quando os avanços tecnológicos propuseram melhorias ao sistema CMOS. As problemáticas referentes

aos ruídos foram resolvidas com uso dos sensores retroiluminados que nada mais é do que uma modificação em sua estrutura (Figura 18). O sensor passa a se posicionar posteriormente a entrada de luz, o que diminui a necessidade de amplificação e reduz a geração de ruído [57].

Figura 17 - Entrada de luz em um sensor CMOS tradicional vs retroiluminado

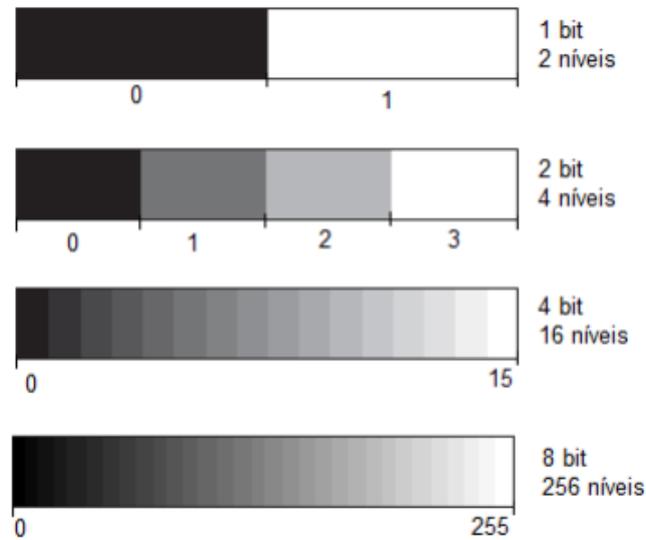


Fonte: Blog eMania

Atualmente, os sensores CMOS da nova geração possuem inúmeras vantagens em relação ao CCD, uma vez que foram capazes de melhorar sua qualidade mantendo o baixo custo. Embora sejam mais complexos em termos estruturais, o que poderia inferir que os custos fossem menores para a produção de um CCD, esses sensores configuram uma referência em outros âmbitos tecnológicos, tais como, produção de microprocessadores, controladores e outros componentes eletrônicos. Sendo assim, as linhas de fabricação existentes em todo mundo são várias o que os beneficia economicamente em larga escala [54].

Uma importante característica dos sensores é que, apesar de produzir imagens coloridas, eles não são capazes de distinguir comprimentos de onda, sendo sensíveis apenas para intensidade luminosa. Desta forma, sem o uso de nenhum artifício, só estariam aptos para gerar imagens monocromáticas em diferentes tons de cinza [4,34]. A figura 19 representa um modelo dos níveis discretos monocromáticos em um sensor:

Figura 18 - Diferentes tons de cinza em um pixel

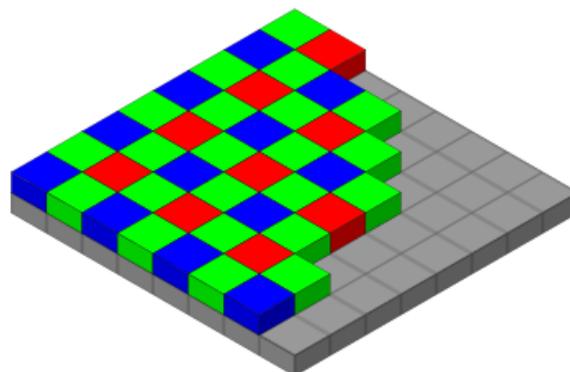


Fonte: Santos, J. L. O. (2013)

Conforme foi discutido, o processo de discretização da função imagem gera uma matriz de dados que representa a cor. Em cada pixel é utilizado 1 *byte* que corresponde ao agrupamento de 8 *bits*, isso possibilita a combinação de $2^8 = 256$ possibilidades de tons de cinza que assumem valores entre 0 e 255 [35].

Para que os sensores sejam capazes de gerar imagens coloridas, costuma-se incorporá-los em sua estrutura um filtro (*Color Bayer*) em cada elemento de detecção. Esse sistema torna-se capaz de distinguir os comprimentos de onda e cada pixel gerado contribui para imagem final com três componentes de cores diferentes, vermelho verde e azul, como pode ser visto na figura 20 [4,35].

Figura 19 - Arranjo de filtro Bayer sobre um conjunto de Pixel de um sensor de imagem



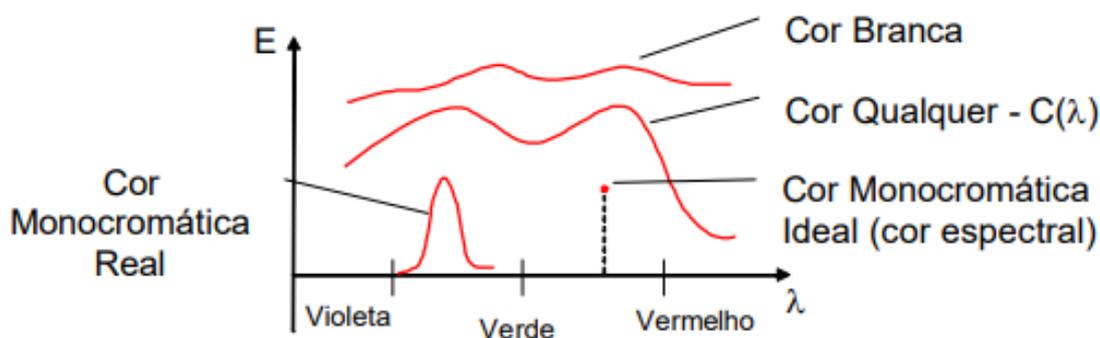
Fonte: Santos, J. L. O. (2013)

Assumindo agora a existência de três componentes, chega-se a um total de $2^8 \times 2^8 \times 2^8$, ou seja, mais de 16 milhões de possibilidade de cores podem ser geradas através da combinação entre vermelho, verde e azul sendo que alguns experimentos relatam que o olho humano é capaz de distinguir apenas 400 mil cores diferentes [35].

4.2 ESPAÇOS DE CORES

O conceito de cor está diretamente relacionado à luz visível, como já abordado no tópico anterior. Sabe-se que a luz possui característica dualística e ao percorrer o espaço, ora se comporta como onda e ora como partícula. O estudo de cor considera especificamente seu caráter ondulatório. A luz deve ser interpretada como radiação eletromagnética que possui certa quantidade de energia para cada comprimento de onda.

Figura 20 - Distribuição espectral de potência



Fonte: Scuri (2002)

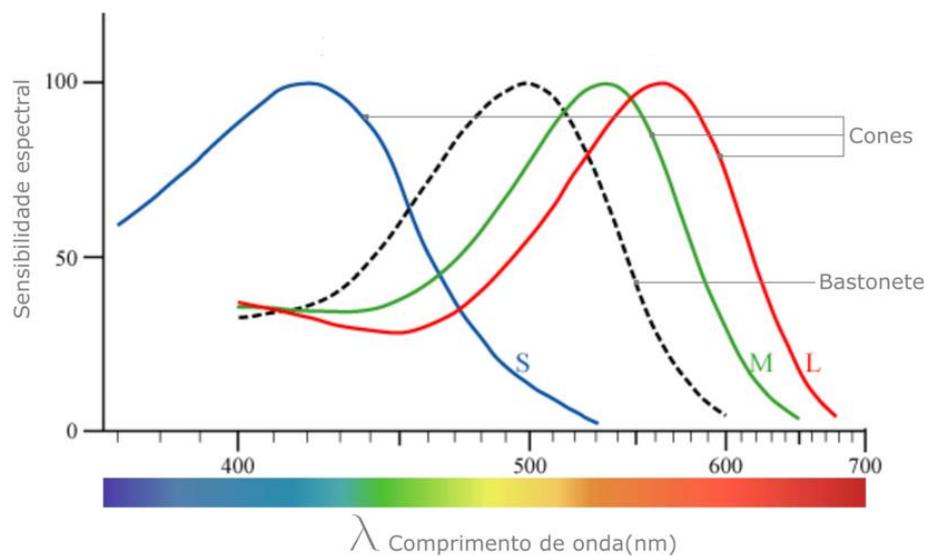
A figura 21 mostra a distribuição de energia ao longo da região do espectro eletromagnético visível, que varia na faixa de 380nm a 700nm e é possível fazer algumas inferências interessantes ao interpretá-la. Uma cor monocromática teria um comportamento ideal se a luz característica comportasse um valor pontual de comprimento de onda. Entretanto, na realidade, uma cor monocromática absorve energia em uma determinada faixa sendo que dentro dela há um comprimento de onda predominante, ou seja, onde se absorve um valor máximo (ou uma banda). A cor branca é observada quando há absorção em toda região do espectro. De

maneira oposta, quando não há absorção de energia, considera-se ausência de luz, observando a “cor preta”.

As cores podem ser geradas a partir de três processos existentes na natureza. No processo **aditivo**, combinam-se vários raios luminosos para formar um novo raio. É comumente utilizado em monitores, câmeras e televisões. Em um processo **substrativo**, o raio de luz passa em um filtro que elimina alguns comprimentos, gerando uma nova cor, sendo esse processo aplicado em retroprojetores. No processo por **pigmentação**, a luz passa por vários eventos (reflexão, transmissão, absorção) o que nos permite a observação em pinturas e trabalhos impressos [35].

Contudo, a percepção de cor é pessoal e para melhor compreender é preciso entender como a informação chega até o cérebro. O olho humano possui dois tipos de sensores: bastonetes e cones. Os bastonetes possuem sensibilidade ponderada no espectro, não sendo capaz de distinguir cor, mas dando noção espacial o que permite distinguir objetos em uma imagem. Os cones podem ser de três tipos: S (*short*), M (*médium*) e L (*long*) e cada um possui sensibilidade máxima para um comprimento de onda em diferentes regiões (figura 22) [34,35,59].

Figura 21 – Sensibilidade dos sensores da retina em função do comprimento de onda



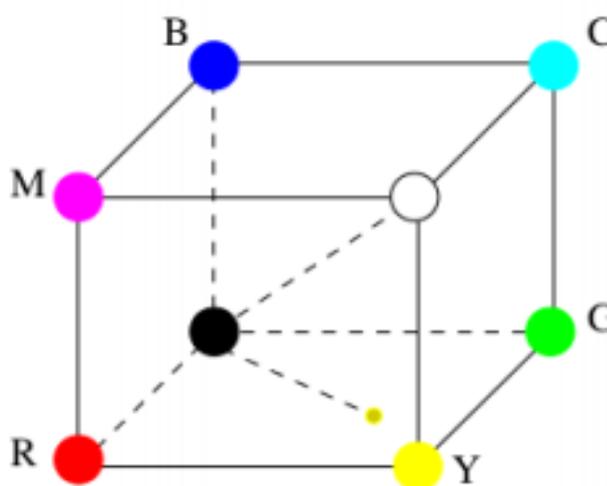
Fonte: Blog Corisectelmo

Os comprimentos de onda são detectados pelos três tipos de cone, porém, isso ocorre com diferentes sensibilidades. O cone S é mais sensível na região de 450nm (azul), o M em 550nm (verde) e o L em 600nm (vermelho). Por exemplo, a luz no comprimento de onda de 500nm corresponde à sensibilidade máxima em torno de 20% (S), 60% (M) e 50% (L). A diferença entre as três contribuições permite que o cérebro associe o comprimento de onda a uma cor, caracterizando a chamada tricromacidade [4,61].

Baseado no funcionamento do olho humano, a comissão internacional de iluminação (*Commision internationale de l'Éclairage*), em 1931, desenvolveu um modelo matemático denominado CIE-RGB que utiliza as cores primárias vermelha (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*) combinando-as aditivamente para representar todo espectro visível.

O espaço de cor RGB é tradicionalmente representado por um cubo em coordenadas cartesianas onde cada eixo corresponde a uma cor primária. Os valores assumidos dentro da coordenadas podem variar entre 0 e 1, correspondendo ao máximo e mínimo de intensidade. Seu espaço complementar é o CMY (*cyan, magenta e yellow*) onde as contribuições de cada cor complementar é obtida subtraindo uma cor primária: Cyan ($255 - R$) elimina o vermelho, Magenta ($255 - G$) elimina o verde e Yellow ($255 - B$) elimina o azul (figura 23) [6].

