



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LYCIO SHINJI WATANABE

**DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTOS E METODOLOGIAS
ANALÍTICAS NA DETECÇÃO *IN SITU* DE ADULTERANTES NO LEITE
BOVINO**

Londrina
2021

LYCIO SHINJI WATANABE

**DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTOS E METODOLOGIAS
ANALÍTICAS NA DETECÇÃO *IN SITU* DE ADULTERANTES NO LEITE
BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado
Associado em Química UEL-UEPG-
UNICENTRO para obtenção do título de Doutor
em Química.

Orientador: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

W324d Watanabe, Lycio Shinji.
Desenvolvimento de instrumentos e metodologias analíticas na detecção in situ de adulterantes no leite bovino / Lycio Shinji Watanabe. - Londrina, 2021. 149 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Química - Tese. 2. Leite - Adulteração - Tese. 3. Ensaio de toque - Tese. 4. Inovações tecnológicas - Tese. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

LYCIO SHINJI WATANABE

**DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTOS E METODOLOGIAS
ANALÍTICAS NA DETECÇÃO *IN SITU* DE ADULTERANTES NO LEITE
BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado
Associado em Química
UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mario Henrique Montazzolli Killner
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sylvio Barbon Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de Maio de 2021.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

W324 Watanabe, Lycio Shinji.

Desenvolvimento de instrumentos e metodologias analíticas na detecção insitu de adulterantes no leite bovino / Lycio Shinji Watanabe. - Londrina, 2021. 153 f.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Análise por imagem digital - Tese. 2. Spot test - Tese. 3. Desenvolvimento de instrumentos, softwares e aplicativos - Tese. 4. Adulterantes no leite bovino - Tese. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela concessão da sabedoria, paciência e força para realização de mais um trabalho de minha jornada.

À Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pela orientação durante este trabalho, pelos conhecimentos e experiências transmitidos, pelas oportunidades de serviços e trabalhos científicos, pela compreensão, paciência, conselhos e apoio, e, sobretudo, por sua amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, pelo apoio moral, amizade, e pelos ensinamentos na área de programação e automação.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelas bolsas de estudo.

A todos os membros do Grupo DIA e da Universidade, pela contribuição direta e indireta na realização deste trabalho e de minha jornada até o presente momento, em especial à minha companheira de todos os dias e amada Caroline T. Lopes. Agradeço ainda aos meus amigos e colegas Alan, Leandro, Renan, Willian, Tiago, Mariana, Yuri, Alessandra, Alexandre, André, Daniel, Edson e Professor Mario.

À Universidade Estadual de Londrina, a todos os professores e funcionários do Departamento de Química e Medicina Veterinária Preventiva, em especial ao Laboratório de Inspeção de Produto de Origem Animal (LIPOA) e a Profa. Dra. Vanerli Beloti. Agradeço a competência e dedicação devotada aos alunos.

Aos meus pais, Massao e Teruko, pelo apoio moral, conselhos e por sempre acreditarem em mim. Aos meus irmãos, Lina e Lincoln. A todos meus familiares, que sempre me incentivaram a estudar e me deram condições e força para chegar até aqui.

WATANABE, Lycio Shinji. **Desenvolvimento de instrumentos e metodologias analíticas na detecção *in situ* de adulterantes no leite bovino**. 2021. 150 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

As adulterações em leite bovino têm se tornado um problema corriqueiro. Após diversos escândalos noticiados, envolvendo a adição de água, amido, soro, ureia e formol, as autoridades responsáveis e os laticínios, passaram a monitorar com maior rigor a qualidade, visando coibir fraudes. Entretanto, apesar das novas regras implementadas pelas Instruções Normativas de 2018, a dificuldade em se atestar a identidade e a autenticidade dos produtos ainda persiste, considerando à complexidade da matriz. Portanto, há uma demanda crescente por parte do mercado, por novas proposições, que englobem soluções instrumentais tecnológicas e metodológicas aplicáveis na rotina. Neste panorama, este trabalho propõe desenvolver e avaliar três Sistemas instrumentais portáteis para a determinação *in loco* de adulterantes no leite de modo rápido, simples e direto, sem a necessidade de extração e pré-concentração dos analitos. Os 3 Sistemas semi-automatizados baseiam-se em reações colorimétricas ou *spot tests*, analisadas através das imagens digitais. O Sistema I utiliza como detector um *scanner* de mesa portátil e trata as imagens através de regressões lineares uni ou multivariadas pelo *software lab-made QuantColour*. O Sistema II consiste em uma caixa com iluminação controlada por *LEDs*, na qual as amostras são dispostas numa placa de 96 poços, sendo a aquisição feita por *smartphone* pelo aplicativo desenvolvido *QuantRGB*. E, o Sistema III emprega um colorímetro projetado para ir a campo e transmitir dados via *USB*, construído com um sensor de cor de baixo custo e outro de óxido semicondutor de estado sólido, controlado por uma placa *arduino (open source)*. Os Sistemas I, II e III foram inicialmente montados e calibrados com seis corantes alimentícios para estudar e estabelecer as melhores respostas analíticas. Posteriormente, o desempenho dos 3 Sistemas propostos, foi avaliado utilizando leite fresco fluído valendo-se de 3 métodos propostos em 3 aplicações distintas. A primeira aplicação consistiu na medida de pH com indicador vermelho de alizarina S, visando verificar se o valor está de acordo com especificação (pH 6,6-6,8). A segunda aplicação consistiu num método de *screening* para atestar a presença de reconstituintes a base de amido. E, a terceira aplicação abordou um método para atestar a adição fraudulenta de ureia, distinguindo-a do teor presente naturalmente no leite, fazendo uso da enzima urease nas curvas analíticas e empregando o derivatizante p-dimetilaminobenzaldeído. Os Sistemas I, II e III desenvolvidos demonstraram potencial aplicação e viabilidade de uso, considerando que os resultados quantitativos foram equivalentes entre si e, comparáveis aos obtidos em um espectrofotômetro comercial, tomado como referência. Embora a sensibilidade e a detectabilidade sejam distintas, as figuras de mérito mostraram-se adequadas para atender as faixas de concentração exigidas pela legislação. Os Sistemas e os métodos propostos também se mostraram promissores na aplicação em análise *in situ* em amostras de leite, representando uma alternativa confiável na triagem e detecção de ureia e derivados de amido adicionados ao leite de vaca.

Palavras-chave: *softwares* e aplicativos desenvolvidos; análise de imagens digitais; *scanner* de mesa; *smartphone*; *spot test*.

WATANABE, Lycio Shinji. **Development of analytical tools and methodologies for *in situ* detection of adulterants in bovine milk.** 2021. 150 p. Doctoral thesis (PhD in Chemistry) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Adulterations in bovine milk have become a common problem. After several reported scandals, involving the addition of water, starch, whey, urea and formaldehyde, the authorities and dairy companies started monitoring quality more carefully, aiming to curb fraud. However, despite the new rules implemented by the Normative Instructions of 2018, the difficulty in attesting the identity and authenticity of the products persists, due to the matrix complexity. Therefore, there is a growing demand by the market, for new propositions, including instrumental and methodological technological solutions applicable in the routine. In this context, this thesis proposes to develop and evaluate three portable instrumental systems to determine milk adulterants *in loco* in a fast, simple, and direct way, without the need to perform analytes extraction and pre-concentration. The 3 semi-automated systems are based on colorimetric reactions or spot tests, analyzed through digital images. System I use a portable flatbed scanner as a detector and treats images using univariate or multivariate linear regressions by the *QuantColour* a lab-made software. System II consists of a box with LED controlled lighting, in which the samples are arranged in a 96-well plate and the acquisition being made by the smartphone applicative developed the *QuantRGB*. And, System III employs a colorimeter designed for on-site determinations, which communicate data via USB, built with an inexpensive color sensor and another of solid-state semiconductor oxide, controlled by an arduino board (open source). Systems I, II and III were initially assembled and calibrated with six food dyes to study and establish the best analytical responses. Subsequently, the performance of the 3 proposed Systems was evaluated using fresh fluid milk using 3 proposed methods with 3 different applications. The first application consisted of measuring the pH with the red indicator of alizarin S, to verify that the value is in accordance with specification (pH 6.6-6.8). The second application consisted of a screening method to certify the presence of the re-constituent starch. And the third application addressed a method to certify the fraudulent addition of urea, distinguishing by the naturally content found in milk, by adding the enzyme urease to the analytical curves and using the derivative p-dimethylaminobenzaldehyde. The developed Systems I, II and III showed potential application and feasibility of use, considering that the quantitative results were equivalent between Systems in comparing to obtained by a commercial spectrophotometer, used as reference. Although the sensitivity and the detectability are different, the figures of merit proved to be adequate to meet the concentration ranges required by the legislation. The proposed Systems and Methods have also shown promise in the application of milk samples *in situ* analysis, representing a reliable alternative to screen and detect urea and starch derivatives added to cow's milk.

Keywords: software and mobile app developed; analysis of digital images; flatbed scanner; smartphone; spot test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema da cadeia produtiva do leite pós implementação da IN 76 e 77/2018 e riscos de fraudes	17
Figura 2 -	Representação matemática de uma imagem digital monocromática na forma matricial, em que os elementos da matriz são os pixels.....	21
Figura 3 -	Diferentes resoluções para representação de um mesmo objeto	22
Figura 4 -	Primeira imagem digital do filho de Russell A. Kirsch em 1957.....	23
Figura 5 -	a) Imagens do trabalho de Russell e colaboradores digitalizada no primeiro scanner esquematizado na Figura(b).....	23
Figura 6 -	Esquema de conversão dos sensores CCD e CMOS	25
Figura 7 -	Fenômenos que podem ocorrer com a luz incidente e a forma com que a cor pode ser vista dependendo do material.....	26
Figura 8 -	Espectro eletromagnético com destaque para a faixa da região visível	27
Figura 9 -	Modelo de cores primárias RGB e CMY e escala de cinza (KW).....	28
Figura 10 -	Modelo de cores HSB e HSL.....	30
Figura 11 -	(a) Esquema das partes do Sistema instrumental I empregando scanner CIS-CCD. (b) Sistema I montado	37
Figura 12 -	Layout geral do software QuantColour.....	38
Figura 13 -	(a) Áreas selecionadas pelo programa QuantColour para aquisição da imagem digital das amostras. (b) Zoom da área selecionada de cada poço da placa	39
Figura 14 -	Recursos do software QuantColour, mostrando a planilha na qual pode-se inserir as concentrações de cada amostra a ser analisada por poço	40
Figura 15 -	(a) Esquema do Sistema instrumental II em que o smartphone é utilizado para aquisição das imagens digitais posicionado sobre uma microplaca de 96 poços. (b) Imagem do Sistema II montado	41
Figura 16 -	Recursos do aplicativo QuantRGB desenvolvido. (a) “Tutorial” da utilização. (b) Menu de seleção da imagem – opção “Selecione imagem” da câmera para aquisição da imagem ou da galeria. (c)	

	“Adicionar” região a ser analisada através do touch screen, juntamente com a concentração relacionada, contando com a opção, se necessário de “Remover”. (d) Aplicar a “Regressão Linear” simples para as variáveis <i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i> . (e) Menu “Amostra” no qual serão mostrados os resultados correspondentes em cada uma das variáveis <i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i>	42
Figura 17 -	(a) Placa arduino UNO R3 (b) LCD Keypad Shield 16x2. (c) Sensor de cor TSC230, utilizados no Sistema Instrumental III	43
Figura 18 -	Perfil da região espectral que o sensor TSC230 é capaz de atuar em função do comprimento de onda normalizado.....	44
Figura 19 -	Prototipagem do colorímetro confeccionado neste trabalho feita no software Blender v2.82 ^a	45
Figura 20 -	(a) Software Creality Slicer 1.2.3 utilizado para a impressão. (b) Sistema Instrumental III – colorímetro lab-made montado	46
Figura 21 -	Recursos do Microsoft Office Excel para a) “comunicação serial via USB com arduino, (b) adquirindo os dados <i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i> , com um conversor e normalizador de dados para a cor visual, HEX (hexadecimal), HSV ou HSL e CYMK.	47
Figura 22 -	Espectros de varredura no visíveis dos seis corantes utilizados na calibração do Sistemas I, II e III propostos.....	64
Figura 23 -	Curvas analíticas nos comprimentos de ondas máximos dos corantes usados na calibração dos três Sistemas I, II, III desenvolvidos.....	65
Figura 24 -	Espectro de varredura do corante vermelho utilizado para otimizar todos os três Sistemas propostos.....	66
Figura 25 -	Imagens obtidas utilizando o Sistema I (a) escaneada a 300 DPIs da placa de 96 poços com volume de 350 µL de corante vermelho na concentração de 10,0 mg L ⁻¹ , indicando a formação de sombras. (b) Padronizações de áreas da imagem, visando tratar via software <i>QuantColour</i> esses efeitos.....	67
Figura 26 -	Imagem digital adquirida utilizando o Sistema II via câmera do smartphone Moto G, com resolução de 13 MP (4:3), da placa de 96 poços com volume amostral de 350 µL e corante vermelho a 10,0 mg L ⁻¹ , sendo tratada pelo aplicativo <i>QuantRGB</i>	70