Figura 22 - Espaço de cor RGB e CMY

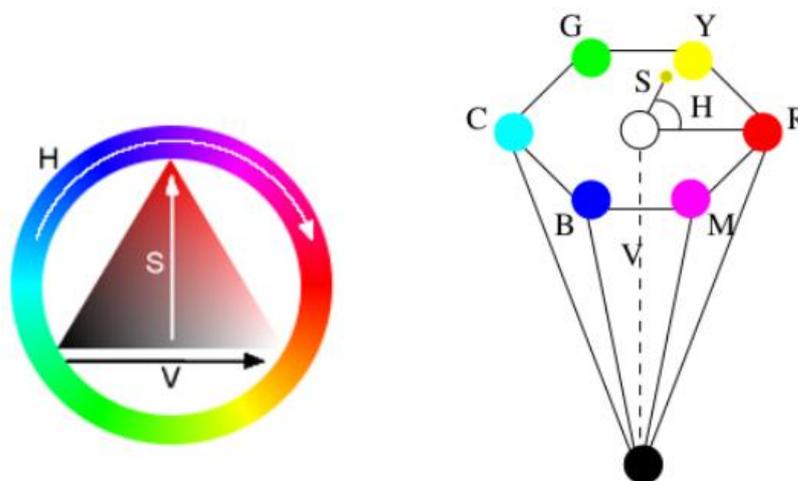


Fonte: MARTINS, S. B.

O sistema RGB regula as cores do corpo que emitem luz e o sistema CMY regula as cores de corpos que as refletem (opacos). O primeiro é utilizado em fotografia digital, televisão, vídeos, entre outros, e o segundo em impressoras domésticas e artes plásticas. O CMY conta ainda com uma versão industrial, o CMYK (*ciano, magenta, amarelo e preto/key*), no qual a cor preta é adicionada, pois não pode ser obtida pela combinação das demais. A letra K vem de chave (*key*), pois a cor preta é utilizada para regula os detalhes da impressão substituindo o uso de pigmentos mais caros, configurando uma alternativa mais barata [68].

Um terceiro espaço de cor pode ser obtido derivado do RGB. É o espaço HSV que é a representação de três grandezas que definem a cor. A componente H (matiz) corresponde ao comprimento de onda dominante, o S (saturação) define o grau de pureza em relação ao branco e o V (valor ou brilho) refere-se à intensidade da luz. A representação desse espaço, exibida na figura 24, é feita em um cone hexagonal em que cada vértice corresponde às cores aditivas e substrativas.

Figura 23 - Espaço de cor HSV



Fonte: MARTINS, S. B.

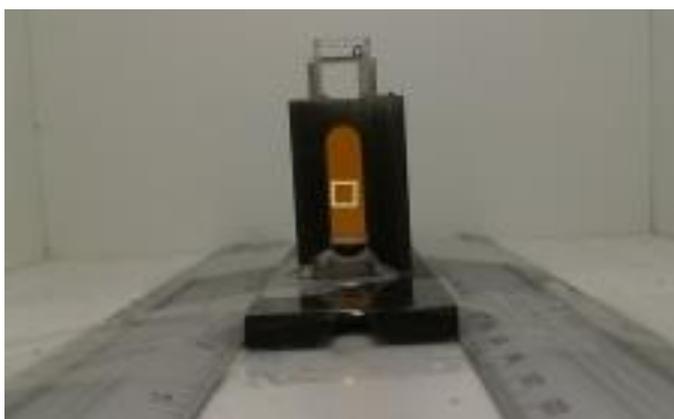
A transformação do espaço de cor RGB em HSV é realizada aplicando uma série de equações. Isso conduz à investigação em um espaço uniforme, classificando as cores em relação à forma como o olho humano percebe. O principal interesse em sua utilização é a possibilidade de trabalhar uma propriedade que se relaciona diretamente com o comprimento de onda [4,60]. Estudos demonstraram

que o componente H é mais robusto a variação de luz na iluminação da cena e apresenta melhor resposta a variação das concentrações [61-63].

4.3 PROCESSAMENTO DE DADOS

Um diferencial em análise de imagens digitais é a possibilidade de aplicar uma ou mais formas de processamento para tratamento dos dados. Após serem fotografadas e armazenadas no formato adequado, as imagens são submetidas a *softwares* específicos que extraem as informações necessárias para a construção do parâmetro colorimétrico analítico. Para isso, é preciso definir uma região de interesse (ROI) que corresponde à área da imagem a qual será obtida tais informações (figura 25):

Figura 24 - Seleção da ROI



Fonte: Acervo próprio

Esta região deve representar, em todas as imagens, a mesma área e posição a ser recortada, por isso, são mantidas constantes numa mesma análise. Uma variação em um desses parâmetros pode conduzir a um recorte com pontos de iluminação distintos o que pode introduzir erros ao extrair as informações. Uma vez que a ROI é obtida, o *software* extrai as informações relacionadas à solução amostral. A literatura reporta diversos parâmetros colorimétricos que podem ser aplicados para estabelecer uma relação entre a concentração do analito e a cor [4,24,38,40].

A absorvância efetiva é um dos parâmetros mais comuns, sendo semelhante à relação matemática aplicada na lei de Beer. Seleciona-se uma das componentes no modelo RGB, geralmente a que apresenta a maior variação entre os pontos extremos da curva analítica e aplica-se esses dados na equação a seguir:

$$A_{(R,G,B)} = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right) \quad Eq(06)$$

Onde A é a absorvância efetiva, P é o valor R, G ou B da média ou moda do padrão ou amostra e P₀ é o valor do branco analítico.

Kohl e colaboradores realizaram experimentos com corante alimentício diluído em concentrações conhecidas para demonstrar o princípio da absorvância efetiva através da análise da cor complementar. Utilizando as intensidades do canal B (*blue*), traçaram a curva analítica e compararam com aquela obtida por absorção molecular no comprimento de onda de 405nm. Os coeficientes angulares não demonstraram diferença e concluíram que sob condições especiais e parâmetros físicos bem estabelecidos, a análise de imagem pode ser uma alternativa ao espectrofotômetro [64].

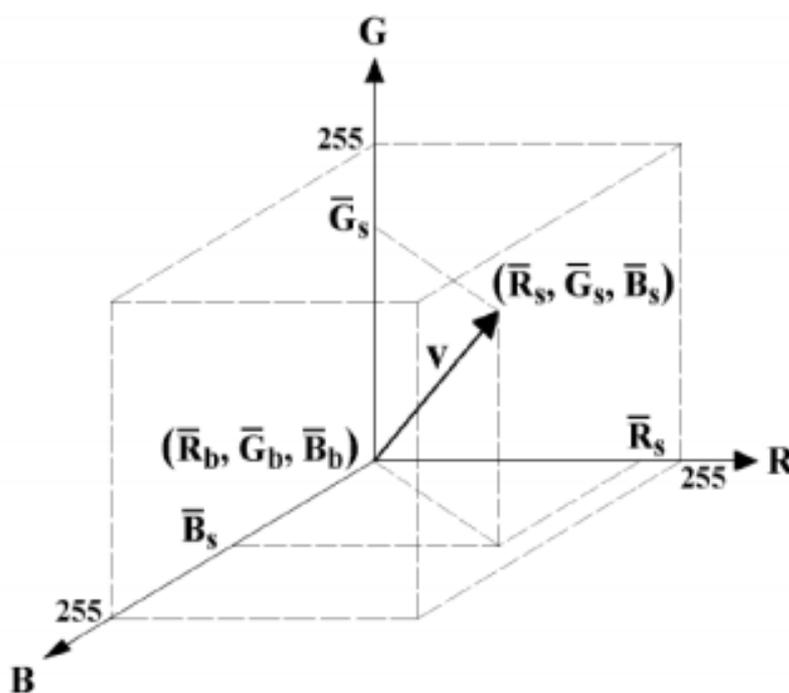
Outro parâmetro analítico que pode ser estabelecido é uso do canal de cor complementar a absorção da solução, gerando uma resposta através da seguinte expressão:

$$S = 255 - (R, G \text{ ou } B) \quad Eq(07)$$

Onde R, G ou B é a intensidade da radiação refletida subtraída Do valor para reflexão total (255), obtendo-se valores proporcionais à intensidade de cor. A construção desse parâmetro faz referência à intensidade real enquanto que o parâmetro anterior refere-se à fração absorvida. Soares e colaboradores desenvolveram *spot tests* para determinação de metanol e biodiesel em misturas de diesel. Em ambas as determinações, o canal G foi o complementar a coloração do produto da reação e os sinais analíticos foram construídos a partir da equação 07 [40,65].

A literatura reporta também aplicações nas quais o parâmetro estabelecido é uma variável obtida da combinação das três coordenadas. Lyra propôs um modelo matemático baseado no conceito de norma de vetores utilizando o espaço RGB para construção de uma resposta analítica. O vetor v é associado a cada solução padrão ou amostra conforme modelo da figura 26 [66]:

Figura 25 - Espaço RGB e a posição do vetor v



Fonte: LYRA, W. S. (2008)

O cálculo da norma vetor é obtido subtraindo os valores médios de R, G, B das amostras e padrões dos valores médios do branco. A norma é então determinada pela seguinte equação:

$$||\vec{v}|| = \sqrt{\bar{R}^2_{S-B} + \bar{G}^2_{S-B} + \bar{B}^2_{S-B}} \quad Eq(08)$$

Silva desenvolveu um método por quimioluminescência para determinação de Cr(VI). A princípio, investigou a aplicação de cada canal individual na elaboração da curva de calibração. Observou que os canais R e G tinha pouca contribuição e o

canal B chegava a saturação em nível de concentração médio dos padrões. Ao aplicar a norma de vetores, obteve resultados satisfatórios [67].

Outros procedimentos podem ser encontrados para elaboração do parâmetro analítico. De modo geral, quando a alteração de cor envolve uma única faixa, variando de mais clara a mais escura, as intensidades RGB respondem bem. Se a mudança ocorre entre duas cores distintas, é comum utilizar outros espaços de cores.

5.OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é elaborar estratégias analíticas baseadas em imagens digitais para determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de frutas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aplicar planejamento fatorial completo para otimização das variáveis;
- ✓ Estudar a influência de parâmetros instrumentais do sistema de detecção de imagens digitais;
- ✓ Elaborar estratégias analíticas utilizando os cromóforos 1,10-fenantrolina e Br-PADAP;
- ✓ Estudar diferentes formas de processamento de dados em imagem digital;
- ✓ Avaliar a exatidão do método empregando Espectrofotometria de absorção molecular;
- ✓ Aplicar as metodologias desenvolvidas em amostras de sucos naturais de frutas.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

✓ Sistema de detecção de imagem digital (25cmx33cmx26cm) composto por LED, sensor, câmera de vídeo *webcam Microsoft 720 HD* com sensor CMOS acopladas e suporte para cubeta;

- ✓ Espectrofotômetro de absorção molecular (*QUIMIS G798U*);
- ✓ Sistema Milli-Q 18.2 M Ωcm^{-1} (*Sartorius arium comfort*);
- ✓ Placa de aquecimento (*IKA C-MAG HS7*);
- ✓ Cubetas de vidro;
- ✓ pHmetro (*OHAUS STARTER 3100*);
- ✓ Solução padrão de ferro(III) 1000 mg L⁻¹ (*SpecSol*);
- ✓ L-Ácido ascórbico – C₆H₈O₆ - (*Synth*);
- ✓ Br-PADAP – C₁₅H₁₇BrN₄O (*Sigma-Aldrich*);
- ✓ 1,10-fenantrolina – C₁₂H₈N₂ (*Sigma-Aldrich*);
- ✓ Ácido acético glacial – CH₃COOH (*Synth*);
- ✓ Acetato de Sódio - CH₃COO⁻Na⁺ - (*Synth*);
- ✓ Ácido clorídrico PA - HCl - (*Merck*)

6.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (18,2 M Ω cm⁻¹) fornecida pelo sistema Arium Comfort (Sartorius, Goettingen, Alemanha) e previamente fervida a fins de evitar possível interferência de oxigênio dissolvido que poderia oxidar o ácido ascórbico.

6.2.1 ÁCIDO ASCÓRBICO (10 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹)

A solução de 100 mg L⁻¹ foi preparada pesando aproximadamente 10 mg de ácido ascórbico em um béquer. Em seguida, foi diluída, transferida para um balão volumétrico de 100 mL e posteriormente completou-se com água.

Para o preparo da solução 10 mg L⁻¹, foi preparada inicialmente uma solução intermediária. Pesou-se aproximadamente 20 mg de ácido ascórbico em um béquer,

dilui-se e transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL, completando até a marca. Desta solução, cuja concentração é 200 mg L⁻¹, retirou-se uma alíquota de 2,5 mL transferindo para um balão de 50 mL, completando com água. Devido à alta instabilidade do ácido ascórbico, essas soluções foram preparadas diariamente.

6.2.2 1,10 – FENANTROLINA 0,10% (m/v)

Foi preparada pesando aproximadamente 100 mg em um béquer, adicionando cerca de 20 mL água e uma gota de ácido clorídrico PA. O béquer foi levado a placa de aquecimento para total dissolução do sólido e posteriormente, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL, avolumando-o em seguida.

6.2.3 SOLUÇÃO TAMPÃO 1 mol L⁻¹

Pesou-se, em um béquer, uma massa aproximada de acetato de sódio (CH₃COO⁻Na⁺) diluindo com um pouco de água. Em seguida, adicionou-se um volume aproximado de ácido acético glacial (CH₃COOH). Realizou-se a leitura no pHmetro para verificar se foi alcançado o pH desejado. Nos casos negativos, o ajuste foi feito através da adição de pequenos volumes do ácido. Em seguida, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 50 mL e avolumado. A tabela 1 mostra os valores de massa e volume aproximados para cada solução tampão preparada:

Tabela 1 - Preparo de soluções-tampão

pH	Acetato de sódio (mg)	Ácido acético (mL)
3,75	373	2,60
4,00	620	2,43
4,25	968	2,19
4,75	2051	1,43
5,25	3117	0,69

6.2.4 Br-PADAP (0,015%, 0,020% e 0,025%) (m/v)

Para o preparo da solução 0,015% (m/v), pesou-se em um béquer aproximadamente 7,5 mg do reagente Br-PADAP adicionando cerca 2 mL de etanol para dissolução. Em seguida, foi acrescentado 20 mL de triton X-100 (8%). O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL completando até a marca com etanol. Para as concentrações de 0,020% e 0,025% (m/v) adotou-se o mesmo procedimento com as massas de aproximadamente 10 mg e 12,5 mg.

6.2.5 EDTA (0,05%, 0,10% e 0,15%) (m/v)

Para o preparo da solução 0,05% (m/v), pesou-se em um béquer, aproximadamente 25 mg de sal sódico de EDTA. O conteúdo foi diluído com água e transferido para um balão volumétrico de 50 mL, aferindo na marca. Para as concentrações de 0,10% e 0,15% (m/v) adotou-se o mesmo procedimento com as massas de aproximadamente 50 mg e 75 mg.

6.2.6 TRITON X-100 8% (m/v)

Foi pesado aproximadamente 2000 mg do surfactante triton X-100, adicionando-se em seguida 10 mL de etanol. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se até a marca com água ultrapura.

6.3 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram adquiridas em supermercados e feiras livres na cidade de Salvador, no período de setembro de 2018 à janeiro de 2020. Foram escolhidas as frutas: abacaxi, ameixa, caju, jenipapo, laranja, lima, limão, manga, mangostão, maracujá, melancia, melão, tangerina e uva.

6.4 AQUISIÇÃO E AVALIAÇÃO DE DADOS RGB

O sistema de detecção de imagens consiste em uma caixa de madeira fechada com dimensões 25cmx33cmx26cm. O sistema possui um controle de luz no compartimento interno para garantir a reprodutibilidade na captura das imagens. A caixa é construída de madeira branca para evitar efeitos de reflexão. Possui uma abertura na parte superior e LED acoplado, eliminando a necessidade de flash durante a captura das imagens. As imagens digitais das soluções cromogênicas foram registradas utilizando uma câmera webcam HD 720p com sensor CMOS.

Figura 26 - Visão externa do sistema de detecção de imagens



Fonte: Acervo próprio

Figura 27 - Visão interna do sistema de detector de imagens



Fonte: Acervo próprio

Durante os experimentos, as imagens digitais foram armazenadas no formato JPG e a região de interesse (ROI) foi definida em uma posição fixa, utilizando os softwares *image J* e *Chemostat* [37, 38]. Esses programas permitem a aquisição de dados de cada canal: *red* (R), *green* (G), *blue* (B). Os dados obtidos foram avaliados utilizando duas formas de processamento.

A primeira forma é compatível com a lei de Beer, definida como $-\log(P/P_0)$ no qual P é o valor R, G ou B (média ou moda) do padrão ou solução amostra e P_0 é o valor R, G ou B para o branco analítico [39]. A segunda forma de processamento envolve a determinação do sinal analítico (S) utilizando a expressão $S = 255 - (R, G \text{ ou } B)$ onde R, G ou B é a média ou moda do valor no canal trabalhado [40].

6.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO ANALÍTICO

Durante a otimização dos procedimentos, foram utilizadas metodologias univariadas e multivariadas. Para estabelecer as melhores condições das reações colorimétricas, aplicou-se planejamento fatorial completo de dois níveis [41-44]. Para

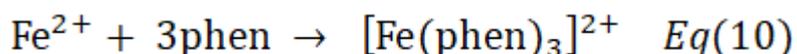
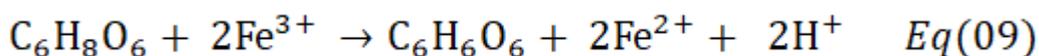
o reagente 1,10-fenantrolina os fatores estudados foram: pH, medição do tempo após adição do ácido ascórbico e volume do reagente cromogênico. Para o reagente Br-PADAP, estudou-se os fatores: pH, concentração do Br-PADAP e concentração do EDTA. A distância da *webcam* à cubeta e a área da ROI também foram estudadas em metodologia univariada.

7. ESTRATÉGIA ANALÍTICA EMPREGANDO 1,10-FENANTROLINA

7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

7.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA

A metodologia é baseada na redução do Fe(III) à Fe(II) devido à adição de ácido ascórbico. Em meio ácido, o íon ferroso forma um complexo estável com a 1,10-fenantrolina (Equações 09 e 10):



Para estabelecer as melhores condições de análise, foi empregado um planejamento fatorial completo de três níveis com replicatas no ponto central avaliando os seguintes parâmetros: pH da solução-tampão, tempo de reação de oxirredução e volume de 1,10-fenantrolina. A variável resposta foi definida como o resultado da forma de processamento $S = 255 - B$ onde B refere-se ao valor da contribuição do canal *blue* (azul) na composição da cor. A tabela 2 mostra os domínios experimentais estudados com valores codificados, valores de RGB obtidos e resposta e a tabela 3 apresenta os valores reais:

Tabela 2 - Matriz do planejamento para reação colorimétrica com 1,10-fenantrolina

Experimento	Volume (μL)	Tempo (min)	pH	Canal R	Canal G	Canal B	Resposta (255 - B)
1	-	-	-	171	108	52	203
2	+	-	-	177	111	53	202
3	-	+	-	176	111	54	201
4	+	+	-	175	111	52	203
5	-	-	+	176	111	55	200
6	+	-	+	175	111	51	204
7	-	+	+	177	111	54	201
8	+	+	+	176	111	49	206
9 (PC)	0	0	0	172	109	51	204
10 (PC)	0	0	0	176	111	50	205
11 (PC)	0	0	0	177	111	52	203

Tabela 3 - Valores reais do planejamento (1,10-fenantrolina)

Codificação	Volume (μL)	Tempo (min)	pH
-	400	1	3,75
0	500	3	4,00
+	600	5	4,25

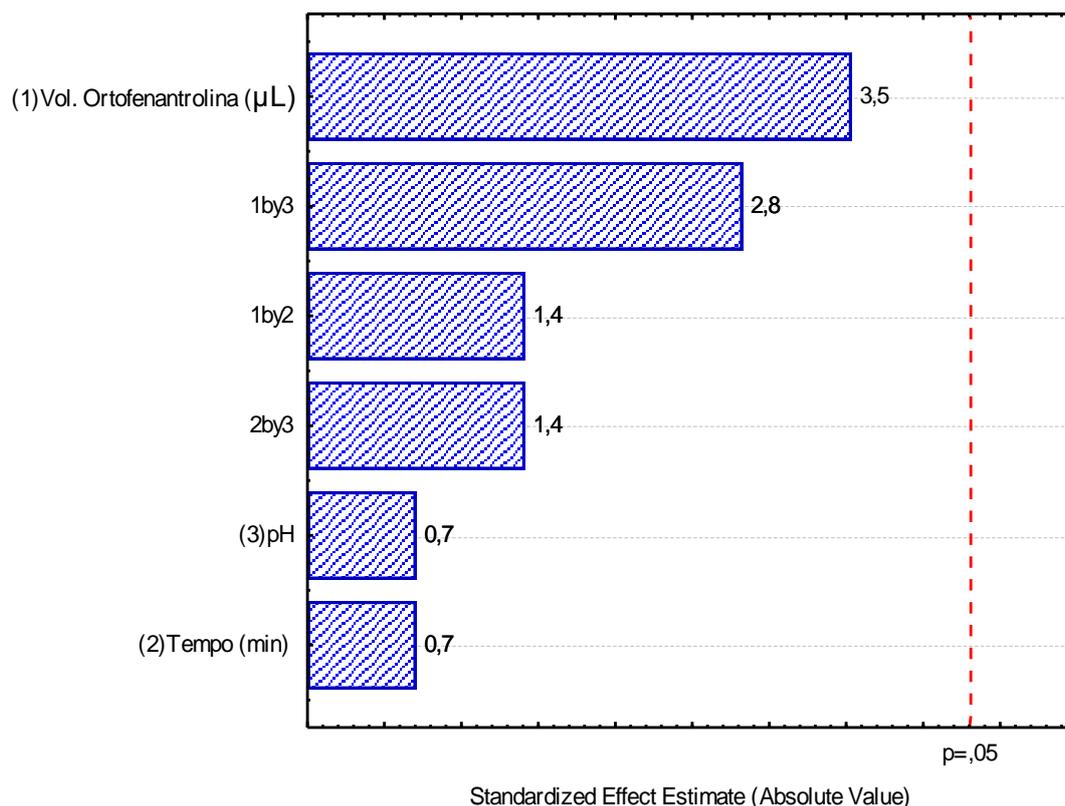
A avaliação do planejamento foi realizada através do cálculo do efeito dos fatores e suas interações, sendo expressas com intervalo de confiança conforme pode ser visto na tabela 4. Pode-se observar que todos apresentaram efeito positivo, contudo, a faixa de intervalo de confiança contempla o valor zero concluindo assim que não são significativos.

Tabela 4 - Efeito dos fatores e suas interações

Fatores e interações	Efeitos
Volume de 1,10-fenantrolina	2,5 ± 3,0
Tempo de reação	0,5 ± 3,0
pH	0,5 ± 3,0
Volume x Tempo	1,0 ± 3,0
Volume x pH	2,0 ± 3,0
Tempo x pH	1,0 ± 3,0

Na figura 29, encontra-se o gráfico de Pareto referente à otimização:

Figura 28 - Gráfico de Pareto referente a otimização com 1,10-fenantrolina



Com base nos resultados, a metodologia demonstrou-se robusta para todos os fatores estudados. Nesse sentido, o seguinte procedimento experimental foi adotado: transferir aproximadamente 100 mg do suco de fruta para um balão volumétrico de 10 mL seguido de 40 μL da solução padrão de Fe(III) 1000 mg L⁻¹.

Aguardar 3 minutos e posteriormente, adicionar 500 μ L de 1,10-fenantrolina 0,10% e 1 mL do tampão acetato pH 4,25. Completar com água ultrapura, transferir a solução final para cubeta de vidro e levar ao sistema de detecção para aquisição da imagem digital.

7.1.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MEDIDA

A distância entre a *webcam* e a cubeta foi avaliada empregando otimização univariada. Foram construídas curvas para as distâncias de 5, 10 e 15 cm. A tabela 5 mostra as inclinações e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados nesse estudo.

Tabela 5 - Influência entre a distância da cubeta e webcam na sensibilidade do método

Distância	Parâmetro	A = $-\log(p/p_0)$	S = 255 - B
5 cm	Inclinação	$0,0775 \pm 0,0091$	$16,91 \pm 3,71$
	LOD (mg/100g)	0,204	0,018
	LOQ (mg/100g)	0,681	0,059
10 cm	Inclinação	$0,0762 \pm 0,0085$	$16,08 \pm 3,14$
	LOD (mg/100g)	0,829	0,036
	LOQ (mg/100g)	2,762	0,119
15 cm	Inclinação	$0,0757 \pm 0,0058$	$13,92 \pm 2,69$
	LOD (mg/100g)	1,479	0,051
	LOQ (mg/100g)	4,931	0,169

Observando os dados, percebe-se que a faixa de distância estudada não afeta a sensibilidade do método, considerando as inclinações das curvas analíticas expressas com intervalo de confiança a um nível mínimo de 95%. É possível observar também que os limites de detecção e quantificação são maiores com o aumento da distância entre a câmera e a cubeta. Sendo assim, convencionou-se utilizar a distância de 10 cm uma vez que a distância de 5 cm, por ser muito próximo a *webcam*, poderia causar eventuais acidentes prejudicando o sistema.

O outro parâmetro que foi avaliado frente à sensibilidade do método foi a região de interesse (ROI). Foram estudadas as áreas de 800, 1600 e 3175 px². Os

resultados estão expressos na tabela 6 e mostram que não há diferença significativa entre as inclinações obtidas para variação da ROI, a um nível de 95% de confiança.