Figura 27 -	Imagens das placas variando a intensidade luminosa dos LEDs em alta, média e baixa potência e respectivas ampliações dessas imagens com os pontos de corte ativados via touch screen	71
Figura 28 -	(a) Espectro de varredura do corante vermelho utilizando ($\lambda_{\text{máx}} = 508 \text{ nm}$) no Sistema II mostrando a cor refletida e complementar e (b) Intensidade do sinal do corante vermelho quando a potência de iluminação dos LEDs é variada.....	74
Figura 29 -	Imagem escaneada no Sistema I, na qual os volumes de amostragem variaram de 75,0 a 400,0 μL distribuídos ao longo das colunas A a H da placa de 96 poços	76
Figura 30 -	Imagens escaneadas das placas com os 6 corantes estudados variando-se a concentração de 0,0 a 10,0 mg L^{-1} (conforme planejamento da Tabela 2) em volumes fixos de 250,0; 300,0 e 350,0 μL no Sistema I	79
Figura 31 -	(a) Curvas analíticas do corante vermelho (0,5 a 10,0 mg L^{-1}) em função dos diferentes volumes amostrais (250,0; 300,0 e 350,0 μL) empregando o Sistema I. (b) Resultados das médias das intensidades de G normalizadas com as respectivas Equação das retas	79
Figura 32 -	(a) Foto da placa de 96 poços adquirida via câmera do smartphone na resolução de 13 MP (4:3) variando os volumes de 75,0 a 400,0 μL distribuídos ao longo das colunas A à H. (b) Tela do aplicativo QuantRGB utilizado no tratamento das imagens do Sistema II.....	80
Figura 33 -	Fotos das placas com os 6 corantes estudados variando-se as concentrações de 0,0 a 10,0 mg L^{-1} (conforme planejamento da Tabela 2 – 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0) em volumes fixos de 250,0; 300,0; e 350,0 μL , adquiridas com qualidade de 13 MP (4: 3) e intensidade baixa (1,10 W) da potência dos LEDs pelo Sistema II proposto	82
Figura 34 -	(a) Avaliação do volume ideal a ser utilizado no Sistema II considerando os maiores coeficientes angulares das curvas analíticas do corante vermelho (0,5 a 10,0 mg L^{-1}) para	

	diferentes volumes amostrais (250,0; 300,0 e 350,0 μL). (b) Resultados das médias das intensidades da variável G normalizada com as respectivas Equações da reta	83
Figura 35	- Gráfico do o sinal R, G e B no estudo do melhor volume do Sistema III com corante vermelho a 10,0 mg L-1 e os calibrantes branco e preto utilizados	85
Figura 36	- Imagens escaneadas das microplacas contendo os 6 corantes estudados variando-se a concentração de 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg L-1 (conforme planejamento da Tabela 2) nas resoluções de 50, 300 e 600 DPI utilizando o Sistema I	86
Figura 37	- Avaliação da resposta das intensidades de sinal médias de - log (G/255) em função da variação das resoluções de 50, 300 e 600 DPI utilizando o Sistema I pela inclinação das curvas analíticas do corante nas concentrações de 0,0 a 10,0 mg L-1	86
Figura 38	- Fotos das placas das curvas analíticas dos 6 corantes variando sua concentração de 0,0 a 10,0 mg L-1(conforme planejamento da Tabela 2), tiradas com qualidade variando de 6, 8 e 13 MP, empregando a intensidade baixa de potência (1,10 W) dos LEDs na iluminação do Sistema II proposto	88
Figura 39	- Curvas analíticas do corante vermelho variando de 0,0 a 10,0 mg L-1 avaliando-se a qualidade das imagens em diferentes resoluções: 6; 8,7 e 13 MP empregando-se o Sistema II proposto	88
Figura 40	- Curvas analíticas do corante vermelho variando de 0,0 a 10,0 mg L-1 avaliando-se a qualidade em relação a melhor frequência de conversão dos dados do sensor TSC230 do Sistema III.....	90
Figura 41	- Imagens digitais das placas com os 6 corantes estudados variando-se a concentração de 0,00 a 100,00 mg L-1 (n=3) (conforme planejamento da Tabela 4), adquiridas na qualidade de 300 DPI (Sistema I), 13 MP e na intensidade dos LEDs 1,10 W (Sistema II) e uma imagem dada pelo <i>QuantColour</i> da cor complementar.....	91
Figura 42	- Espectros das cores refletidas e complementares no visível para cada um dos 6 corantes estudados. (a) Curvas analíticas	

apresentando a intensidade média das cores (n=3) pelos 3 Sistemas propostos (I, II e III) (b), com as respectivas Equações das retas, coeficientes de determinação e faixa linear de trabalho	94
Figura 43 - Imagem digital adquirida pelo smartphone no Sistema II dos indicadores testados, utilizando-se 340,0 µL de amostra de leite cru com 10,0 µL de diversos indicadores a 72 % (v/v) em diferentes pHs de 5,00 a 8,00 (intervalos de 0,10 e 0,50).....	99
Figura 44 - Reação dos indicadores (a) alizarina, (b) azul de bromotimol, (c) misto (verde de bromocresol e vermelho de metila) de meio ácido para um meio básico (pH de 5,0 a 8,0).....	100
Figura 45 - (a) Perfil de resposta de $-\log(R, G, B /255)$ em função da variação do pH para avaliar o sinal dos diferentes indicadores testados. (b) Curvas analíticas para os indicadores testados empregando-se o Sistema II	101
Figura 46 - Escolha do volume ideal de indicador de azul de bromotimol na concentração de 1,0 % (m/v) para melhor diferenciação do sinal de $-\log(R/255)$ para a determinação do pH	102
Figura 47 - (a) Imagem dos tubos utilizados nas medidas de pH realizadas em potenciômetro recém calibrado a 20,0 oC e por meio do Sistema III, empregando 5,0 mL de amostras de leite fresco e 358,0 µL de indicador alizarol a 0,2 % (m/V, em solução etanólica 72%), para uma faixa mais ampla de variação de pH de 5,0 a 8,0 e (b) num intervalo mais próximo ao valor legislado entre 6,6 a 6,8	103
Figura 48 - (a) Intensidade da variável G nos Sistemas I, II e III em função do pH variado de 5,0 a 8,0. (b) Curvas analíticas da variação de sinal $-\log(G/255)$ em função do pH para o indicador alizarina para os Sistemas propostos.....	105
Figura 49 - (a) Planejamento das posições da microplaca para a aquisição das imagens dos Sistemas I e II propostos como teste preliminar para detecção de amido no leite cru de 0,0 a 1000,0 mg L ⁻¹ pela reação da solução de 25,0 µL de solução de lugol a 10,0 % (m/V). (b) Tubos com 5,0 mL de leite fresco complexados com	

	385,0 μL com concentração amido variando 0,0 a 1000,0 mg L^{-1} empregando o Sistema III	107
Figura 50	- (a) Imagem adquirida pelo Sistema II proposto como teste preliminar para detecção de amido no leite cru de 0,0 a 1000,0 mg L^{-1} em reação com solução de 25,0 mL de solução de lugol a 10,0 % (m/V). (b) Intensidade de sinal para as variáveis R, G e B em função da concentração do amido (b) Curvas analíticas conforme a faixa de trabalho para a variável R	109
Figura 51	- Imagem digital de amostras de leite cru bovino analisadas pelo Sistema II em que: (1) amostra sem tratamento, tomado como referência/controle; (2) amostra tratada com urease e sem derivatização; (3) amostra derivatizada com p-DMAB; (4) amostra de leite	111
Figura 52	- Médias de variáveis - log (R, G, B/255) ressaltando a cor complementar do amarelo – o azul nas microplacas, resultante dos controles e tratamentos aplicados com e sem derivatização com p-DMAB	112
Figura 53	- Reação colorimétrica entre a ureia e p-dimetilaminobenzaldeído (p-DMAB)	113
Figura 54	- Imagens adquiridas empregando o Sistema I, utilizando 325,0 μL de amostra para 25 μL de solução de p-DMAB a 2,0 % e para o Sistema III, utilizando tubos com 4,50 mL de leite e 0,50 mL da mesma solução de cromogênio	115
Figura 55	- (a) Linearidade da curva em leite cru de 0,0 a 1000,0 mg L^{-1} de ureia para as 3 cores primárias distintas (R-red, G-green e B-blue). (b) Faixa linear das curvas analíticas com adição de padrão de ureia ao leite cru (referência/controle – linha pontilha azul) e do leite cru tratado com urease (linha pontilhada vermelha), utilizando a componente (B) do sistema RGB	116
Figura 56	- (a) Espectro de varredura do produto de reação da ureia com o p-DMAB e curvas analíticas da ureia em leite cru, água e água:acetonitrila (1:1, v/v), lidas no comprimento de onda máximo em 435 nm	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Técnicas e métodos oficiais para detecção de fraudes em leites.....	19
Tabela 2 -	Preços dos componentes utilizados nos protótipos.....	48
Tabela 3 -	Planejamento para avaliar a melhor resposta da inclinação para os 6 corantes alimentícios estudados na placa de 96 poços em função de suas curvas analíticas, variando-se as concentrações entre 0,00 a 10,00 mg L ⁻¹	51
Tabela 4 -	Planejamento para avaliação preliminar dos volumes ideais a serem utilizados na placa de 96 poços, com variação entre 50,0 a 400,0 µL e utilizando-se uma solução de corante vermelho 10,0 mg L ⁻¹	52
Tabela 5 -	Possíveis frequências do sensor TSC230 do Sistema III	53
Tabela 6 -	Planejamento utilizado na avaliação dos Sistemas I e II, quanto a linearidade e a faixa de trabalho das curvas analíticas dos corantes, variando-se a concentração entre 0,00 e 100,00 mg L ⁻¹	54
Tabela 7 -	Planejamento do estudo do pH de amostras de leite fresco, com variações entre 5,00 a 8,00, com intervalos de 0,50 (H a E) e 0,10 (A a D), utilizando-se ácido láctico e hidróxido de sódio, ambos a 1,0 mol L ⁻¹	57
Tabela 8 -	Planejamento de distribuição nas microplacas de amostras de leite fresco adulteradas em diferentes concentrações finais (0,0 e 1000,0 mg L ⁻¹) de amido e a solução de lugol 10,0%, para avaliar o desempenho dos Sistemas I e II propostos, com base em sua sensibilidade.....	60
Tabela 9 -	Regiões espectrais (nm) de algumas cores primárias e secundárias, e suas cores complementares	65
Tabela 10 -	Resultados das médias e desvios das intensidades de G do corante vermelho avaliando a iluminação da barra de LEDs do scanner, desconsiderando-se a área da sombra em cada poço feitas pelo software QuantColour ao empregar o Sistema I.	68

Tabela 11 - Resultado da análise de variância (ANOVA) avaliando a iluminação da barra de LED do scanner no Sistema I, desconsiderando área da sombra em cada poço.....	69
Tabela 12 - Resultado das médias e desvios das intensidades RGB em que foi variada a iluminação pelo controle da potência das fitas de LEDs do Sistema II em alta, média e baixa potência aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey para comparar as médias (n=3).....	72
Tabela 13 - Resultado das médias e desvios da intensidade da variável G e ANOVA feita com os dados de iluminação dos LEDs do Sistema II em baixa potência (1,10 W).....	73
Tabela 14 - ANOVA para a intensidade de sinal da variável G em 96 poços de uma placa ELISA demonstrando a variância ocorrida quando a iluminação dos LEDs da caixa do Sistema II foi controlada a baixa potência (1,10 W)	73
Tabela 15 - Intensidades médias da variável G com os respectivos desvios padrão e o resultado da ANOVA das dez leituras de dez tubos distintos, com água ultrapura e com solução de corante vermelho na concentração de 10,0 mg L ⁻¹ (n =10) utilizando o Sistema III	75
Tabela 16 - Resultado das médias e desvios padrão das intensidades na variável G quando o volume de amostra foi variado de 50,0 a 400,0 µL nas colunas de A à H da placa de 96 poços	77
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) avaliando a média das intensidades da variável G em função dos diferentes volumes amostrais adotados no Sistema I proposto	78
Tabela 18 - Resultado das médias das intensidades da variável G e desvios, quando o volume nas colunas de A à H da placa de 96 poços foi de 50,0 a 400,0 µL.	81
Tabela 19 - ANOVA comparando os diferentes volumes amostrais para o Sistema II	81
Tabela 20 - ANOVA dos resultados das médias das intensidades e desvios padrão dos tubos utilizados no Sistema III no estudo de variação de volume de 0,0 a 10,0 mL, lidos dez vez (n=10) com solução do corante vermelho (10,0 mg L ⁻¹) e água ultrapura (branco	

	analítico), recém calibrado com corante branco e preto em frequência fixa de 20%	84
Tabela 21	- Resumos dos parâmetros adotados após a otimização das condições experimentais analíticas nos Sistemas I, II e III propostos	91
Tabela 22	- Intensidade média de dez leituras feitas em triplicata das cores refletidas em R, G e B utilizando-se o Sistema III a frequência de 20% e volume de 5,0 mL de corantes variando as concentrações de 0,00 a 100,00 mg L ⁻¹	92
Tabela 23	- Média das intensidades das cores complementares de R, G e B de dez leituras feitas em triplicata (n=3) e as respectivas cores que são absorvidas em função das concentrações de 0,00 a 100,00 mg L ⁻¹	93
Tabela 24	- Acurácia avaliada pela ANOVA por comparação das respostas dadas por 12 amostras de corantes alimentícios, preparadas em concentrações nas faixas lineares de cada corante, determinadas nos 3 Sistemas I, II e III propostos e pelo espectrofotômetro UV/Vis (n=3)	97
Tabela 25	- Planejamento e resultado das imagens das curvas analíticas empregando os Sistemas I e II para a determinação do pH em amostras de leite cru na faixa de 5,0 a 8,0 utilizando-se o indicador alizarina	104
Tabela 26	- Resultados dos sinais de R, G e B dos tubos com 5,0 mL de leite fresco com 358,0 µL de solução indicadora de alizarina a (0,2 %, m/V) em pHs de 5,0 a 8,0 adquiridos pelo Sistema III	105
Tabela 27	- Valores médios de pH (n=3) para as 4 amostras de leite fresco por meio das imagens digitais utilizando o indicador alizarina realizadas nos Sistemas I, II e III propostos e no potenciômetro (método de referência)	106
Tabela 28	- Valores médios de pH (n=3) para as 4 amostras de leite fresco por meio das imagens digitais utilizando o indicador alizarina realizadas nos 3 Sistemas propostos e no potenciômetro (método de referência)	110