Tabela 6 - Influência da área da ROI (px²) na sensibilidade do método

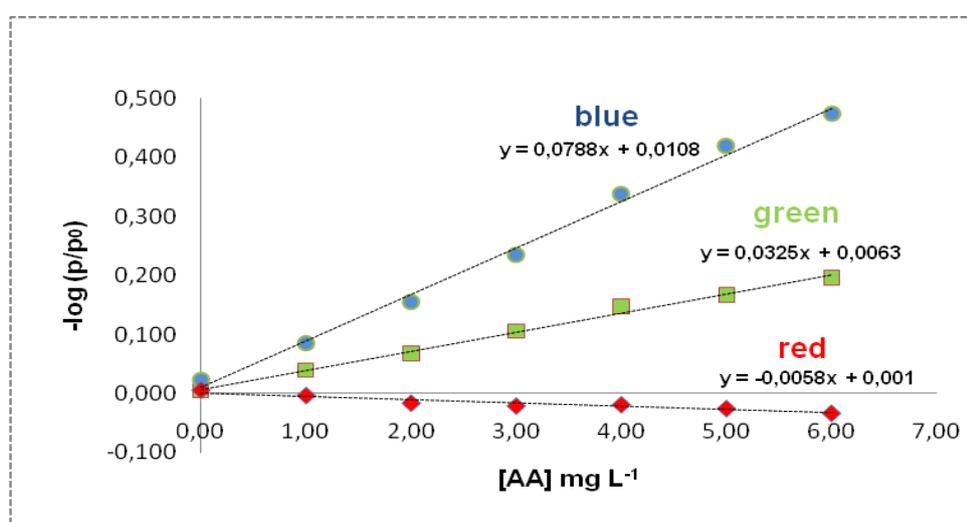
ROI (px ²)	A = $-\log(p/p_0)$	S = 255 - B
800	0,0780 ± 0,0066	14,20 ± 2,71
1600	0,0779 ± 0,0062	14,14 ± 2,72
3175	0,0757 ± 0,0058	13,92 ± 2,69

7.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

7.2.1 LINEARIDADE

A linearidade está relacionada à capacidade de um método em produzir resultados proporcionais à concentração da espécie em estudo [45]. Neste caso, a espécie é o complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ que possui relação indireta com a concentração do ácido ascórbico. Primeiramente foi realizado um teste para avaliação de qual dos canais era o mais adequado para realização das análises. Nesse sentido, curvas de calibração foram construídas para os três canais (*red*, *green* e *blue*) utilizando o processamento compatível a lei de Beer conforme pode ser visto na figura 30:

Figura 29 - Curvas de calibração usando os canais Red, Green e Blue – 1,10 – fenantrolina



Pelas curvas traçadas é possível observar que o canal *red* não exibe uma relação diretamente proporcional entre a curva de calibração e a resposta analítica. As variações são inversas e muito pequenas. Entre os canais *green* e *blue*, o segundo mostrou-se mais sensível (maior coeficiente angular) e por isso este foi eleito para tratamento de dados. A curva demonstrou-se linear na faixa de concentração de 0,0 à 6,0 mg L⁻¹. A tabela 7 apresenta os dados da calibração:

Tabela 7 - Determinação da curva de calibração - 1,10-fenantrolina

[AA] mg L ⁻¹	Canal R	Canal G	Canal B	A = -log(p/p ₀)	S = 255 - B
0,0	142	145	126	0,023	129
1,0	143	132	104	0,085	151
2,0	147	124	87	0,156	168
3,0	149	113	73	0,235	182
4,0	148	103	58	0,339	197
5,0	150	98	49	0,420	206
6,0	153	92	42	0,474	213
Faixa dinâmica linear (mg/100g)				2,857 – 60,000	0,072 – 60,000

7.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima do analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada com nível de segurança. É o menor valor em que se é possível distinguir sinal analítico de ruídos. Já o limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração que pode ser identificada e medida com certo grau de confiança estatística [46]. Estas grandezas foram calculadas utilizando as relações $3x(\delta/s)$ e $10x(\delta/s)$, para LD e LQ respectivamente em que δ corresponde ao desvio-padrão de dez replicatas do branco e o s coeficiente linear da curva de calibração. A tabela 8 mostra os valores obtidos em ambas formas de processamento empregadas:

Tabela 8 - LD e LQ - 1,10-fenantrolina

Processamento	LD (mg/100g)	LQ (mg/100g)
A = -log(P/P₀)	0,857	2,857
S = 255- B	0,022	0,072

7.2.3 PRECISÃO

A precisão avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra ou padrão em condições conhecidas. Nesta metodologia, foi escolhida uma amostra aleatória e replicou-se dez vezes. A precisão do método foi expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD) conforme mostra a tabela 9:

Tabela 9 - Avaliação da precisão - 1,10 - fenantrolina para amostra de Limão (n=10)

Processamento	RSD (%)
A = -log(p/p₀)	1,3
S = 255- B	1,2

7.2.4 EFEITO DE MATRIZ

A avaliação do efeito de matriz é um estudo de seletividade cujo objetivo é verificar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõe a matriz amostral, podendo causar diminuição ou ampliação da resposta analítica [47, 48]. O estudo é realizado através da comparação entre a curva construída em meio aquoso e a curva contendo com adição de um volume fixo da amostra em cada ponto.

Para realização do estudo, selecionou-se arbitrariamente a amostra de limão. Na construção da curva de calibração, foi adicionada uma quantidade fixa da amostra em cada ponto da curva. Esta foi comparada a curva da matriz aquosa conforme pode ser visto nas figuras 31 e 32:

Figura 30 - Avaliação do efeito de matriz - 1,10-fenantrolina através do processamento $-\log(p/p_0)$

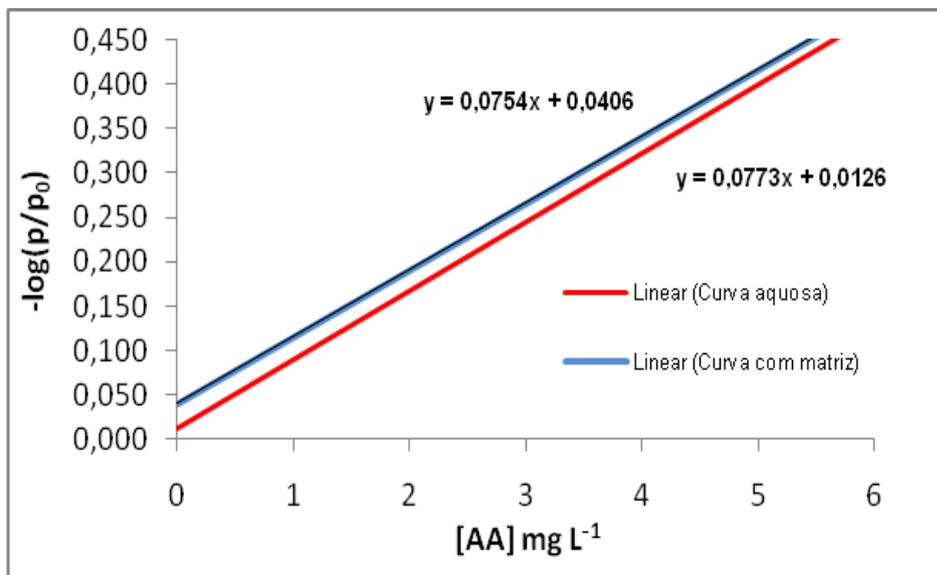
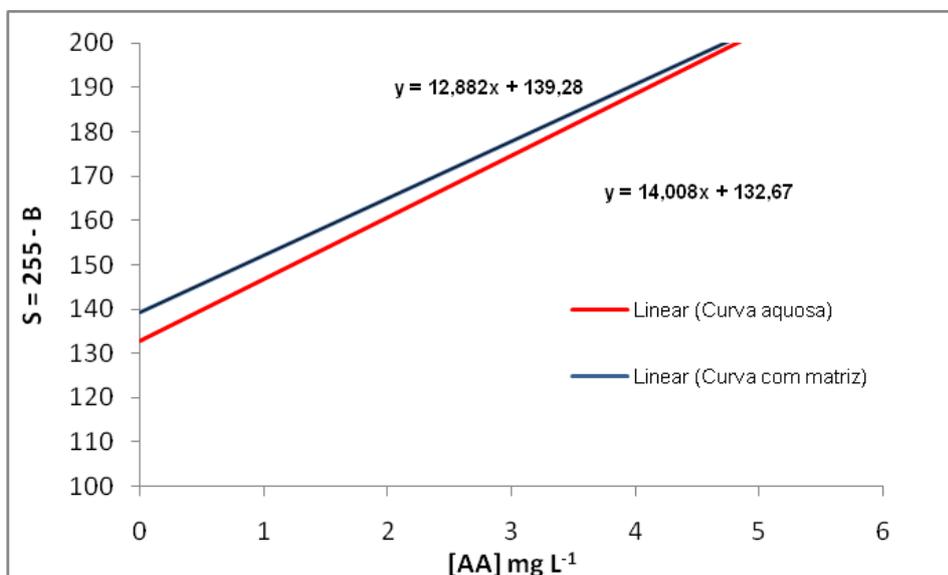


Figura 31 - Avaliação do efeito de matriz - 1,10-fenantrolina através do processamento $S = 255 - B$



O teste de paralelismo avalia o impacto da matriz na metodologia analítica. Se as retas das curvas de calibração (aquosa e na matriz) são paralelas, o impacto é nulo e o método pode ser desenvolvido no meio aquoso [48]. Como é possível observar, ambas as formas de processamento geraram retas paralelas concluindo que a matriz não afeta a análise. O efeito de matriz também foi avaliado por regressão linear. A tabela a seguir mostra os coeficientes angulares das curvas de

calibração expressos em termos de intervalo de confiança. É possível observar que ambos não diferem estatisticamente entre si (tabela 10), a um nível de 95% de confiança, indicando que não há interferência da matriz na realização da análise.

Tabela 10 - Avaliação do efeito de matriz - 1,10-fenantrolina

Processamento	Curva aquosa	Curva com matriz
-log(p/p₀)	0,0773 ± 0,0073	0,0754 ± 0,0145
S = 255 – B	14,008 ± 2,837	12,882 ± 3,462

7.2.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS E EXATIDÃO

Entende-se por exatidão o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudos em relação a um valor aceito como verdadeiro [48,49]. Entre as formas de avaliar a exatidão, tem-se: uso de matérias de referência certificado (CRM), testes de adição e recuperação e comparação entre técnicas. Neste trabalho, a exatidão foi avaliada através da comparação com a já consolidada técnica de espectrofotometria de absorção molecular.

A metodologia proposta foi aplicada na determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de limão, laranja, uva, lima, abacaxi, tangerina, manga e mangostão. Os resultados foram expressos com intervalo de confiança a um nível de 95% na tabela a seguir. É observável que as concentrações variaram entre 3,8 mg/100g à 38,1 mg/100g. Todas as amostras também foram analisadas empregando espectrofotometria de absorção molecular utilizando o mesmo reagente cromogênico para a avaliação da exatidão.

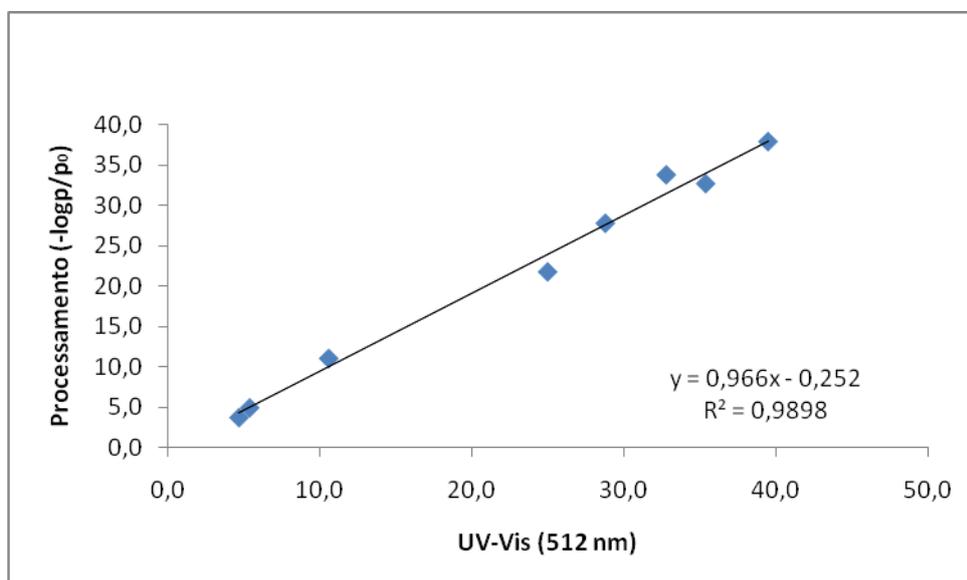
Os resultados alcançados por ambas as formas de processamento em imagem digital e a técnica espectrofotométrica clássica mostraram que não houve diferenças significativas entre as concentrações de ácido ascórbico (tabela 11). Sendo assim, o método proposto é simples e barato, podendo ser uma alternativa ao uso do método espectrofotométrico e dispensando a necessidade de diluição das amostras.

Tabela 11 - Determinação de ácido ascórbico em suco natural de frutas - 1,10-fenantrolina

Amostra	Processamento 1	Processamento 2	Absorção Molecular
	$-\log(p/p_0)$ (mg/100g)	$S = 255 - B$ (mg/100g)	(512nm) (mg/100g)
Limão	21,8 ± 2,7	24,8 ± 2,8	25,0 ± 2,8
Laranja	32,7 ± 2,9	34,3 ± 2,7	35,4 ± 1,3
Uva	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,7 ± 0,6
Lima	37,9 ± 3,9	38,1 ± 2,9	39,5 ± 0,8
Abacaxi	5,0 ± 1,0	5,4 ± 0,9	5,4 ± 0,3
Tangerina	27,8 ± 2,7	29,8 ± 2,6	28,8 ± 1,5
Manga	33,8 ± 3,2	35,1 ± 2,3	32,8 ± 3,1
Mangostão	11,1 ± 1,3	10,0 ± 0,8	10,6 ± 0,9

Os dados obtidos em ambas as formas de processamento foram correlacionados com os valores obtidos pela espectrofotometria de absorção molecular (figuras 33 e 34) e submetidos a análise de regressão linear, na qual os coeficientes da reta foram expressos em termos de intervalo de confiança a um nível de 95%:

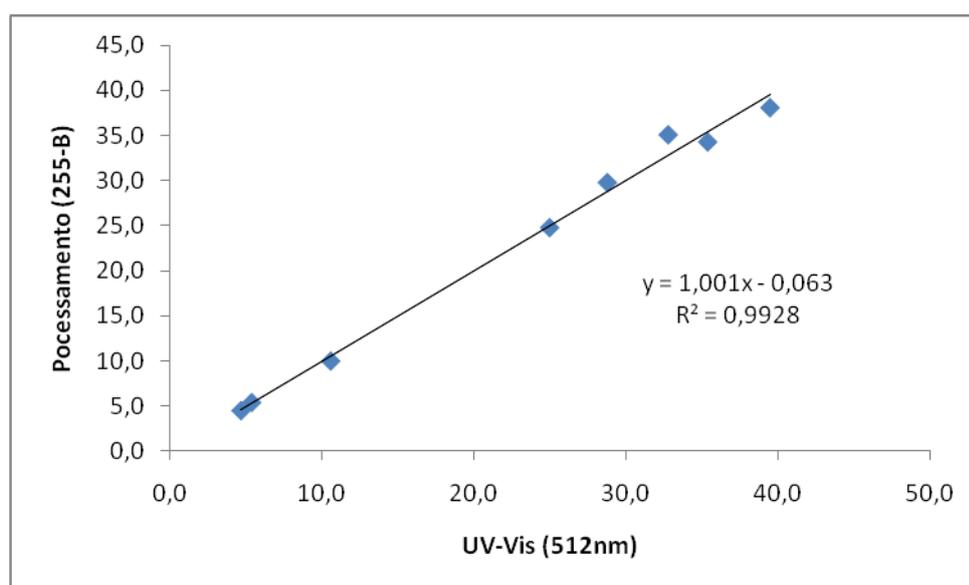
Figura 32 - Correlação entre dados: Metodologia Ortofenantrolina ($-\log(p/p_0)$)



A equação linear expressa com intervalo de confiança é:

$$y = (0,966 \pm 0,098)x - (0,252 \pm 2,573) \quad Eq(11)$$

Figura 33 - Correlação entre dados: Metodologia Ortofenantrolina (255 – B)



A equação linear expressa com intervalo de confiança é:

$$y = (1,001 \pm 0,628)x - (0,063 \pm 2,337) \quad Eq(12)$$

Os coeficientes lineares e angulares expressos na forma de intervalo de confiança (95%), contemplam os números 1 (um) e 0 (zero) respectivamente. Conforme Ferreira [69] e Miller [70], quando essa situação ocorre, confirma-se que houve um bom ajuste entre os dados obtidos.

Também foi aplicado o teste t pareado para averiguar se as formas de processamento fornecem resultados significativamente diferentes do método de referência. Para isso, foi calculada a diferença (d) entre cada par de resultados obtidos para a concentração de ácido ascórbico nas amostras. Em seguida,

calculou-se a média dessas diferenças (\bar{d}) e o desvio padrão (s_d). Admitindo que a diferença média dos resultados (Δ_0) é supostamente zero, a hipótese nula a ser testada é $\Delta_0 = 0$. O teste estatístico é então realizado utilizando a equação abaixo:

$$t = \frac{\bar{d} - 0}{\frac{s_d}{\sqrt{N}}} \quad Eq(13)$$

O N representa a quantidade de amostras analisadas e o desvio-padrão é obtido pela seguinte fórmula:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{N}}{N - 1}} \quad Eq(14)$$

Após obter o valor de t, é preciso compará-lo com o valor tabelado de $t_{crítico}$. Este valor está associado à quantidade de graus de liberdade, $N - 1$ e o nível de confiança adotado. Se o $t_{calculado}$ for maior ou igual que o $t_{crítico}$ ou menor ou igual a $-t_{crítico}$, descarta-se a hipótese nula e conclui-se que os métodos comparados fornecem resultados distintos [34,50].

Os resultados do teste t em ambos os processamentos satisfazem a condição $t_{calculado} \leq t_{crítico}$ o que conduz a aceitação da hipótese nula e, portanto os resultados encontrados não diferem estatisticamente do método molecular a um nível de 95% de confiança (tabela 12).

Tabela 12 - Teste t para metodologia com 1,10-fenantrolina

	Processamento 1	Processamento 2
	$-\log(p/p_0)$	S = 255 - B
t calculado	2,03	0,48
t crítico		2,36
Grau de liberdade (N-1)		7
α (95%)		0,05

Os dados obtidos pelo processamento 2 foram comparados os dados da literatura, conforme pode ser visto na tabela 13:

Tabela 13 - Comparação com outros dados da literatura

Amostra	[AA]	Outras referências	Observações
	mg/100g	mg/100g	
Limão	24,8 ± 2,8	23,6 ± 3,7	Titulação (DCFI) [73]
Laranja	34,3 ± 2,7	33,3 ± 0,2	UPLC *[71]
Uva	4,5 ± 0,5	3,3	TACO**
Lima	38,1 ± 2,9	43,5	TACO**
Abacaxi	5,4 ± 0,9	34,6	TACO**
Tangerina	29,8 ± 2,6	32,5 ± 1,8	Titulação (DCFI) [78]
Manga	35,1 ± 2,3	40,9 ± 0,6	HPLC [72]
Mangostão	10,0 ± 0,8	4,1 ± 1,2	HPLC [81]

*extração com ácido metafosfórico 9% **Determinação por CLAE acoplada a detector fluorescência

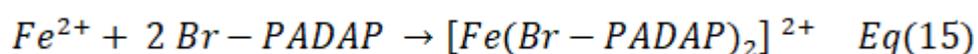
Para a maioria das frutas, os resultados obtidos encontram-se com uma boa concordância com alguns dados da literatura, excluindo-se as amostras de abacaxi e mangostão. Contudo, é preciso levar em consideração que a composição química de cada fruta pode variar naturalmente devido ao grau de maturação, tipo de solo de cultivo e fatores ambientais. Conforme *Wang e Lin* [82], o fator ambiental pode causar danos pré e pós-colheita, expondo o fruto a microorganismos, possibilitando o contato com enzimas e componentes químicos causando reações que podem alterar a composição química do fruto.

8. ESTRATÉGIA ANALÍTICA EMPREGANDO Br-PADAP

8.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

8.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA

A metodologia com o ligante Br-PADAP difere-se na proporção entre ligante e centro metálico em relação à 1,10-fenantrolina, como pode ser visto abaixo:



Para esta metodologia também foi empregado um planejamento fatorial completo de três níveis com replicatas no ponto central, entretanto, os seguintes parâmetros foram avaliados: pH da solução-tampão, concentração do Br-PADAP e concentração do EDTA. A variável resposta foi definida como o resultado da forma de processamento $S = 255 - G$, sendo este o valor da contribuição do canal *green* (verde) na composição da cor. As tabelas a seguir mostram os domínios experimentais estudados com valores codificados e valores de RGB obtidos (tabela 14) além dos valores reais (tabela 15):

Tabela 14 – Matriz do planejamento para reação colorimétrica com Br-PADAP

Experimento	[EDTA] (%)	pH	[Br-PADAP] (%)	Canal R	Canal G	Canal B	Resposta (255 – G)
1	-	-	-	132	49	37	206
2	+	-	-	129	47	31	208
3	-	+	-	128	45	35	210
4	+	+	-	131	44	37	211
5	-	-	+	131	42	16	213
6	+	-	+	132	44	18	211
7	-	+	+	130	43	17	212
8	+	+	+	131	42	20	213
9 (PC)	0	0	0	131	43	36	212
10 (PC)	0	0	0	131	43	33	210
11 (PC)	0	0	0	131	43	33	212

Tabela 15 - Valores reais do planejamento (Br-PADAP)

Codificação	[EDTA] (%)	pH	[Br-PADAP] (%)
-	0,05	4,25	0,015
0	0,10	4,75	0,020
+	0,15	5,25	0,025

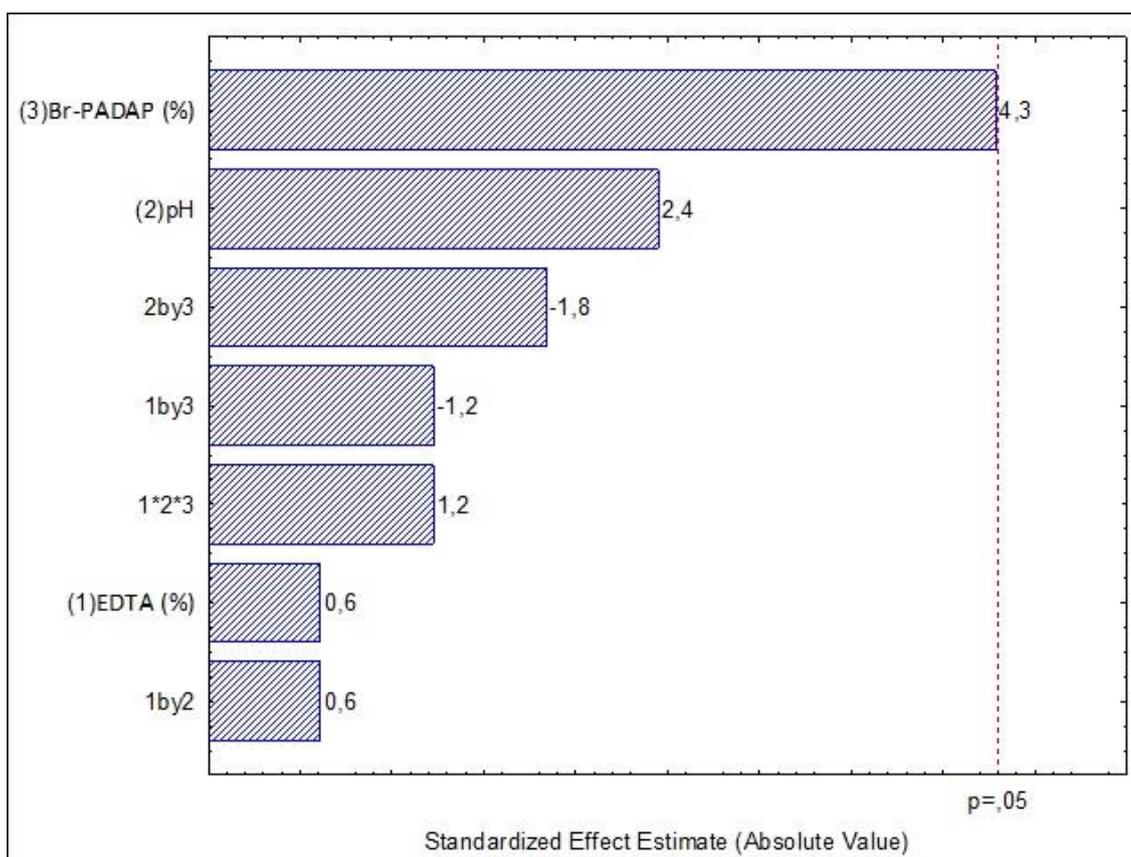
O cálculo dos efeitos dos fatores e suas interações juntamente com o gráfico de pareto foram utilizados para interpretação do estudo. Na tabela abaixo, foram expressos esses dados com o intervalo de confiança. É possível observar que todos os fatores apresentam efeito positivo e apenas as interações envolvendo o Br-PADAP tem efeito negativo. Contudo, todos os efeitos e interações contemplam o zero em seu nível de confiança e portanto não são significativos (tabela 16).