Tabela 29 - Comparação entre as médias dos tratamentos aplicados no leite cru	112
Tabela 30 - Atividade enzimática da urease (n=2) em leite cru.....	114
Tabela 31 - Parâmetros de validação avaliados utilizando a variável B (blue) para o método proposto empregando o derivatizante p-DMAB na determinação de ureia em leite bovino cru e leite tratado com urease, empregando a câmera de um smartphone acoplada ao Sistema II com iluminação controlada.....	116
Tabela 32 - Parâmetros avaliados utilizando a variável B para o método proposto empregando p-DMAB na determinação ureia em leite bovino cru e leite tratado com urease, fazendo uso da câmera de smartphone no Sistema II com iluminação controlada (n=3).....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
ABLV	Associação Brasileira de Leite Longa Vida
ACN	Acetonitrila
AOAC	Associação de métodos oficiais de análise (do inglês, <i>Association of official methods of analysis</i>)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês, <i>Charge-Coupled Device</i>)
CMOS	Óxido semicondutor de estado sólido (do inglês, <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>)
CV	Coefficiente de Variação (do inglês, <i>Coefficient of Variation</i>)
BITMAP	Mapa de <i>bits</i>
BMP	Windows <i>Bitmap</i>
CCS	Contagem das células somáticas
CTB	Contagem total bacteriana
DPC	Pontos por centímetro
DPI	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegadas)
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EP	Erro padrão de estimativa
FAO	A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization</i>)
(GAC)	<i>Green Analytical Chemistry</i> (Química Analítica Verde)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSV	<i>Hue, Saturation, Value</i> (matiz, saturação, valor)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDE	<i>Integrated Development Environment</i> (Ambiente de Desenvolvimento Integrado)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>

PIXEL	<i>Pictures elements</i> (elemento de imagem)
RGB	<i>Red, Green, Blue</i> (vermelho, verde, azul)
RLS	Regressão Linear Simples
RLM	Regressão Linear Múltipla
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mL de leite
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	ASPECTOS GERAIS DO LEITE BOVINO	15
1.1.1.	Importância do Leite	15
1.1.2.	Fraudes, adulterações e instruções normativas	15
1.1.3.	Métodos para detecção de adulterantes em leite bovino	18
1.2.	SPOT TEST	19
1.3.	IMAGEM DIGITAL	20
1.3.1.	RESOLUÇÃO E QUALIDADE (DENSIDADE DA IMAGEM)	21
1.3.2.	História	22
1.3.3.	Sensor de imagem	25
1.3.4.	Teoria das cores.....	26
1.3.4.1.	Modelo RGB e CMYK	27
1.3.4.2.	Modelo HSV e HSL	29
1.4.	APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR IMAGEM DIGITAL EM LEITE	31
2.	OBJETIVOS	36
2.1.	OBJETIVOS GERAIS	36
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	PROCEDIMENTOS	37
3.1.	INSTRUMENTAÇÃO	37
3.1.1.	Sistema scanner de mesa com sensor CIS (Sistema I)	37
3.1.1.1.	Montagem do Sistema I	37
3.1.1.2.	Software QuantColour	38
3.1.2.	Sistema smartphone com sensor CMOS (Sistema II)	40
3.1.2.1.	Montagem do Sistema II	40
3.1.2.2.	Aplicativo QuantRGB	42
3.1.3.	Colorímetro Portátil Lab-made com sensor CMOS (Sistema III)	43
3.1.3.1.	Hardware.....	43
3.1.3.2.	Montagem do colorímetro	44
3.1.3.3.	Software	46

3.2.	CUSTOS DOS PROTÓTIPOS.....	47
3.3.	EXPERIMENTAL.....	48
3.3.1.	Materiais e equipamentos	48
3.3.2.	Amostras	49
3.3.3.	Calibrantes dos sistema	49
3.3.4.	Tratamento dos dados	49
3.3.5.	Otimização e calibração parâmetros instrumentais dos sistemas.....	50
3.3.5.1.	Iluminação.....	50
3.3.5.2.	Volume de amostras	51
3.3.5.3.	Resolução, qualidade (densidade) e frequência	52
3.3.6.	Calibração dos sistemas e parâmetros analíticos	53
3.3.7.	Desenvolvimento e aplicação dos métodos analíticos	55
3.3.7.1.	Determinação do pH (1ª aplicação).....	56
	Método de referência	56
	Adaptação do método para os sistemas	57
	Teste de indicadores: alizarina, azul de bromotinol e indicador misto.....	58
3.3.7.2.	Determinação de amido (2ª aplicação).....	58
	Método de referência	59
	Adaptação do método para os Sistemas.....	60
3.3.7.3.	Determinação de uréia(3ª aplicação)	61
	Método espectrofotométrico	61
	Adaptação do método para os sistemas	62
3.3.8.	Análise estatística.....	62
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1.	ESTUDO DOS CALIBRANTES DOS SISTEMAS	64
4.2.	OTIMIZAÇÃO E CALIBRAÇÃO DOS PARÂMETROS DOS SISTEMAS	66
4.2.1.	Iluminação.....	67
4.2.1.1.	Sistema I	67
4.2.1.2.	Sistema II	69
4.2.1.3.	Sistema III	75
4.2.2.	Volume amostra	76
4.2.2.1.	Sistema I	76

4.2.2.2.	Sistema II	80
4.2.2.3.	Sistema III	83
4.2.3.	Resolução, qualidade (densidade) e frequência	85
4.2.3.1.	Sistema I	85
4.2.3.2.	Sistema II	87
4.2.3.3.	Sistema III	89
4.3.	CALIBRAÇÃO DOS SISTEMAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS	90
4.3.1.	Estudo da linearidade e faixa de trabalho	91
4.3.2.	Precisão e Exatidão	97
4.4.	DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS PROPOSTOS EM AMOSTRAS DE LEITE	98
4.4.1.	Determinação do pH	98
4.4.1.1.	Método por análise de imagem digital	103
4.4.2.	Determinação de amido	107
4.4.2.1.	Método determinação de amido	108
4.4.3.	Determinação de ureia	110
4.4.3.1.	Atividade enzimática da urease no leite cru	113
4.4.3.2.	Método espectrofométrico	117
4.4.3.3.	Aplicação do método em amostras	119
	REFERÊNCIAS	121
1.	ESTUDO DO TRATAMENTO DAS VARIÁVEIS R, G E B	127
2.	LINEARIDADE DOS SEIS CORANTES PARA AS VARIÁVEIS R, G E B	128
2.1.	LINEARIDADE, FAIXA DE TRABALHO E CURVAS ANALÍTICAS EMPREGANDO O SISTEMA I	128
2.3.	LINEARIDADE, FAIXA DE TRABALHO E CURVAS ANALÍTICAS EMPREGANDO O SISTEMA II	130
2.4.	LINEARIDADE, FAIXA DE TRABALHO E CURVAS ANALÍTICAS EMPREGANDO O SISTEMA III	132

ANEXO II – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O

DOUTORAMENTO	134
ARTIGOS PUBLICADOS	134
PEDIDO DE PATENTE NO INPI.....	135
PROGRAMAS DE COMPUTADOR COM REGISTRO CONCEDIDOS PELO INPI POR 50 ANOS	135
QuantRGB – TRABALHO EM ANDAMENTO	148
SpotMilkTest.....	148

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DO LEITE BOVINO

1.1.1. IMPORTÂNCIA DO LEITE

O leite é um alimento nutricionalmente completo, rico em proteínas de alta qualidade, carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais essenciais na dieta humana e para outros mamíferos. Essa riqueza de componentes torna-o uma excelente matriz para fabricação de derivados como queijos, requeijão, bebidas lácteas entre outros. Devido a esses fatores e ao crescimento populacional mundial, a produção de leite bovino tem aumentado crescentemente (NEUMANN, HARRIS, ROGERS, 2002).

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) no ano de 2018 a produção mundial de leite foi de 843 milhões de toneladas. O Brasil figura entre os dez maiores produtores do mundo, apresentando uma produção leiteira de 33,8 bilhões de litros neste mesmo ano (FAO, 2018; STASTISTA, 2018; IBGE, 2018).

Devido a esse valor nutricional e econômico, o leite têm sido um dos produtos mais susceptíveis a adulterações, sendo facilmente fraudado em todo o mundo (MOORE, SPINK, LIPP, 2010). A legítima motivação para a fraude do leite é econômica, porém impacta e representa uma preocupação real à saúde pública (ELLIS, BREWSTER, DUNN, ALLWOOD, GOLOVANOV E GOODACRE, 2012). A situação em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos é ainda pior, devido à falta de monitoramento e fiscalização adequadas; à falta de aplicação de normas ou leis; e devido à implementação de métodos não robustos e ineficazes (FOLHA, 2007).

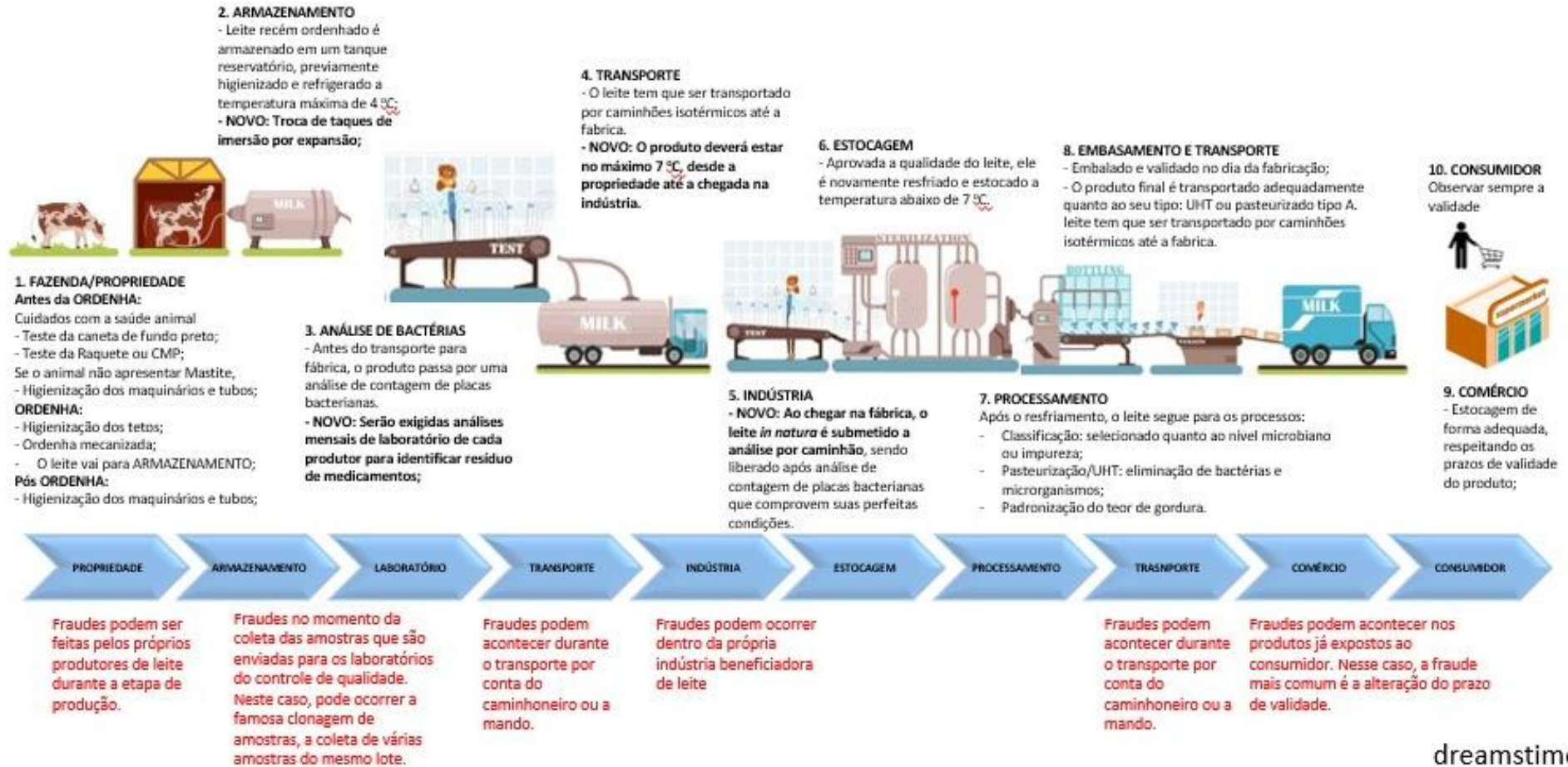
1.1.2. FRAUDES, ADULTERAÇÕES E INSTRUÇÕES NORMATIVAS

No Brasil, dois grandes escândalos de adulteração de leite foram relatados pela Polícia Federal. Em 2007, a operação chamada de Ouro Branco, iniciada na região Sul do País (Caxias do SUL), o Ministério Público e a Polícia Federal relataram o uso de diversas substâncias como citratos, hidróxidos, cloretos, sacarose, fosfatos,

carbonatos, bicarbonatos e peróxido de hidrogênio para mascarar o aumento do volume, a elevada acidez e controlar o crescimento microbiano no leite (FOLHA, 2007, HOORFAR, 2012). Em 2013, a operação Leite Compensado revelou a utilização de fertilizantes contendo ureia e formaldeído para mascarar a adição de água no leite (UOL, 2014). Segundo um estudo feito por Souza et al. (2011) de cada 100 amostras de leite UHT analisadas: 55 deram positivo para urina, 44 para formaldeído, 30 para peróxido de hidrogênio e 12 para cloro livre. Em outros casos posteriores, foram constatadas a presença de água e soda cáustica no leite no Rio Grande do Sul em 2017, e em Minas Gerais foram detectados no leite em pó o soro de leite e o açúcar em 2018 (GLOBO, 2017, ESTADO DE MINAS GERAIS, 2018).

No ano de 2018, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implementou novas instruções para cadeia de produção de leite bovino, especificando os padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, do pasteurizado e do tipo A. As Instruções Normativas (IN) em vigor são as 76, 77 e 78 de novembro de 2018. Na IN 76/2018 são definidos os critérios da identidade e parâmetros de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A (BRASIL, 2018). Na IN 77/2018 estão definidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru nos estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial (BRASIL, 2018). E, na IN 78/2018 estão estabelecidos os requisitos e procedimentos para o registro de provas zootécnicas, visando o controle leiteiro e avaliação genética de animais com aptidão leiteira (BRASIL, 2018). Resumidamente, as novas normas podem ser esquematizadas como indicado na Figura 1.

Figura 1. Esquema da cadeia produtiva do leite pós implementação da IN 76 e 77/2018 e riscos de fraudes



Fonte: IN 76, 77, 78/2018 adaptada com imagem do site <https://www.dreamstime.com/>

As análises implementadas pela INs seguem métodos padronizados pela *International Organization for Standardization* (ISO), que são basicamente, análises microbiológicas e físico-químicas que conseguem determinar a qualidade de leite e detectar algumas fraudes. Em situações em que a adulterações são mais sofisticadas, essas análises são insuficientes.

Em 2018, o MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) disponibilizou um manual de métodos para análise de produtos de origem animal, mas estas análises são obrigatórias somente na chegada do caminhão na indústria, não garantindo a autenticidade do produto, nem antes, e nem após esta etapa, o que pode ser preocupante para o consumidor final (BRASIL, 2017, KAMTHANIA, SAXENA, SHARMA, 2014).

1.1.3. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE BOVINO

Os métodos recomendados para detecção de possíveis adulterantes no leite bovino e produtos derivados encontram-se no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal de 2018, ainda em vigor em 2021 (BRASIL, 2018). Este manual está embasado em alguns métodos que são encontrados na AOAC (*Association of official methods of analysis*) e em Normas da ISO, que vão desde métodos mais clássicos, como a titulação ácido-base aplicada na determinação da acidez total, até método mais modernos como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e a cromatografia de alta resolução e eficiência acoplada a espectrometria de massas (GC-MS/ HPLC-MS), conforme resumido na Tabela 1.

Tabela 1. Técnicas e métodos oficiais para detecção de fraudes em leites

Método	Tipo de Adulteração
Titulação ácido-base (indicadores)	Adição de substâncias básicas
Gravimetria	Adição de água
Crioscopia	Adição de água e sais
Potenciometria	Adição de substâncias básicas
Condutometria	Adição de reconstituintes salinos
Espectroscopia no infravermelho (NIRS, MIRS)	Adição de água, soro e reconstituintes (melamina, ureia e glicose)
Cromatografia líquida e gasosa (HPLC/GC)	Adição de conservantes, resíduos de antibióticos entre outros

Fonte: Adaptado de POONIA et al. (2016).

Apesar desses métodos serem clássicos e, bastante eficientes para qualidade do produto para certos adulterantes, ainda apresentam dificuldades em sua realização, seja pela: falta de acesso aos reagentes, materiais ou equipamentos de elevado custo; e/ou necessidade de maior capacitação da mão-de-obra; ou por não serem detectados em função de sofrerem degradação (ZERAİK, SOUZA, FATIBELLO-FILHO, LEITE, 2008). Por isso, justifica-se a necessidade de métodos rápidos, como algumas técnicas colorimétricas que fornecem resultado instantaneamente, com a utilização de aparatos de baixo custo e acessíveis, que permitam avaliar a integridade de praticamente todo o produto recebido para beneficiamento nas indústrias.

1.2. SPOT TEST

O *spot test*, também conhecido como teste de mancha ou análise do toque, é uma técnica analítica clássica que se baseia em reações químicas sensíveis e seletivas, que pela manipulação de pequenos volumes de reagentes e amostras, obtém como resposta mudanças visuais, como mudança de cor, formação de precipitado ou complexo (ZERAİK, SOUZA, FATIBELLO-FILHO, 2008; PACIORNIK, YALLOUZ, CAMPOS, GANNERMAND, 2006). Como essa técnica envolve baixo consumo dos reagentes e resposta rápida, acaba sendo utilizada em diversas áreas,

como em análises clínicas, ambientais, controles alimentícios entre outros (KOMPANY-ZAREH, MANSOURIAN, RAVAAE, 2002).

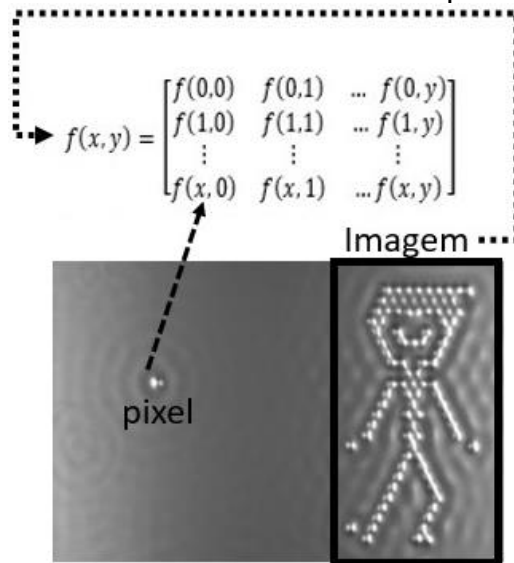
O *spot test* difundiu-se nos livros de Fritz Feigl, denominados de *Spot Tests in Inorganic Analysis* (FEILG e ANGER, 1972) e *Spot Tests in Organic Analysis* (FEIGL e ANGER, 1975). Segundo Fritz, um dos primeiros trabalhos a utilizar o *spot test* foi o de Friedlieb Ferdinand Runge, que impregnou amido e iodeto de potássio em papel de filtro e conseguiu detectar cloro livre, sendo Fritz considerado como o criador do *spot test*. Os *spots tests* clássicos eram realizados sobre papéis filtro e tinham um caráter mais qualitativo (*screening*), ou seja, teste “positivo” ou “negativo” para presença do analito, e quase não havia manejo na amostra (JUNGREIS, 1926). Caso a resposta se apresentasse positiva para a presença de determinado grupo de analitos, selecionava-se novas amostras, para posterior investigação com técnicas mais sofisticadas (ZERAIK, SOUZA, FATIBELLO-FILHO, 2008).

Atualmente, os *spots tests* são vistos como uma forma mais requintada, em que os testes são feitos em plataformas reutilizáveis e de forma quantitativa, como em análises clínicas, que mensuram a quantidade de glicose no sangue, em que a intensidade da cor desenvolvida é proporcional a concentração do analito (MATIAS, VILA, TUBINO, 2004).

1.3. IMAGEM DIGITAL

A imagem digital é uma representação gráfica de uma matéria composta por subunidades elementares chamadas de *pixel* (*picture elements*). Analogicamente, os *pixels* são como átomos (subunidades da matéria), que são unidades binárias que carregam informações sobre a intensidade de luz refletida sobre o material, como a cor, formato, distância, profundidade, entre outros parâmetros, que se organizam para formar uma imagem mais próxima da visão humana (GONZALEZ, WOODS, 2008; FOLEY, 1990) (Figura 2).

Figura 2. Representação matemática de uma imagem digital monocromática na forma matricial, em que os elementos da matriz são os pixels



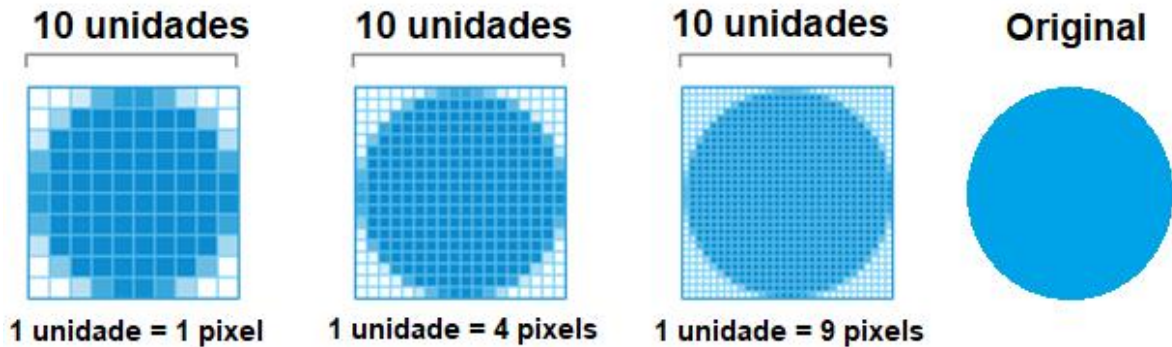
Fonte: adaptado de Scuri (2002) e <https://www.research.ibm.com/articles/madewithatoms.shtml?lnk=ushpls1>.

Para se garantir que uma imagem digital seja a mais próxima da cena são fundamentais parâmetros como a iluminação sobre o objeto, a forma de aquisição, a forma do processamento dos dados, a plataforma de visualização ou projeção da imagem (telas e monitores). A forma de visualização da imagem digital é fundamental, pois ela é que irá ilustrar os parâmetros importantes, que muitas vezes são confundidos, como: resolução e qualidade ou densidade de uma imagem digital.

1.3.1. RESOLUÇÃO E QUALIDADE (DENSIDADE DA IMAGEM)

A resolução de uma imagem digital é o nível dos detalhes, representado pela quantidade de *pixels* em função do tamanho da cena (*número de pixels/tamanho real*). Ela pode ser calculada de forma simplificada pelo número de linhas em função da unidade do tamanho real da imagem digital (Figura 3) (NÓBREGA et al., 2008). A unidade de medida da resolução mais comum é dada pelo número de pontos por polegada ou *dpi* (*dots per inch*), muito confundida com a unidade da densidade de *pixel* ou qualidade da imagem, que é em *ppi* (*pixel per inch*, em português, *pixel por polegada*).

Figura 3. Diferentes resoluções para representação de um mesmo objeto



Fonte: adaptado de <https://www.cleanpng.com/png-responsive-web-design-pixel-density-device-indepen-3249030/download-png.html>

A qualidade de uma imagem digital depende diretamente com sua resolução. É por isso que, nem sempre quando a imagem digital é projetada pela tela ou monitor, esta apresenta a mesma resolução daquela que foi tirada por uma câmera de boa qualidade, impressa ou escaneada. A qualidade dos monitores atuais é próxima a 96 *dpi*, dos *scanners* de 1200 *dpi*; e da impressora jato de tinta é de 600 *dpi* (SCURI, 2002). Portanto, a qualidade da imagem depende de sua resolução, que por sua vez, dependerá da quantidade de *pixels* que a formarão.