Tabela 16 - Efeito dos fatores e suas interações

Fatores e interações	Efeitos
[EDTA]	0,5 ± 3,5
pH	2,0 ± 3,5
[Br-PADAP]	3,5 ± 3,5
[EDTA] x pH	0,5 ± 3,5
[EDTA] x [Br-PADAP]	-1,0 ± 3,5
pH x [Br-PADAP]	-1,5 ± 3,5

O gráfico de Pareto referente a esta otimização é exibido na figura abaixo:

Figura 34 - Gráfico de Pareto referente a otimização com Br-PADAP



A metodologia demonstrou-se robusta dentro do domínio experimental estudado para todos os fatores. Deste modo, o procedimento adotado consistiu em: transferir aproximadamente 100 mg do suco de fruta para um balão volumétrico de 10 mL seguido de 40 μL da solução padrão de Fe(III) 1000 mg L^{-1} . Aguardar 3

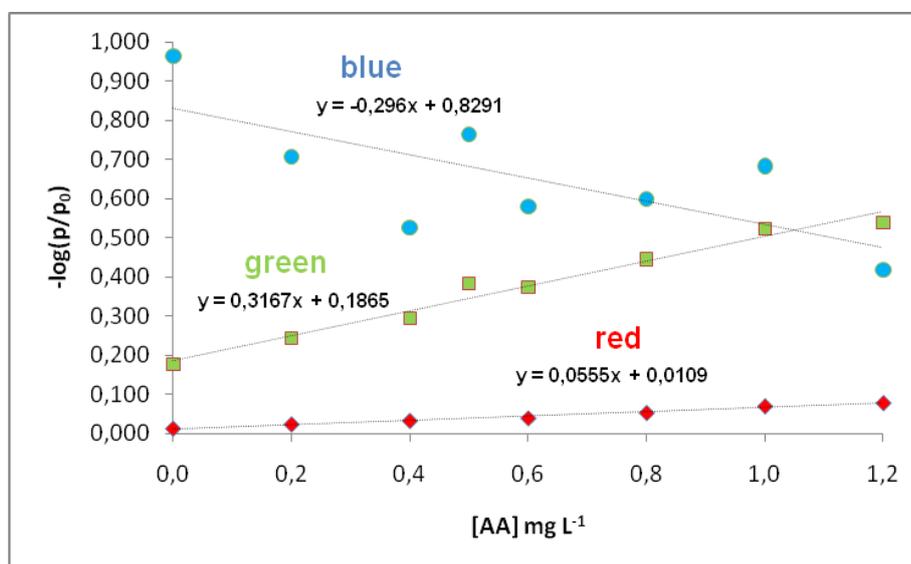
minutos e posteriormente, adicionar 1 mL de Br-PADAP 0,020% e 1 mL do tampão acetato pH 4,75. Aguardar 5 minutos e posteriormente adicionar 1 mL da solução de EDTA 0,10% esperando mais 5 minutos para mascarar os complexos interferentes. Completar com água ultrapura, transferir a solução final para cubeta de vidro e levar ao sistema de detecção para aquisição da imagem digital.

8.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

8.2.1 LINEARIDADE

Neste caso, a espécie que possui relação indireta com o ácido ascórbico é o complexo $[\text{Fe}(\text{Br-PADAP})_2]^{2+}$. O mesmo teste foi realizado para avaliar qual dos canais era o mais adequado para realização das análises. As curvas de calibração construídas para os três canais utilizando o processamento $A = -\log(p/p_0)$ são exibidas na figura 36:

Figura 35 - Curvas de calibração usando os canais Red, Green e Blue - Br-PADAP



Observando as curvas traçadas, percebe-se que o canal *blue* exibe uma relação inversamente proporcional entre a concentração dos padrões e resposta analítica, não sendo adequado para aplicação na análise. Entre os canais *red* e *green*, o *green* apresentou maior sensibilidade sendo o mais adequado para o

tratamento de dados. A curva apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,0 à 1,2 mg L⁻¹. A tabela 17 exhibe os dados da calibração.

Tabela 17 - Determinação da curva de calibração - Br-PADAP

[AA] mg L ⁻¹	Canal R	Canal G	Canal B	A = -log(p/p ₀)	S = 255 - G
0,0	131	90	14	0,178	166
0,2	127	77	11	0,224	178
0,4	125	68	18	0,294	187
0,5	111	56	10	0,383	199
0,6	123	57	15	0,374	198
0,8	119	48	15	0,445	207
1,0	115	40	13	0,523	215
1,2	112	39	22	0,539	216
Faixa dinâmica linear (mg/100g)				1,063 – 12,000	0,012 – 12,000

8.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

A tabela 18 mostra os valores obtidos em ambas as formas de processamento para a determinação colorimétrica utilizando o Br-PADAP Assim como a metodologia com a 1,10-fenantrolina, o procedimento aqui também consistiu na leitura de dez replicatas do branco e uso das relações $3x(\delta/s)$ e $10x(\delta/s)$ sendo δ o desvio-padrão e s o coeficiente angular da curva de calibração.

Tabela 18 - LD e LQ - Br-PADAP

Processamento	LD (mg/100g)	LQ (mg/100g)
A = -log(p/p₀)	0,319	1,063
S = 255 - B	0,004	0,012

8.2.3 PRECISÃO

A avaliação da precisão foi realizada com a amostra de melão escolhida aleatoriamente e replicando-a dez vezes. Os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo (RSD) conforme tabela 19:

Tabela 19 - Avaliação da precisão - Br-PADAP para amostra de Melão (n=10)

Processamento	RSD (%)
A = $-\log(p/p_0)$	5,6
S = 255- B	8,2

8.2.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS E EXATIDÃO

A metodologia proposta foi aplicada na determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de ameixa, jenipapo, maracujá, melão e melancia. Os resultados foram expressos com intervalo de confiança a um nível de 95%. É observável que as concentrações variaram entre 0,6 mg/100g à 11,7 mg/100g. Todas as amostras também foram analisadas empregando espectrofotometria de absorção molecular utilizando o mesmo reagente cromogênico para a avaliação da exatidão, entretanto, os resultados oriundos do processamento 2 para a determinação em ameixa e jenipapo mostraram diferenças significativas como pode ser verificado na tabela 20.

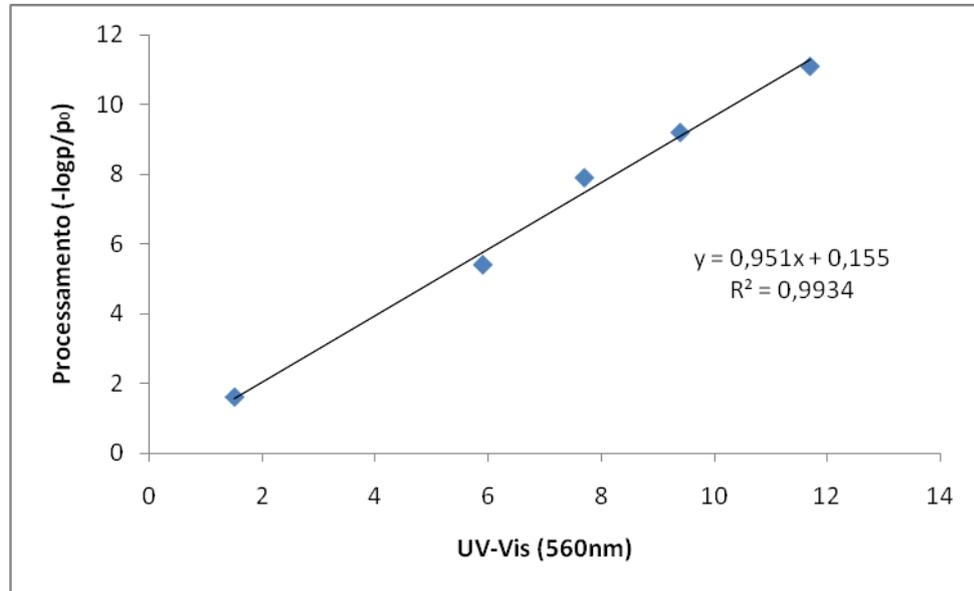
Tabela 20 - Determinação de ácido ascórbico em suco natural de frutas - Br-PADAP

Amostra	Processamento 1	Processamento 2	Absorção Molecular
	$-\log(p/p_0)$ (mg/100g)	S = 255 – G (mg/100g)	(560nm) (mg/100g)
Ameixa	7,9 ± 0,6	9,2 ± 0,2	7,7 ± 0,5
Jenipapo	1,5 ± 0,4	0,6 ± 0,0	1,6 ± 0,5
Maracujá	11,1 ± 1,6	11,2 ± 1,4	11,7 ± 1,8
Melão	9,2 ± 0,4	9,1 ± 0,3	9,4 ± 0,5
Melancia	5,4 ± 0,2	4,9 ± 0,8	5,8 ± 0,2

Os dados obtidos em ambas as formas de processamento foram correlacionados com os valores obtidos pela espectrofotometria de absorção molecular e submetidos à análise de regressão linear, na qual os coeficientes da

reta foram expressos em termos de intervalo de confiança a um nível de 95% (figuras 37 e 38).

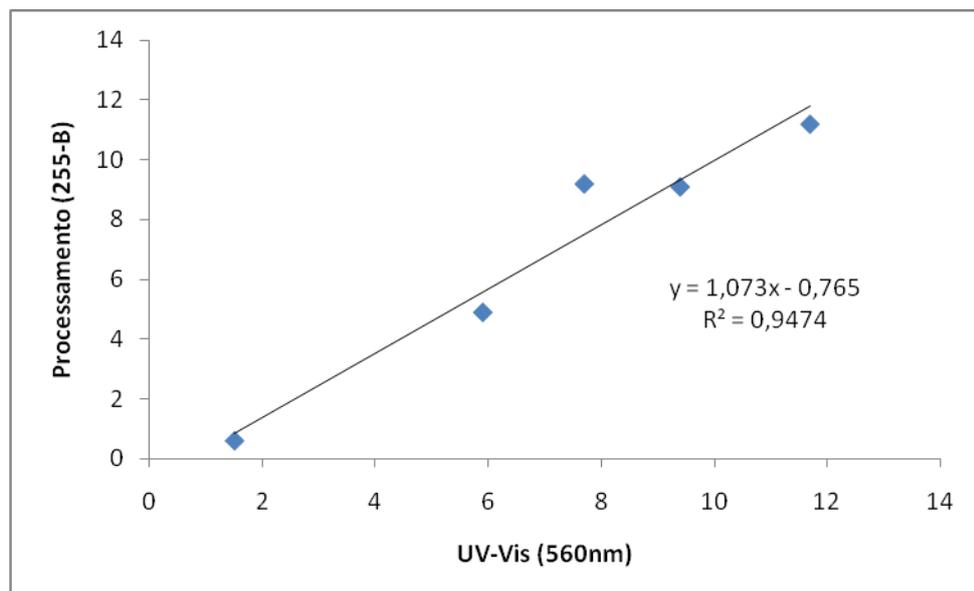
Figura 36 - Correlação entre dados: Metodologia Br-PADAP ((-log(p/p₀))



A equação linear encontrada é:

$$y = (0,951 \pm 0,155)x - (0,142 \pm 1,141) \quad Eq(16)$$

Figura 37 - Correlação entre dados: Metodologia: Br-PADAP (255 - G)



A equação linear encontrada é:

$$y = (1,073 \pm 0,464)x - (0,765 \pm 3,372) \quad \text{Eq(17)}$$

Ambos os resultados responderam bem as condições mencionadas por *Ferreira e Miller*, nos quais os intervalos de confiança dos coeficientes angulares e lineares contemplaram os valores um e zero, respectivamente, indicando um bom ajuste entre os dados.

Na aplicação do teste t, os resultados obtidos satisfizeram a condição $t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{crítico}}$, aceitando-se a hipótese nula e, portanto não há diferenças significativas com o método molecular num nível de 95% de confiança (tabela 21).