O tamanho do arquivo de armazenamento da imagem digital corresponde às dimensões dos *pixels* e é dado em *bytes* (B). O formato do arquivo ou extensão (JPG, JPEG, PNG, GIF ou TIFF), fornece a profundidade de cor (*bit-depth*) e da textura e também influenciam na resolução e na qualidade da imagem. As ferramentas dos programas de edição de imagem são importantes para garantir a qualidade e as resoluções de uma imagem digital (SCURI, 2002; NÓBREGA et al., 2008).

1.3.2. HISTÓRIA

A primeira imagem digital registrada, foi feita pela equipe liderada por Russell A. Kirsch em 1957, em que uma fotografia de seu filho foi digitalizada em uma dimensão de 176 x 176 *pixel* (5 x 5 cm) (Figura 4). Apesar da falta de resolução e nitidez, este foi um grande divisor de águas entre uma imagem fotográfica (analógica) e uma imagem digital, pois este feito se deu antes mesmo do surgimento da primeira câmera digital em 1975 (NIST, 1957; KIRSCH, CAHN, RAY, URBAN, 1957; KITAURA,

YATA, YAMADA, 1975).

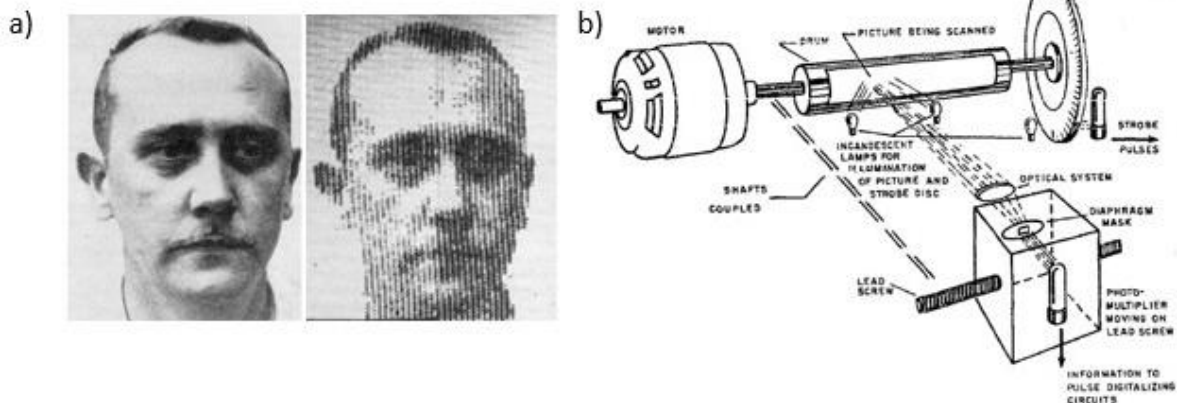
Figura 4. Primeira imagem digital do filho de Russell A. Kirsch em 1957



Fonte: NIST (1957).

Russell e sua equipe desenvolveram o primeiro *scanner* e o primeiro computador com armazenamento programável, chamado de SEAC (*Standards Eastern Automatic Computer or Standards Electronic Automatic Computer*), publicado no trabalho *Experiments in Processing Pictorial Information with a Digital Computer* na qual foi digitalizada a fotografia da Figura 5, utilizando o *scanner* esquematizado e o computador SEAC (KIRSCH, CAHN, RAY, URBAN, 1957).

Figura 5. a) Imagens do trabalho de Russell e colaboradores digitalizada no primeiro scanner esquematizado na Figura(b)



Fonte: KIRSCH, CAHN, RAY, URBAN, 1957

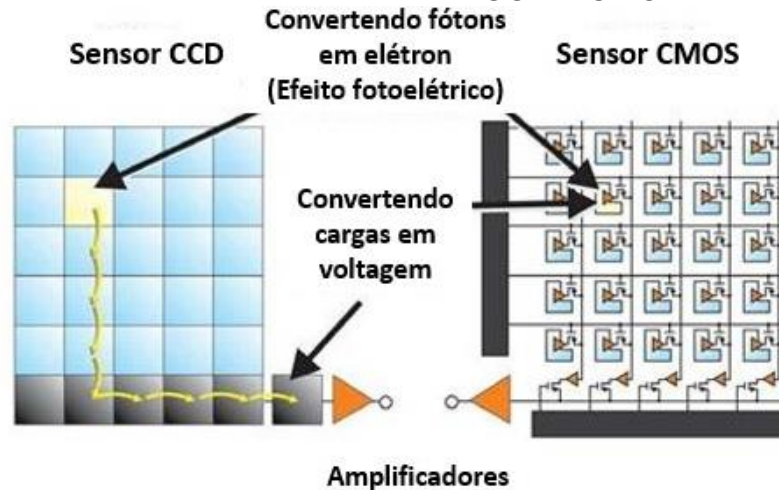
A vantagem do sistema estava no controle do motor que rotacionava o “tambor” sobre a fotografia, por isso o nome “*drum scanner*”, que incidia a luz sobre a imagem analógica (foto), e ao mesmo tempo adquiria a mesma luz refletida. E os dados adquiridos eram convertidos através do computador e *software*. A imagem digital era projetada em uma tela de tubo de raios catódico de um osciloscópio. As

limitações estavam no sensor de imagem digital, na qualidade da varredura e na falta de faixa de cores. As primeiras imagens digitais eram projetadas de forma binária (0 e 1), ou melhor, eram preto e branco (monocromática), e se distanciavam bastante da cena (analógica) vista a olho nu (KIRSCH, CAHN, RAY, URBAN, 1957, KIRSCH, 2010, MITCHELL, 1994).

Outro grande feito ocorreu em 1969, com a criação dos dispositivos de cargas acopladas (CCD, do inglês *Charge Coupled Device*) por Willard Boyle e George Smith, ganhadores do Prêmio Nobel de Física de 2009 por esse feito. O CCD surgiu a partir de pesquisas desenvolvidas nos Laboratórios *Bell* sobre semicondutores e diodos de silício e memórias para computadores, mas devido a sua alta potencialidade, os cientistas perceberam que o componente tinha outras aplicabilidades, como substituir as chapas de fotografias. O CCD é composto por diversos elementos de silício e outros metais, sensíveis aos fótons da luz, que estão organizados proporcionalmente no visor. Este componente permitiu a evolução dos *scanners* antigos, a criação da câmera digital (1975), as câmeras de vídeo e muitos outros equipamentos (SONKA, HLAVAC, BOYLE, 1993; KITAURA, YATA, YAMADA, 1975).

Na mesma época, em 1963, Frank Wanlass criou outro componente com a mesma finalidade utilizado para a memória de computadores, que foi o semicondutor de óxido metálico complementar (CMOS, do inglês *Complementary Metal Oxide Semiconductor*). O CMOS é um semicondutor de estado sólido, que utilizam fotodiodos e transistores para cada *pixel* da imagem. Nos primeiros modelos de CMOS havia um amplificador para cada coluna de elemento, que produziam um alto nível de ruído, além de outros problemas de saída, porque a transmissão era lenta. Somente no início dos anos 90, foi que os primeiros sensores CMOS com maior velocidade de saída e menor nível de ruído, começaram a ser comercializados em câmeras digitais de dispositivos móveis e em outros aparelhos (SAH, WANLASS, 1963; LUŠTICA, 2011) (Figura 6).

Figura 6. Esquema de conversão dos sensores CCD e CMOS



Fonte: Adaptado de LUŠTICA (2011).

Os novos CMOS podem incorporar outros circuitos no mesmo *chip* e eliminar os muitos chips separados que são requeridos por um CCD. Isto torna o equipamento menor, mais leve, mais barato e requer menor consumo de energia (LUŠTICA, 2011). Por este motivo, esse componente é um dos mais utilizados em câmeras digitais nos dias atuais.

1.3.3. SENSOR DE IMAGEM

Basicamente, para a aquisição de uma imagem digital é necessário a reflexão de uma fonte luminosa, em que a luz refletida pelo objeto é captada por um sensor sensível a fótons, que os converte em elétrons pelo efeito fotoelétrico por meio de fotodiodos ou fototransistores. Normalmente os conversores analógico-digital (A/D) são de 8 *bits* (1 *bit* = 2). Se um dispositivo apresenta três sensores: um para cada cor (vermelha, verde ou azul - R, G e B), então corresponderá a 24 *bits*, totalizando 256 tonalidades para cada cor (variando de 0 a 255), ou também, 16.777.216 de informações em um único *pixel* da imagem do objeto (PRATT, 1991; GONZALEZ, WOODS, 2008).

Os sensores mais comumente utilizados na química analítica são os dispositivos acoplados as cargas (CCD, do inglês *charge-coupled device*) e os semicondutores de óxidos metálicos complementares (CMOS, do inglês *complementary metal oxide semiconductor*), por apresentarem rápida aquisição do

sinal, apropriada adaptação a alguns métodos analíticos, fácil acesso e baixo custo de implementação (SENA et al., 2011; DE OLIVEIRA KRAMBECK FRANCO, 2017).

1.3.4. TEORIA DAS CORES

Uma imagem digital pode ser colorida ou monocromática, dependendo da cor original do material e de como esse recurso é capturado e projetado. A cor de uma imagem digital depende de muitos fatores, desde o fenômeno óptico da luz incidente (que pode ocorrer na superfície do material ou imagem, como reflexão, refração, transmissão ou absorção), dependendo da forma como a luz é capturada (SCURI, 2002; LOPES, 2009) (Figura 7).

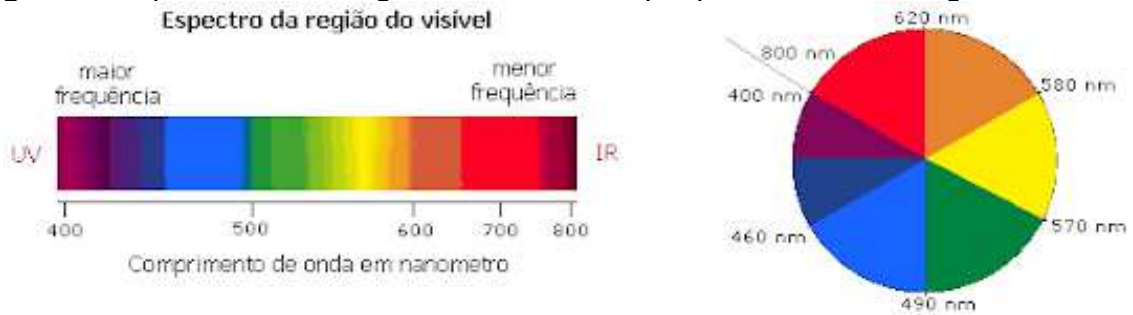
Figura 7. Fenômenos que podem ocorrer com a luz incidente e a forma com que a cor pode ser vista dependendo do material



Fonte: Adaptado de Lopes (2009).

A cor de um objeto pode ser definida como o reflexo da luz não absorvida pelo material que é visto pelo olho humano ou por um sensor. Naturalmente, o olho humano é sensível à faixa do espectro eletromagnético visível, que compreende os comprimentos de onda de 400 a 750 nm (Figura 8) (SCURI, 2002; GONZALES, WOODS, 1992). As cores de um objeto são naturalmente características intrínsecas do material provenientes da sua composição química, que absorve uma parte da radiação eletromagnética refletindo a outra parte, denominada de cor complementar.

Figura 8. Espectro eletromagnético com destaque para a faixa da região visível



Fonte: <https://aiq2011-blog.tumblr.com/post/3187398590/porque-o-mundo-%C3%A9-colorido/amp>

A cor e a forma com que a imagem é percebida pelos olhos, dependem principalmente das características da luz refletida de materiais opacos e translúcidos, por meio da retina. Materiais transparentes são definidos como incolores, mas são aparentes aos olhos por sua refração e, podem ser analisados por possuírem cor pela sua natureza química, ou terem a coloração formada por meio de agentes cromogênicos (SCURI, 2002; GONZALES, WOODS, 1992) (Figura 8).

Como a percepção de cor varia de pessoa para pessoa ou de dispositivo para dispositivo, foram criados os chamados modelo de cores, com objetivo de padronizar os principais parâmetros das imagens digitais. Os modelos mais comuns para representação de cores de qualquer imagem ou objeto, são: RGB (*red, green, blue*), CMY (*cyan, magenta, yellow*), CMYK (variante do modelo CMY, onde o K denota *black*), YIQ (padrão NTSC de TV em cores) e o HSI (*hue, saturation, intensity*), também denominado HSV (*hue, saturation, value*) (OLIVEIRA, 2012; GONZALEZ, WOODS, 2008).

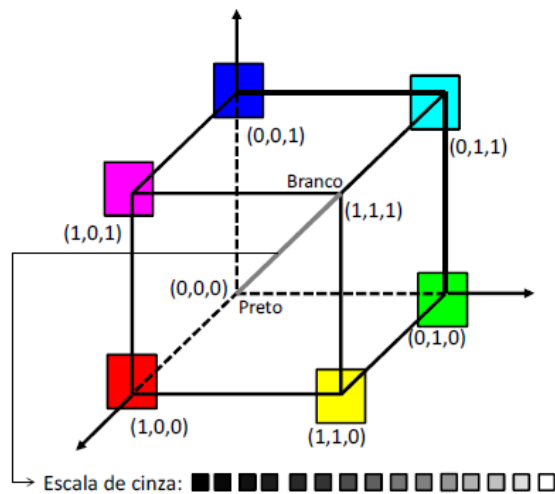
1.3.4.1. MODELO *RGB* E *CMYK*

O modelo RGB, também chamado de padrão Bayer, é um dos mais simples e utilizados baseados nas cores primárias das imagens digitais. Neste modelo são usados três sensores, cada um com um filtro específico para armazenar informações das imagens digitais em forma de matrizes, sendo que a matriz *R* (do inglês, *Red*) contém informações da cor vermelha, a *G* (*Green*) da cor verde e a *B* (*Blue*) da cor azul. Esses padrões são chamados de *RGB* (NÓBREGA et al., 2008; GODINHO et

al., 2008).

Este modelo é representado por um cubo com vértices do sistema de coordenadas cartesianas. Em um subespaço unitário estão nos vértices as três cores primárias (R, vermelho; G, verde; B, azul), alternadas com outros três vértices, nos quais estão as cores secundárias CMY (ciano, magenta e amarelo, do inglês, *cyan*, *magenta*, *yellow*) representado na Figura 9.

Figura 9. Modelo de cores primárias RGB e CMY e escala de cinza (KW)



Fonte: Adaptado de Gonzalez, Woods, Eddins (2004).

O modelo *CMYK* pode ser representado em função do modelo *RGB* através das Equações 1 a 4.

$$K = 1 - \max \left(\frac{R}{255}, \frac{G}{255}, \frac{B}{255} \right) \quad Eq. (1)$$

$$C = \left(\frac{1 - \frac{R}{255} - K}{1 - K} \right) \quad Eq. (2)$$

$$M = \left(\frac{1 - \frac{G}{255} - K}{1 - K} \right) \quad Eq. (3)$$

$$Y = \left(\frac{1 - \frac{B}{255} - K}{1 - K} \right) \quad Eq. (4)$$

A cor preta (*K*) encontra-se na origem (0, 0, 0) e do lado oposto, no qual todas as bandas alcançam o seu valor máximo (255, 255, 255) está a cor branca (*W*). Além disso, também há a escala de cinza, que são pontos em que os valores de *RGB* se

igualam. Convencionalmente, neste modelo, utilizam-se valores normalizados de 0 e 1 para cada cor e as cores são definidas por vetores que partem da origem (SCURI, 2002; OLIVEIRA, 2012; SOUZA et al., 2004).

O modelo *RGB* é baseado nas características de detecção de cores do olho humano, que possui células (denominadas cones) sensíveis a essas três regiões do espectro eletromagnético. É um padrão utilizado nos tubos de raios catódicos (CRT) das telas de TV e nos computadores que exibem várias cores, e está ainda presente em diversas outras tecnologias. Já o modelo *CMYK* é muito encontrado na maior parte das impressoras, que trabalham com a pigmentação *CMYK*, visando uma maior proximidade com a realidade.

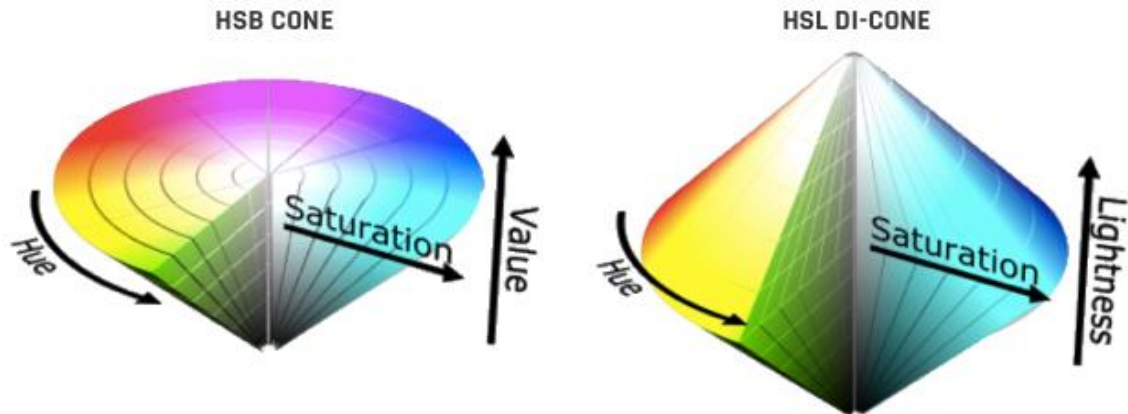
1.3.4.2. MODELO *HSV* E *HSL*

Outro modelo conhecido é o *HSV*, também conhecido como *HSB* ou *HSI* (do inglês, *Hue, Saturation, Value, Brightness, Intensity*), que significa Matiz (tonalidade), Saturação e Valor, Brilho ou Intensidade. Este modelo está relacionado com a intensidade, quantidade e brilho de uma imagem convertida em escala ou nível de cinza, que varia do preto aos tons de cinza, chegando ao branco (MACHADO, 2006; SANTOS, 2013).

Este modelo é muito interessante porque produz o contraste. Matiz é um atributo relacionado ao comprimento de onda dominante na mistura das ondas de luz. Portanto, a matiz representa a principal cor percebida pelo observador. Saturação refere-se à pureza relativa ou quantidade relativa de luz branca misturada com matiz. Por outro lado, esse valor é difícil de medir porque está diretamente relacionado ao brilho da cor.

As características utilizadas para diferenciar uma cor da outra são matiz saturação e brilho/valor. A matiz (H) é a relação com a cor pura ou a cor percebida. A saturação (S) é a relação de pureza do matiz ou o quanto de luz branca está inserido no matiz. E o valor/brilho/intensidade (V/B/I) é um parâmetro particular praticamente impossível de ser medido, que corresponde à intensidade da cor, sendo um dos fatores importantes para a descrição da sensação das cores (OLIVEIRA, 2012; SANTOS, 2013).

Figura 10. Modelo de cores HSB e HSL



Fonte:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Color_solid_comparison_hsl_hsv_rgb_cone_sphere_cube_cylinder.png

O modelo *HSV* pode ser obtido através da conversão do modelo *RGB* através das Equações 5 a 8.

$$V = \max \left(\frac{R}{255}, \frac{G}{255}, \frac{B}{255} \right) \text{ Eq. (5)}$$

$$S = \begin{cases} 0, & V = 0 \\ \frac{\Delta}{V}, & V \neq 0 \end{cases} \text{ Eq. (6)}$$

$$H = \begin{cases} 0^\circ, & \Delta = 0 \\ 60^\circ \cdot \left(\frac{G - B}{\Delta} \text{ mod } 6 \right), & V = \frac{R}{255} \\ 60^\circ \cdot \left(\frac{B - R}{\Delta} + 2 \right), & V = \frac{G}{255} \\ 60^\circ \cdot \left(\frac{R - G}{\Delta} + 4 \right), & V = \frac{B}{255} \end{cases} \text{ Eq. (7)}$$

$$\Delta = V - \min \left(\frac{R}{255}, \frac{G}{255}, \frac{B}{255} \right) \text{ Eq. (8)}$$

em que, o *mod6* é o dividendo com valor 6.

Outro sistema similar, que é bicônico é o *HSL*, em que o (H) é o matiz, S a saturação e o L é a luminosidade. A luminosidade L é um parâmetro particular similar ao brilho, praticamente impossível de ser medido, porém é mais fácil de controlá-lo pelas condições externas. Os parâmetros matiz e saturação, quando somados, definem a cromaticidade e, portanto, uma cor é caracterizada pelo seu brilho, cromaticidade e luminosidade (GONZALES, WOODS, 1992).

As Equações de conversão do modelo *RGB* para o modelo *HSL* também utilizam a variável H (Equação 7), entretanto, a variável S apresenta algumas modificações, considerando que essa variável depende da variável L, como indicado

nas Equações 9 e 10.

$$L = \left(\frac{\max \left(\frac{R}{255}, \frac{G}{255}, \frac{B}{255} \right) + \min \left(\frac{R}{255}, \frac{G}{255}, \frac{B}{255} \right)}{2} \right) \text{ Eq. (9)}$$

$$S' = \{ 0, \quad \Delta = 0 \frac{\Delta}{1 - |2L - 1|}, \quad \Delta \neq 0 \text{ Eq. (10)}$$

no qual delta (Δ) é o mesmo da Equação 8.

1.4. APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR IMAGEM DIGITAL EM LEITE

Com a evolução desses *hardwares* e *softwares*, a análise por imagem digital (AID do inglês, *Digital Image Analysis*, DIA) passaram a ter maior visibilidade, sendo uma ferramenta aplicada em diversas áreas da ciência como: alimentos, agrárias, biológicas, geográficas, espaciais, materiais, médicas, e principalmente na química (KIRSCH, 2010, RAY, KIRSCH, 1957; RUSS, 1992). O acesso a tecnologias de uso pessoal, como, computadores *desktop*, *notebooks (laptop)*, *scanners*, *webcams*, câmeras fotográficas, *smartphones* e *tablets*, têm-se tornado uma ótima ferramenta no desenvolvimento de procedimentos analíticos e instrumentais para as mais variadas aplicações. Sem contar, os diversos *softwares* de processamento e tratamento de imagem digital, que permitem ao analista interpretar os dados com maior acurácia (RUSS, 1992; SONKA, 1999).

Um dos primeiros trabalhos empregando análise por imagem digital aplicados em adulterações em leite foi o de Santos et al. (2012), que propuseram um método de *screening* de baixo custo, para detectar e quantificar adulteração em amostras de leite de vaca. O estudo de adulteração foi realizado com água e com hidróxido de sódio (NaOH), e as imagens digitais das amostras adulteradas foram obtidas utilizando um *scanner* de mesa. Para avaliar as informações das imagens utilizaram-se 10 parâmetros de cor: vermelho, verde, azul, matiz, saturação, valor, cores relativas (*R*, *G* e *B*), e intensidade, utilizando modelos de regressão linear múltipla (MLR), regressão de componentes principais (PCR), e de mínimos quadrados parciais (PLS) para a determinação de água. A adulteração com NaOH, por sua vez, foi investigada usando análise dos componentes principais (PCA).

Em outro trabalho, Santos et al. (2013) utilizaram uso da imagem digital via *scanner* de mesa como método alternativo para a identificação e quantificação da

adulteração do leite. Amostras de leite bovino foram adulterados com água da torneira, soro de leite, peróxido de hidrogênio, urina sintética e leite sintético em diferentes proporções. As variáveis das imagens utilizadas neste estudo foram: vermelho, verde, azul, matiz, saturação, valor, luminosidade e as três cores relativas. Os modelos de classificação exibiram agrupamentos compactos e bem separados, permitindo a discriminação do controle das amostras de leite adulteradas. Modelos de regressão foram desenvolvidos usando mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão de componente principal (PCR) e os resultados mostraram que o método pode ser aplicado para estimar os níveis de adulteração no leite com altos coeficientes de correlação (r) e baixo erro padrão de predição (SEP). Este método pode ser potencialmente utilizado como uma alternativa aos métodos tradicionais devido à simplicidade, sensibilidade, baixo custo e portabilidade, permitindo análises *in situ*.

Já no trabalho de Salve et al. (2018) um *smartphone* foi utilizado como colorímetro portátil para detectar e quantificar ureia, amido, sal e detergente variando de 1 a 100 mg em 10 mL de leite através de um dispositivo analítico baseado na microfluídica em papel (μ -PAD). Para padronizar o método, o polidimetilsiloxano foi empregado para criar uma barreira hidrofóbica em papel de filtro, pelo uso de um carimbo de borracha personalizado, o qual continha o *design* de μ -PAD a ser usado. Desta forma, o usuário precisa apenas dispensar gotas de leite adulterado sob o ponto de teste, sendo os resultados obtidos instantaneamente. Os autores acreditam que a plataforma desenvolvida pode ser usada em um sistema portátil de baixo custo para efetuar vários testes de adulterantes fluidos. O banco de dados experimental foi utilizado para o desenvolvimento de um aplicativo para Android colorimétrico visando calibrar a faixa de cores a ser utilizada na detecção de concentração de adulterantes. O limite de detecção da aplicação colorimétrica no *smartphone* para adulterantes foi de 5 mg para a ureia, 17 mg para o amido, 29 mg para o sal e 20 mg para detergente em 10 mililitros de leite.