Tabela 21 - Teste t para metodologia com Br-PADAP

	Processamento 1	Processamento 2
	$-\log(p/p_0)$	S = 255 – G
t calculado	1,28	0,53
t crítico		2,77
Grau de liberdade (N-1)		4
α (95%)		0,05

Os dados obtidos pelo processamento 1 foram comparados com outras referências conforme mostra a tabela 22. É possível verificar que os resultados obtidos encontram-se compatíveis com outros trabalhos presentes na literatura:

Tabela 22 - Comparação com outros dados da literatura

Amostra	[AA]	Outras referências	Observações
	mg/100g	mg/100g	
Ameixa	7,9 ± 0,6	7,6	TACO*
Jenipapo	1,5 ± 0,4	2,7 ± 1,0	Titulação com iodeto de potássio [80]
Maracujá	11,1 ± 1,6	12,2 ± 0,3	HPLC [72]
Melão	9,2 ± 0,4	8,7	TACO*
Melancia	5,4 ± 0,2	6,1	TACO*

**Determinação por CLAE acoplada a detector fluorescência*

9. CONTRIBUIÇÃO NA INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR)

Entende-se como ingestão diária recomendada (IDR) a quantidade mínima de vitaminas, minerais e proteínas que diariamente devem ser consumidas em atendimento as necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de uma população sadia [76].

De acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos sólidos pronto para consumo são classificados como fonte de um determinado nutriente quando o consumo de 100 gramas atende a pelo menos 15% da ingestão diária recomendada e ricos quando atendem a pelo menos 30% [75].

Após a validação das metodologias desenvolvidas, foi calculado o percentual de contribuição no consumo de 100 gramas de cada fruta analisada quanto ao teor de vitamina C diário. Para isso, foi tomado como referencial os valores preconizados pelo *Institute of Medicine* (IOM-US) [74,77].

A tabela 23 mostra esses valores para homens e mulheres acima de 19 anos. Analisando os resultados, é possível observar que o consumo de 100 gramas de qualquer uma das frutas analisadas pode atender parcialmente as necessidades diárias para homens e mulheres. As frutas que mais se destacaram nesse sentido foram limão, laranja, lima, tangerina e manga sendo que de acordo com as recomendações da ANVISA, todas são classificadas como ricas em vitamina C, tanto para homens quanto para mulheres. Para o maracujá, o consumo de 100 gramas corresponde a 15% para as mulheres e 12% para homens das necessidades diárias. Esse resultado permite inferir que a fruta é considerada como fonte de vitamina C somente para as mulheres.

A contribuição na ingestão diária recomendada também foi calculada para crianças e adolescentes na faixa de 4 a 18 anos (tabela 24).

Tabela 23 - Informações nutricionais do conteúdo de vitamina C - Adultos

Fruta	Teor Vitamina C (100g)	Contribuição IDR (%)*	
		Mulheres**	Homens***
Limão	24,8	33	28
Laranja	34,3	46	38
Uva	4,5	6	5
Lima	38,1	51	42
Abacaxi	5,4	7	6
Tangerina	29,8	40	33
Manga	35,1	47	39
Mangostão	10,0	13	11
Ameixa	7,9	11	9
Jenipapo	1,5	2	2
Maracujá	11,1	15	12
Melão	9,2	12	10
Melancia	5,4	7	6

*Valores de acordo com o IOM-US (Institute of Medicine IMS-2000) ** 75 mg/dia

*** 90mg/dia

Tabela 24 - Informações nutricionais do conteúdo de vitamina C - Crianças e Adolescentes

Fruta	Teor Vitamina C (100g)	Contribuição IDR (%)*			
		4-8 anos**	9-13 anos***	14-18 anos**** Mulheres Homens	
Limão	24,8	99	55	38	33
Laranja	34,3	138	76	53	46
Uva	4,5	18	10	7	6
Lima	38,1	152	85	59	51
Abacaxi	5,4	22	12	8	7
Tangerina	29,8	120	66	46	40
Manga	35,1	140	78	54	47
Mangostão	10,0	40	22	15	13
Ameixa	7,9	31	18	12	11
Jenipapo	1,5	6	3	2	2
Maracujá	11,1	44	25	17	15
Melão	9,2	37	20	14	12
Melancia	5,4	22	12	8	7

*Valores de acordo com o IOM-US (Institute of Medicine IMS-2000) ** 25 mg/dia

*** 45mg/dia ****Muheres: 65 mg/dia e Homens: 75 mg/dia.

Analisando os resultados da tabela 24, é possível concluir que limão, laranja, lima, tangerina e manga também se destacaram, oferecendo as maiores contribuições para o consumo diário de 100 gramas e sendo classificadas como ricas em todos os grupos analisados. No caso da laranja, lima, tangerina e manga o consumo da quantidade indicada excede a necessidade diária para crianças entre 4 e 8 anos, sendo mais adequado o consumo de porções menores. Ainda sobre este grupo, com exceção do jenipapo, todas as frutas classificam-se como fonte ou ricas em vitamina C, sendo uma possível alternativa de suplementação natural.

Para o grupo de crianças entre 9 e 13 anos, as frutas: uva, abacaxi, jenipapo e melancia não foram classificadas como fonte ou ricas por contribuir abaixo de 15%. É interessante observar que mangostão, ameixa, maracujá e melão são classificadas como fonte para esta faixa etária, enquanto que para adultos a contribuição percentual não permite tal classificação. Na faixa etária de 14 a 18 anos, os valores são diferenciados para homens e mulheres assim como adultos. Neste caso, é importante observar que mangostão e maracujá são classificadas como fonte somente para as mulheres, com contribuições de 15% e 17% respectivamente. Com exceção do jenipapo, todas as frutas representaram uma importante contribuição na ingestão diária de vitamina C pra pelo menos um dos grupos analisados.

10. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi evidenciado que a análise de imagens digitais aplicada a determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de frutas é uma alternativa viável em substituição ao uso do espectrofotômetro de absorção molecular. As estratégias estabelecidas foram capazes de fornecer resultados precisos, sensíveis, exatos e compatíveis a respectiva técnica molecular.

Para o desenvolvimento de um sistema de detecção de imagem, é necessário observar alguns parâmetros importantes a fins de assegurar reprodutibilidade em todas as imagens capturadas. Recomenda-se que o interior do sistema seja uniformemente branco, para assegurar a homogeneidade da iluminação e evitar o fenômeno de reflexão. O instrumento de captura deve ser devidamente fixado para que todas as imagens representem exatamente a mesma cena e a seleção da região de interesse (ROI) deve ser realizada cautelosamente contemplando somente pontos da solução padrão e amostral.

O estudo dos parâmetros de medida: influência da distância entre a *webcam* e a cubeta e a área da região de interesse, permitiu avaliar que ambas não influenciam a sensibilidade do método. Foram traçadas curvas de calibração em cada uma das condições investigadas e partir da análise de regressão linear, concluiu-se que tais parâmetros não afetam as inclinações da curva de calibração a um nível de 95% de confiança.

Para a estratégia baseada no uso do ligante 1,10-fenantrolina, o processamento de dados envolvendo o uso da expressão $S = 255 - B$ forneceu resultados mais sensíveis que o uso da equação de absorbância efetiva. A análise de regressão linear também revelou uma melhor correlação entre os resultados obtidos por este processamento e a espectrofotômetro.

Em contrapartida, o uso do ligante Br-PADAP demonstrou uma melhor correlação com os resultados oriundos da absorbância efetiva que o da expressão $S = 255 - G$. Em termos de sensibilidade, o uso desta expressão produziu um melhor desempenho. No entanto, as concentrações observadas nas amostras de ameixa e jenipapo, obtidas por tal tratamento, apresentaram comportamento significativamente distinto com os obtidos na técnica de referência.

Em uma comparação entre as duas estratégias, o uso do ligante Br-PADAP apresentou melhor sensibilidade em ambas formas de processamento.

Considerando a absorvência efetiva, o método apresentou sensibilidade superior em oito vezes a que foi encontrada no método com a 1,10-fenantrolina. Utilizando o outro cálculo proposto a sensibilidade foi cinco vezes maior. Esses dados estão compatíveis com os que foram relatados por outros autores que verificaram sensibilidade seis vezes superior no método molecular. A metodologia com a 1,10-fenantrolina demonstrou-se mais precisa, com valores de desvio relativo padrão de 1,3% e 1,2%. Para o Br-PADAP, os valores situaram em 5,6% e 8,2%.

Metodologias baseadas em imagens digitais configuram importantes alternativas para determinações qualitativas e quantitativas de várias espécies químicas, sejam de naturezas orgânica ou inorgânica. Apresentam como vantagem a possibilidade de automação, versatilidade no tratamento de dados, portabilidade e principalmente redução de custos uma vez que a aquisição de instrumentos de capturas de imagem (*webcam*, *smatphone*, câmeras digitais) é financeiramente mais viável que equipamentos de grande porte.

REFERÊNCIAS

- [1] – K.Y.CHIN, S.I. N.; **Vitamin C and bone health : evidence from cell, animal and human studies**, *Curr. Drug Targets* 19 (5) (2018) p. 439–450.
- [2] – FAO/OMS. **Human Vitamin and Mineral Requirements**. In: Report 7th Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Tailândia, 2001.
- [3] – DANTAS, K. C. F.; **Desenvolvimento de método quimiométrico baseado em análise de imagens digitais para a quantificação dos corantes amarelo crepúsculo e tartrazina em bebidas**, 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- [4] – VALLVEY, L. F. C.; RUIZ, N. L.; OLMOS, A. M.; ERENAS, M. M.; PALMA, A. J. **Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review**, *Analytica Chimica ACTA*, 899, (2015) p. 23-56.
- [5] – G. WYSZECKI, W.S. STILES.; **Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae**, Wiley Classics Library, Denver, USA, 2000.
- [6] – MARTINS, S. B.; **Introdução ao processamento de imagens digitais – Definições básicas, espaços de cores e histogramas**, Instituto de Computação, Universidade Estadual de Campinas.
- [7] – LAU. O. W.; LUK. S. F.; **Spectrophotometric determination of ascorbic – acid in canned fruit juices, cordials, and soft drinks with iron (III) and 1,10-phenanthroline as reagents**, *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 70(3) (1987) 518–520.
- [8] – FERREIRA, S. L. C.; BANDEIRA, M. L. S. F.; LEMOS V. A.; DOS SANTO, S H. C.; COSTA, A. C. S.; DE JESUS, D.S.; **Sensitive spectrophotometric determination of ascorbic acid in fruit juices and pharmaceutical formulations using 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP)** *Fresenius J Anal Chem* 357 (1997):1174–1178.

[9] – VANNUCCHI, H.; ROCHA, M. D. M.; **Funções plenamente reconhecidas de nutrientes – ácido ascórbico (vitamina C)**, International life science institute, São Paulo, 2012.

[10] – AZULAY, M. M.; FILGUEIRA, A. L.; LACERDA, C. A. M.; PEREZ, M. A.; CUZZI, T.; **Vitamina C – Educação médica continuada**, An. Bras. Dermatol 78(3): 265-274 (2003).

[11] – CARPENTER, K. J.; **The Discovery of vitamin C**, Annals of nutrition & metabolism, Department of Nutritional Sciences, University of California, Berkeley, Calif. , USA, 61: 259-264 (2012).

[12] – KING C. G.; WAUGH W.A.; **The chemical nature of vitamin C**, Science 1932 ;75 : 357–358.

[13] – OLIVEIRA, R. G. D.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A.; **Quantificação dos isômeros ácido L-ascórbico e ácido D-iso-ascórbico em geléias de frutas por cromatografia líquida de alta eficiência**, Quím. Nova, vol. 35 nº.5: (2012) 1020-1024.

[14] – SILVA, A. A. D.; GONÇALVES, R. C.; **Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais**, Ciência Rural, v.40, n.4, (2010): 994-1002.

[15] – MOTA, C.; ASSUNÇÃO, R.; MARTINS, C.; NASCIMENTO, A.; SANTOS, M.; TORRES, D.; **Do Prato à biodisponibilidade**, Instituto Nacional de Saúde doutor Jorge, Abril, 2015.

[16] – FANTINI, A. P.; BRAZACA, S. G. C.; SOUZA, M. C.; MANSI, D. N.; **Disponibilidade de ferro em mistura de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína**, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 28(2): (2008) p. 435-439.

[17] – GORKOM, G. N. Y. v.; LOOKERMANS, E. L.; ELSSEN, C. H. M. J.; BOS, G. M. J.; **The effect of vitamin C (Ascorbic Acid) in the treatment of patients with cancer: a systematic review**, *Nutrients*, 11, (2019) 977.

[18] – CAMERON, E.; PAULING, L. **Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976, 73, 3685–3689.

[19] – INSTITUTO ADOLF LUTZ, **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 2008, 1020 p.

[20] – HOEHNE, L.; MARMITT, L. G.; **Métodos para determinação de vitamina em diferentes amostras**. *Destaques Acadêmicos Lajeado*, v.11, n.4, (2019), p. 36-55

[21] – OLIVEIRA, R. G. D.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A.; **Otimização e metodologia colorimétrica para a determinação de ácido ascórbico em geléias de frutas**, *Ciênc. e Tecnol. Aliment.*, 30(1), (2010), p. 244-249.