No trabalho de Luther et al. (2017) foi desenvolvido um dispositivo analítico de papel de baixo custo (MilkPAD) para detectar esses analitos no leite por meio de uma foto do celular. O usuário precisa apenas pipetar e dispensar várias gotas do leite em cada área de reação do cartão teste, esperar 40 minutos e tirar uma foto do cartão de teste com o celular. O cartão de teste pode detectar por colorimetria amido (0,005% m/v), ureia (mais de 70 mg dL⁻¹) e os açúcares (glicose e sacarose, acima de 0,1 mmol L⁻¹).

Costa et al. (2020) detectaram e quantificaram peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e amido no leite pelo método colorimétrico via *smartphones*. A análise das imagens foi realizada por meio de aplicativos feitos em laboratório (PhotoMetrix® e RedGIM®) com base na regressão de mínimos quadrados parciais com os histogramas das imagens vermelho-verde-azul. Os histogramas da imagem são calculados automaticamente usando a câmera do *smartphone* e processados no aplicativo. Os resultados mostraram a capacidade desse método em prever a concentração dos três adulterantes, demonstrando o potencial do uso de imagens digitais e aplicativos de *smartphones* associados a ferramentas quimiométricas. Este método apresenta uma forma rápida e de baixo custo de análise.

Lima et al. (2020) desenvolveram uma nova abordagem para a detecção de peróxido de hidrogênio como adulterante de leite por meio de um *spot test* colorimétrico baseada na fotometria utilizando *smartphone*. O procedimento foi embasado na oxidação Fe^{2+} para Fe^{3+} na presença de H_2O_2 em meio ácido, seguida pela formação de um complexo vermelho de ferro (III)-tiocianato. As imagens digitais foram obtidas em microtubos descartáveis sob condições de iluminação controlada, sem pré-tratamento da amostra. A determinação do adulterante leva cerca de 2 minutos e gera apenas 350 μL de resíduos por determinação, obtendo uma resposta linear de 2,5 a 25,0 mg L^{-1} , com um limite de detecção de 1,7 mg L^{-1} com um nível de confiança de 95%. A repetibilidade e reprodutibilidade, expressas como coeficientes de variação foi de 4,8% e 6,8%, respectivamente. Devido a essas características, aliadas à portabilidade e ampla disponibilidade de *smartphones*, o método proposto é atraente para determinação de adulterante de peróxido de hidrogênio em diferentes etapas da cadeia produtiva.

Silva e Rocha (2020) desenvolveram uma nova alternativa para a detecção da adulteração do leite por diluição com água, com base na determinação do teor de proteína. O método proposto envolve a precipitação das proteínas pelo efeito *salting-out* do sulfato de cobre e a adsorção proporcional do Cu (II) no precipitado. Posteriormente, as medições fotométricas da quantidade restante de Cu (II) por colorimetria digital via *smartphone* são realizadas para determinar o conteúdo de proteína. O procedimento proposto é rápido (taxa de transferência de amostra de 32 ensaios/h), preciso (coeficiente de variação = 3,0%, n = 20), ecologicamente correto e permite a detecção de até 1,0% (v/v) de água em leite adulterado. As principais espécies utilizadas para mascarar o teor de proteína não interferem, permitindo a

detecção direta de adulteração. O procedimento foi aplicado com sucesso para a classificação de amostras de leite conforme e não conforme, bem como para a determinação indireta do teor de proteína no leite. Os resultados quantitativos concordaram com os obtidos pelo método de referência (espectroscopia no infravermelho próximo) com um nível de confiança de 95%.

Silva, Gonçalves e Rocha (2021) determinaram o formaldeído no leite via colorimetria por análise de imagem digital via *smartphone* através do produto formado na reação com o reagente de Schiff, seguido pela conversão das imagens em valores de *RGB* usando um aplicativo gratuito. A preparação da amostra envolveu apenas a precipitação de proteínas em meio ácido e a determinação do analito exigiu apenas alguns microgramas dos reagentes. O método proposto atingiu um limite de detecção de $120 \mu\text{g L}^{-1}$ de formaldeído, com resposta linear de até $1250 \mu\text{g L}^{-1}$ e com boa precisão ($\text{CV} = 2\%$, $n = 20$). Os efeitos da matriz foram insignificantes após a precipitação de proteínas, com recuperações de amostras de leite enriquecidas com formaldeído entre 92-106%. A precisão foi avaliada usando um procedimento de referência (HPLC com detecção de UV após derivatização do analito e extração líquido-líquido) e os resultados concordaram em nível de confiança de 95%. O procedimento é aplicável a leite integral, semidesnatado e desnatado processado por pasteurização ou tratamento de ultra alta temperatura (UHT – Longa vida ou leite de caixinha).

Masawat, Harfield e Namwong (2015) desenvolveram um colorímetro portátil baseado em imagem digital (DIC) para *iPhone*, para monitorar a tetraciclina (TC) em leite bovino. Um aplicativo chamado de *ColorConc* foi desenvolvido para IOS, o qual utiliza um algoritmo de correspondência de imagens para determinar a concentração da TC em uma solução. Os valores das cores - vermelho (R), verde (G), azul (B), matiz (H), saturação (S), brilho (V) e cinza (Gr) foram medidos a partir de cada imagem das soluções padrão de TC. A TC de amostras de leite feita por extração em fase sólida (SPE) foi capturada e a concentração foi mensurada pela comparação dos valores de cor de um banco de dados. A quantidade de TC pode ser determinada em uma faixa de concentração de $0,5\text{--}10 \mu\text{g mL}^{-1}$. O DIC-iPhone proposto é capaz de fornecer um limite de detecção (LOD) de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação (LOQ) de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. O fator de enriquecimento foi de 70 e a cor da amostra de leite extraída foi

amarela forte após SPE. Portanto, o SPE-DIC-iPhone poderia ser utilizado para a dosagem de resíduos de TC no leite em concentrações inferiores ao LOQ da técnica proposta.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver Sistemas Instrumentais simples, acessíveis, versáteis e de baixo custo, visando métodos rápidos que possibilitem a determinação *in loco* das adulterações por amido e ureia no leite bovino.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e avaliar três Sistemas com sensores de análise de imagem digital (AID ou *Digital Image Analysis*, DIA).

- Montar um Sistema I com um *scanner* de mesa comercial com tecnologia LIDE e dispositivos acoplados a cargas (CCD, do inglês *charge-coupled device*) comandado por um *software*, desenvolvido pelo Grupo DIA-UEL com Registro no INPI chamado de *Quantcolour*.

- Projetar um Sistema II para diversos dispositivos móveis (que neste trabalho será aplicado com um *smartphone*) com sensor de tecnologia de semicondutor de óxido metálico complementar (CMOS, do inglês *Complementary Metal Oxide Semiconductor*), com um aplicativo (*Mobile APP*) também desenvolvido pelo Grupo DIA-UEL, chamado de *QuantRGB*.

- Projetar um Sistema III que utiliza um colorímetro portátil de feitiço *lab-made* controlado por uma placa arduino UNO R3 (*open source*), contando com um sensor de cor de baixo custo TSC2300 e outro sensor CMOS, capaz de realizar medidas *in situ* enviando os dados via cabo USB.

- Aplicar os Sistemas I, II e III para detecção dos principais adulterantes em leites em conjunto com métodos de *spot tests* desenvolvidos, comparando-se o desempenho dos sistemas instrumentais e métodos propostos em termos de acurácia frente aos métodos recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) empregando espectrofotômetro.

3. PROCEDIMENTOS

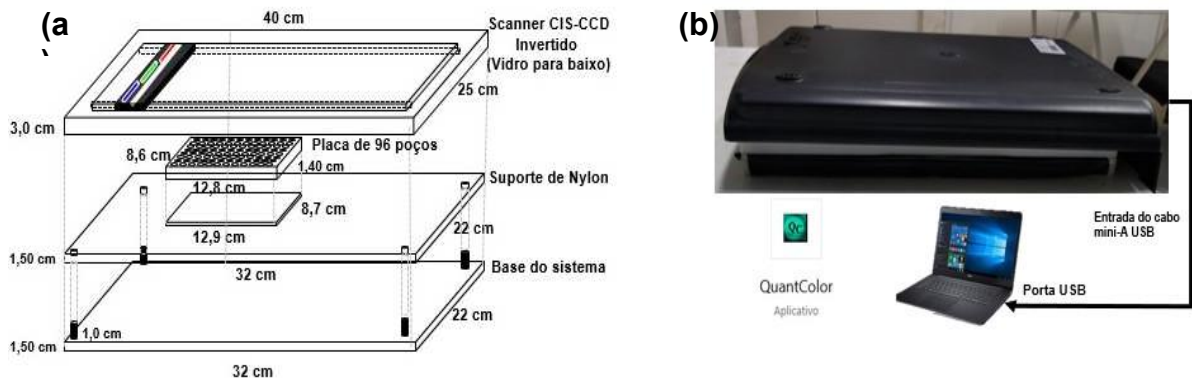
3.1. INSTRUMENTAÇÃO

3.1.1. SISTEMA SCANNER DE MESA COM SENSOR CIS (SISTEMA I)

3.1.1.1. MONTAGEM DO SISTEMA I

A base do sistema foi montada em madeira e, o suporte usado para o *scanner* foi recortado em chapa de poliamida (*Nylon*). Este suporte foi confeccionado nas dimensões de 22 x 32 x 1,5 cm (largura x comprimento x altura), contendo o espaço exato para o encaixe de uma microplaca Elisa de poliestireno (PE) de cor branca sólida de 96 poços de fundo liso (8,6 x 12,8 x 1,4 cm, $V_{\text{máx}} = 400 \mu\text{L/poço}$) (Grether Microlon, Monroe, NC, EUA) (Figura 11).

Figura 11. (a) Esquema das partes do Sistema instrumental I empregando scanner CIS-CCD. (b) Sistema I montado



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2017).

O *scanner* é disposto de forma invertida, com a finalidade de manter a placa sempre na mesma posição, sem que haja a interferência da luz do ambiente externo. O *scanner* de mesa utilizado foi um *Canon* (CanoScan LiDE 110, Estados Unidos) que possuiu um sensor de imagem de contato (CIS). A tecnologia do CIS substitui o conjunto de CCD, espelhos, filtros, lâmpada e lente por linhas de diodos emissores de luz (LEDs, *Light Emitting Diode*) das cores vermelha, verde e azul (Figura 11). O *scanner* com LIDE (exposição indireta por LED) é uma versão aprimorada da tecnologia CIS. Aqui, a fonte de luz usa LEDs potentes *RGB* coloridos (vermelho,

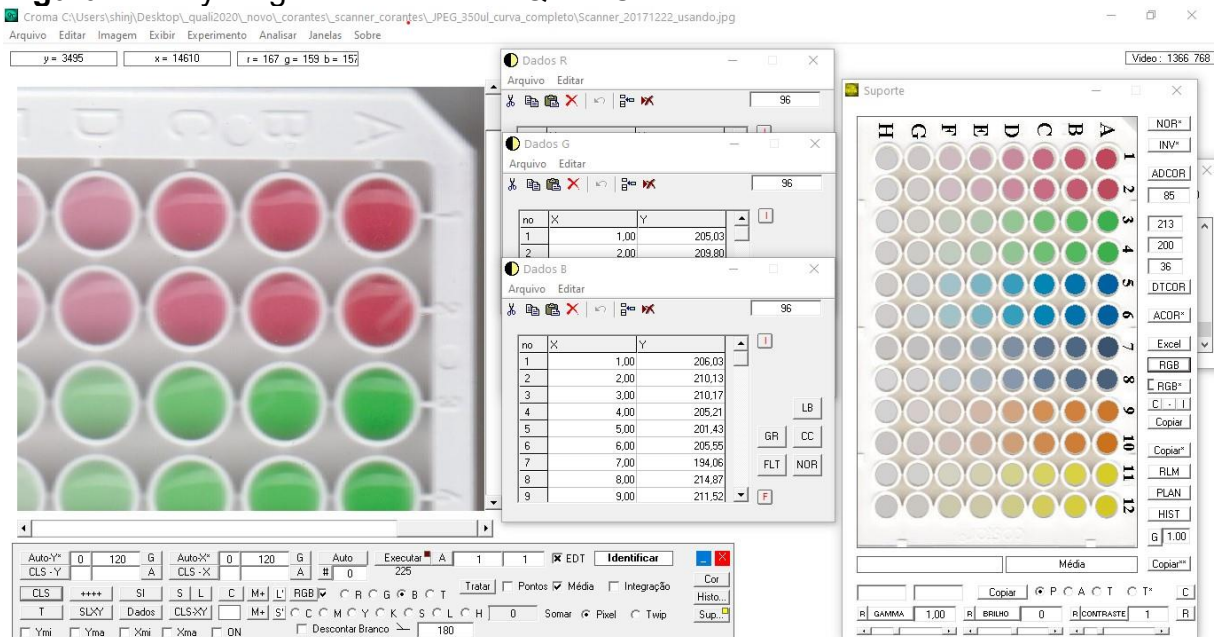
verde, azul) e a radiação é direcionada ao objeto através de fibras de quartzo, garantindo uma exposição uniforme em toda a largura da janela original do *scanner*.