[22] – MAZUREK, A.; WLODARCZYK-STASIAK M.; PANKIEWICZ, U.; KOWALSKI, R.; **Development and validation of a differential pulse polarography method for determination of total vitamin C and dehydroascorbic acid contents foods**, *LWT – Food Science and Technology*, vol. 118, (2020), n° 108828.

[23] – BOONPANGRAK, S.; LALITMANAT, S. SUWANWONG, Y.; PRACHAYASITTIKUL, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. **Analysis of ascorbic acid and isoascorbic acid in Orange and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS**, *Food Anal. Methods*, Vol. 9 Ed. 6, (2016) p. 1616-1626.

[24] – MIRANDA, F. D. S.; **Desenvolvimento e estudo teórico de novos ligantes derivados da 1,10-fenantrolina e seus complexos de Ferro(II)**, 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

- [25] – MATOS, R. C. **Metodologia analítica: espectrofotometria UV-Vis** Disponível em < <http://www.ufjf.br/nupis/files/2012/03/coloquio2012.pdf>> Acesso em 08 mar. 2020
- [26] - DANTAS, A. F.; **Avaliação da 2,2'-biquinolina na separação pré-concentração e determinação de cobre por espectrofotometria de absorção molecular e em fase sólida.** 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.
- [27] – FORTUNE, W. B.; MELLON, M. G. **Determination of iron with o-phenanthroline: a spectrophotometric study.** Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition, v.10, n.2 p 60-64, fev -1983.
- [28] – SANTOS NETO, J. H.; PORTO, I. S. A.; SCHNEIDER, M. P.; DOS SANTOS, A. M. P. GOMES, A. A.; FERREIRA, S. L. C. **Speciation analysis based on digital image colorimetry: Iron (II/III) in white wine.** Talanta 194 (2019) 86-89.
- [29] – ROCHA, S. A.; **Determinação Espectrofotométrica de cromo(VI) em presença de cromo(III) usando Br-PADAP.** 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.
- [30] – DANCHANA, K.; DE SOUZA, C. T.; PALACIO, E.; CERDÁ, V. **Multisyringe flow injection analysis for the spectrophotometric determination of uranium(VI) with 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol.** Microchemical Journal 150 (2019) 104148.
- [31] – RUI-QIN, Y.; ZHUO, X.; HONG, Z. **Spectrophotometric determination of the amount of Zinc on the imprint left on hands by zinc coatings with 5-Br-PADAP as the chromogenic reagent.** Spectroscopy and spectral analysis Vol.36 (2016) Ed. 12 p4017-4020.

[32] – KHAMIRCHI, R.; BANDEGHARAEI, A. H.; ALAHABADI, A.; SIVAMANI, S.; *et al.* **Adsorption property of Br-PADAP-impregnated multiwall carbon nanotubes towards uranium and its performance in the selective separation and determination of uranium in different environmental samples.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 150 (2018) 136-143.

[33] – LOTUFO, E. **Introdução a teoria da cor.** Disponível em <https://www.academia.edu/28560521/Introdu%C3%A7%C3%A3o_%C3%A0_Teoria_da_Cor> Acesso em 11/03/2020 às 00:59.

[34] – SANTOS, J. L. O.; **Estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em matrizes ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

[35] – GONZÁLEZ R.C. e WOODS R.E. **Digital image processing.** Prentice Hall, 2002. p.

[36] – SCURI, A. E.; **Fundamentos da imagem digital.** PUC-Rio, 2002 Disponível em < <https://webserver2.tecgraf.puc-rio.br/~scuri/download/fid.pdf>> Acesso em 11/03/2020 às 15:19.

[37] – <http://www.chemostat.com.br/>

[38] – <https://imagej.net/Welcome>

[39] – KOHL S.K.; LANDMARK J.D.; S D.F.; Stickle, **Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions,** *J. Chem. Educ.* 83 (4) (2006) 644–646.

[40] – SOARES S.; TORRES G.K.; PIMENTEL E.L.; MARTELLI P.B.; ROCHA, F.R.P.; **A novel spot test based on digital images for determination of methanol in biodiesel,** *Talanta* 195 (2019) 229 – 235.

[41] – SCHEEREN L.E.; NOGUEIRA-LIBRELOTTO D.R.; FERNANDES J.R.; MACEDO L.B.; MARCOLINO A.I.P.; VINARDELL M.P.; ROLIM C.M.B., **Comparative study of reversedphase high-performance liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry to determine doxorubicin in pH-sensitive nanoparticles**, Anal. Lett. 51 (10) (2018) 1445–1463.

[42] – FERREIRA S.L.C.; LEMOS V.A.; DE CARVALHO, V.S.; DA SILVA E.G.P.; QUEIROZ A.F.S.; FELIX C.S.A.; DA SILVA D.L.F., DOURADO G.B.; OLIVEIRA R.V.; **Multivariate optimization techniques in analytical chemistry-an overview**, Microchem. J. 140 (2018) 176–182.

[43] – SOUZA S.O.; SANTOS V.S.; SANTOS E.S.; AVILA D.V.L.; NASCIMENTO C.C.; COSTA S.S.L.; GARCIA, C.A.B.; ARAUJO, R.G.O.; **Evaluation of the mineral content in milk and yogurt types using chemometric tools**, Microchem. J. 143 (2018) 1–8.

[44] – DOS SANTOS Q.O.; SILVA, M.M.; LEMOS, V.A. FERREIRA, S.L.C.; DE ANDRADE J.B.; **An online preconcentration system for speciation analysis of arsenic in seawater by hydride generation flame atomic absorption spectrometry**, Microchem. J. 143 (2018) 175–180.

[45] – ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. (1994) **Is my calibration linear?**
Analyst: 119 2363

[46] – PRICHARD, E.; MACKAY, G. M.; POINTS, J. (1996) **Trace Analysis: A structured approach to obtaining reliable results**, The royal society of chemistry, 33.

[47] – PORTAL ACTION. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 19/03/2020 às 18:23.

[48] – ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.** Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 19/03/2020 às 18:23.

[49] – BARBOSA, U. A.; **Análise exploratória de dados originados da determinação de metais e metalóides por ICP-MS em amostras de águas coletadas no município de Cachoeira-Bahia.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

[50] – WEST DONALD M.; HOLLER, F. JAMES; SKOOG, DOUGLAS A. **Fundamentos de Química Analítica** São Paulo: 2006. p.

[51] – SILVEIRA, L. M. **Introdução à teoria da cor.** 2ª edição. Paraná: Editora UTFPR, 2015

[52] – JORDÃO, Fábio. Entenda quais as diferenças entre o PPI e o DPI. **Tecmundo**, 2014. Disponível em <<https://www.tecmundo.com.br/pixel/60711-entenda-diferencas-entre-ppi-o-dpi.htm>> Acesso em: 23 de set. 2018.

[53] – ROZZO, Fernando. Qual a diferença entre CMOS e CCD? **e-Mania**, 2020. Disponível em <<https://blog.emania.com.br/cmos-e-ccd/>> Acesso em: 23 de set. 2018.

[54] – PREUSS, Julio. Qual a diferença entre CCD e CMOS? **Techtudo**, 2011. Disponível em <<http://www.techtudo.com.br/platb/fotografia/2011/03/21/qual-a-diferenca-entre-ccd-e-cmos/>> Acesso em: 23 de set. 2018.

[55] – WONGWILAI W.; LAPANANTNOPPAKHUN S.; GRUDPAN S. e GRUDPAN K. **Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach,** Talanta, v. 81, n. 3, p. 1137-1141, 2010.

[56] – PREUSS, Julio. Quebrando o silêncio sobre o ruído na imagem **Techtudo**, 2010. Disponível em < <http://www.techtudo.com.br/platb/fotografia/2010/12/27/hora-de-quebrar-o-silencio-sobre-ruído-na-imagem/>> Acesso em: 23 de set. 2018.

[57] – ROZZO, Fernando. Sensor Retroiluminado: A tecnologia por trás das imagens de alta qualidade da Sony **e-Mania**, 2020. Disponível em < <https://blog.emania.com.br/sensor-retroiluminado-sony/> > Acesso em: 23 de set. 2018.

[58] – TAVARES JÚNIOR J.B.; RIBEIRO E e SANTOS D.R.; **Estabilização da temperatura da câmara digital Magi DC 575 utilizando pastilha termoeétrica para obtenção dos parâmetros de correção do efeito da corrente escura**. Revista Brasileira de Cartografia, v. n. p. 15, 2011.

[59] – CONWAY B. R. **Color vision, cones, and color-coding in the cortex**. Neuroscientist, v. 15, n. 3, 2009, p. 274-90.

[60] – FAIRCHILD M. D. **Color appearance models and complex visual stimuli**. Journal of Dentistry, v. 38, n. p. E25-E33, 2010.

[61] – CANTRELL K.; ERENAS M. M.; ORBE-PAYA I.; CAPITAN-VALLVEY, L. F.; **Use of the Hue parameter of the Hue, saturation, value color space as a quantitative analytical parameter for bitonal optical sensors**, Anal. Chem. 82 (2010) p. 531 – 542

[62] – PACIORNIK, S.; YALLOUZ A.V.; Yallouz, CAMPOS, R.C.; GANNERMAN, D.; **Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests**, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) p. 156-161.

[63] – BERLIEN J.; **Color Classification with the TCS230 Identifying and Sorting Colors by Hue**, Texas Advanced Optoelectronic Solutions, 2004.

[64] – KOHL, S.K.; LANDMARK, J.D.; STICKLE, D.F.; **Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions**, J. Chem. Educ. 83 (4) (2006) 644–646.

[65] – SOARES, S.; NUNES, L.C.; MELCHERT W.R.; ROCHA F.RP.; **Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel em diesel blends**, Microchemical Jornal 152 (2020).

[66] – LYRA, W. S.; **Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

[67] – ALMEIDA, J. B. S.; **Um método Quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr(VI) em águas usando um sistema fluxo batelada** 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

[68] – ROCHA, J. C.; **Cor luz, cor pigmento, e os sistemas RGB e CMY**, Revista Belas Artes, 3ª edição, 2011.

[69] – FERREIRA, S. L. C. **Introdução a técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015.

[70] – MILLER, J., MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Pearson education, Sixth Edition, 2010.

[71] – COTRUT, R.; BADULESCU, L. **UPLC Rapid Quantification of Ascorbic Acid in Several Fruits and Vegetables Extrated using Different Solvents**, Agric. Sci Procedia, 2016, p. 160-166.

[72] – VALENTE, A.; ALBUQUERQUE, T. G.; SANCHES-SILVA, A.; COSTA, H. S. **Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data**

for food composition databases, Food Research International, 2011, ed. 44, p. 2237-2242.

[73] – NOGUEIRA, F. dos S. **Teores de ácido L-ascórbico em frutas e sua estabilidade em sucos de frutas**. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

[74] – CARDOSO, P. C.; TOMAZINI, A. P. B; STRINGHETA, P. C.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. **Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil**, Food Chemistry, 2010, ed. 126 p. 411-416.

[75] – BRASIL (1998). Portaria SVS/MS n 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Diário Oficial da União, Brasília, DF, Janeiro 16, 1998. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutrição/docs/legislação/portaria27_13_01_1998.pdf>. Acesso em 04 out. 2020.

[76] – BRASIL (1998). Portaria SVS/MS n 33, de 16 de janeiro de 1998. Tabela de Ingestão Diária Recomendada (IDR). Diário Oficial da União, Brasília, DF, Janeiro 16, 1998. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutrição/docs/legislação/portaria33_13_01_1998.pdf>. Acesso em 04 out. 2020.

[77] – Institute of Medicine IOM-US (2000). Food and Nutrition Board. In Standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes. dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC: National Academy Press.

[78] – COUTO, M. A. L.; BRAZACA, S. G. C. **Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas**, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, vol. 30, p.15-19.

- [79] – TACO: **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**:. 2 ed. Campinas, 2006. Disponível em: <[http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisad pdf](http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisad_pdf)> Acesso em 04 out. 2020.
- [80] – HANSEN, D. de S.; SILVA, S. A.; FONSECA, A. A. O.; HANSEN, O. A. de S.; FRANÇA, N. O. **Caracterização química de frutos de jenipapeiros nativos do Recôncavo Baiano visando ao consumo natural e industrialização**, Revista Brasileira de Fruticultura, 2008, vol. 30, p. 968-969.
- [81] – LEONG, L. P. and SHUI, G.; **An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets**, Food Chemistry 76 (2002) 69-75.
- [82] – WANG, S. Y. ; LIN, H. S. **Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage**. J. Agric. Food Chem., v.48, p.140-146, 2000.