A aquisição das imagens do *scanner* de mesa foi feita no *software* do *scanner* da *Microsoft Corporation*, que utiliza o *drive* do *scanner* Canon. Os arquivos foram armazenados no formato *bitmap*, sem compressão de arquivo e perda de informações sobre os *pixels* (NÓBREGA et al., 2008; OLIVEIRA, 2006). O tratamento das imagens digitais foi feito no *software* *QuantColour* registrado durante o doutorado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, nº de processo BR512018051796-0, ANEXO II).

3.1.1.2. SOFTWARE QUANTCOLOUR

O programa *QuantColour* (Figura 12) foi desenvolvido no Grupo de Desenvolvimento e Instrumentação e Metodologia Analítica (Grupo DIA – Departamento de Química da Universidade de Londrina, UEL), é um *software* programado em linguagem *Microsoft Visual Basic*® 6.0 e opera nos sistemas operacionais - Windows XP, Vista, 7, 8 e 10 (32 ou 64 *bits*).

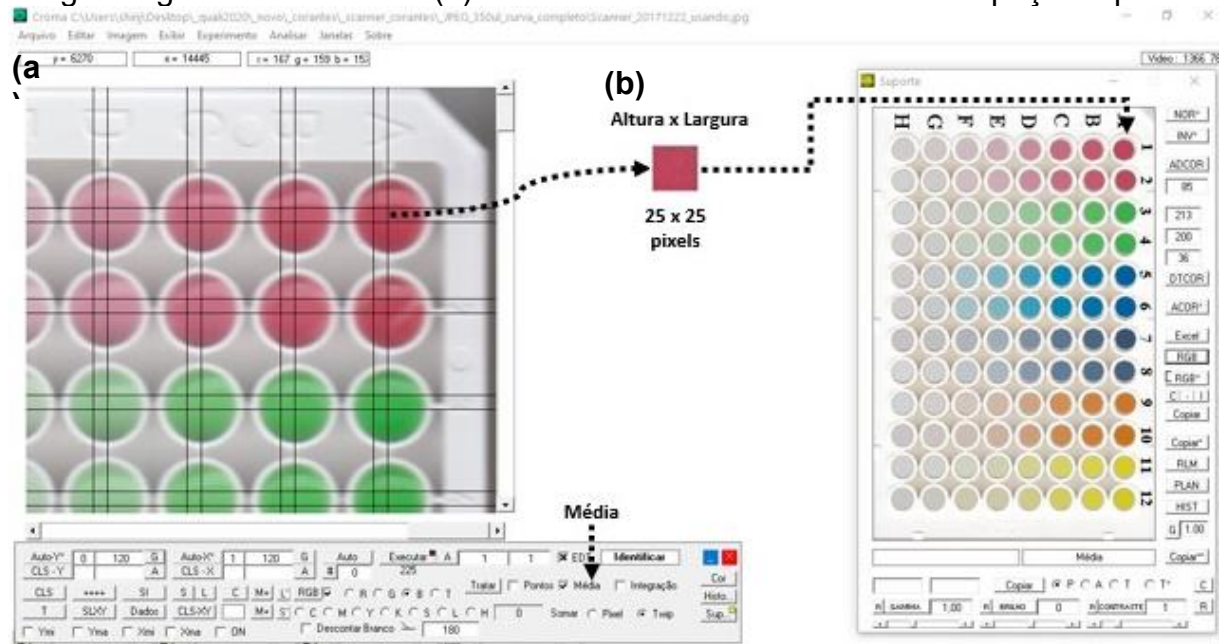
Figura 12. Layout geral do software *QuantColour*



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O *software* tem a opção de importar as imagens digitalizadas da microplaca ELISA, que contém as amostras, em uma janela gráfica. Posteriormente, uma ferramenta que demarca as áreas dos poços com dimensões de 15 x 15 *pixels* (vertical (V) x horizontal (H)) é utilizada de forma a totalizar uma área de 225 *pixels*, na qual se determina a intensidade das cores primárias RGB em cada *pixel* (Figura 13). O *software* possibilita ainda outras opções de selecionamento das áreas dos poços, como a intensidade mediana, média, valor máximo e mínimo, e frequências. Neste trabalho, o parâmetro da área média foi escolhido para as medidas, considerando-se que a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura utiliza este critério, por ter uma maior representatividade de amostragem (BENEDETTI, 2013).

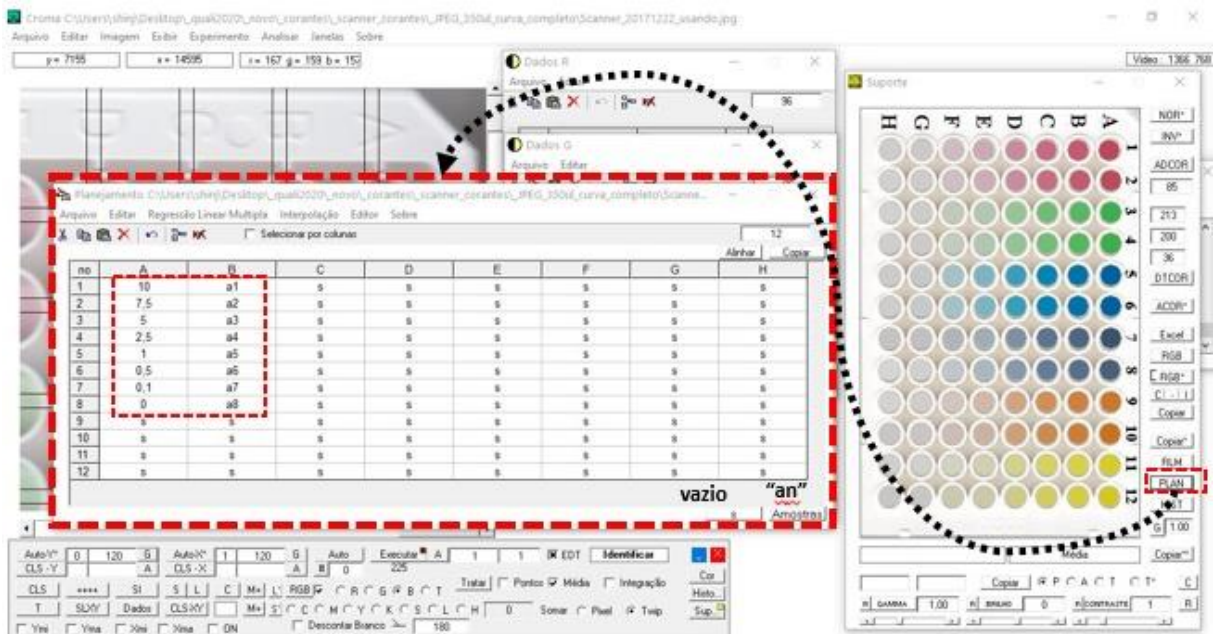
Figura 13. (a) Áreas selecionadas pelo programa QuantColour para aquisição da imagem digital das amostras. (b) Zoom da área selecionada de cada poço da placa



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Assim, após as amostras terem sido identificadas com seus respectivos dados na fase do procedimento experimental e, as áreas dos poços terem sido selecionadas, o *QuantColour* disponibiliza no formato de planilha, as informações do tipo de amostra em relação ao seu posicionamento no poço. Desta forma, é possível observar as descrições dos valores das áreas médias de cada poço atreladas às concentrações dos analitos de interesse (Figura 14).

Figura 14. Recursos do software QuantColour, mostrando a planilha na qual pode-se inserir as concentrações de cada amostra a ser analisada por poço



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Em seguida, o *software* processa automaticamente a correlação entre os *pixels* presentes em cada área do poço em função das concentrações dos analitos, por meio da regressão lineares univariada (RL) de cada uma das cores primárias (R, G e B) e/ou pela regressão linear múltipla (RLM) do sistema *RGB*, quantificando os analitos presentes nas amostras.

Deve-se ressaltar que o programa permite ainda a transferência direta dos dados experimentais, tanto para a planilha eletrônica do Microsoft Excel® como para outros tipos de extensões, para a análise dos parâmetros estatísticos (correlação, análise da variância, regressão linear, ajuste não linear, entre outros).

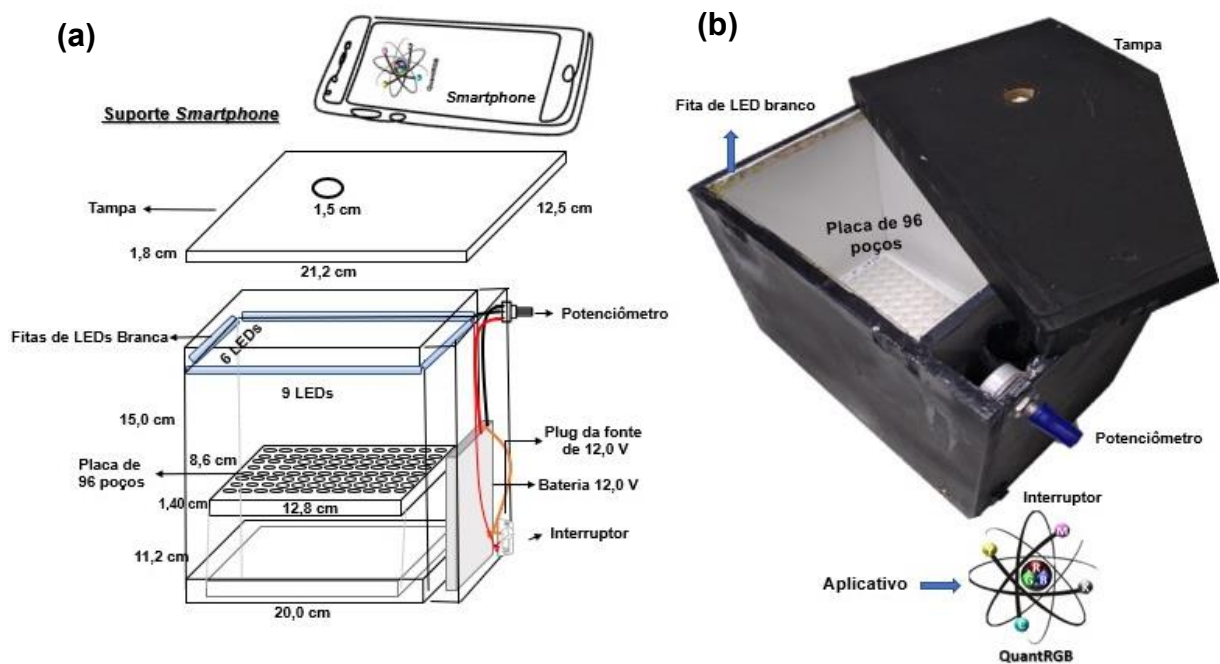
3.1.2. SISTEMA SMARTPHONE COM SENSOR CMOS (SISTEMA II)

3.1.2.1. MONTAGEM DO SISTEMA II

O projeto piloto da caixa, utilizada como suporte para o *smartphone/tablet* e para a placa de 96 poços, foi feita em madeira de 4 mm de espessura, com dimensões de 20 x 11,2 x 15 cm de largura x comprimento x altura, respectivamente. A tampa

apresenta dimensões de 21,2 x 12,5 x 1,8 cm (largura x comprimento x altura), na qual há um orifício de 1,5 cm de diâmetro em que a câmera é posicionada para aquisição da imagem da placa tipo ELISA de cor branca de 96 poços (poliestireno de 8,6 x 12,8 x 1,4 cm), como indicado na Figura 15.

Figura 15. (a) Esquema do Sistema instrumental II em que o *smartphone* é utilizado para aquisição das imagens digitais posicionado sobre uma microplaca de 96 poços. (b) Imagem do Sistema II montado



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2019).

A parte interna da caixa foi pintada com tinta *spray* branca e instaladas as fitas de LED branco siliconada (5050 ou 14,4 W/300 LEDs/5m - 6000K 12 V) com 9 x 6 LEDs, totalizando 30 lâmpadas. A fita instalada nas laterais da borda interna da caixa a 0,5 cm do topo, foram posicionadas a 90 °C com relação a placa de 96 poços, para evitar a reflexão da luz pela amostra. Instalou-se também um potenciômetro de 10 K Ω para controlar a iluminação dentro da caixa, e externamente, essa foi pintada com tinta preta para minimizar possíveis interferências da luz externa.

O *smartphone* utilizado foi um Motorola, Moto G6 *Play* da versão de *hardware* P4 com 3 GB de memória RAM, 32 GB de memória ROM, resolução máxima de tela de 1440x720, câmera frontal de 8 MP e traseira de 13 MP. A aquisição das imagens foi feita pelo aplicativo configurando a câmera para foco automático e HDR (do inglês, *High Dynamic Range*), que significa alto alcance dinâmico. Os arquivos foram

armazenados em *jpg*, sem compressão do arquivo e perda de informações sobre os *pixels* (NÓBREGA et al., 2008; OLIVEIRA, 2006). O tratamento das imagens digitais foi feito por meio do aplicativo *lab-made* desenvolvido denominado como *QuantRGB* com registro em andamento (ANEXO II).

3.1.2.2. APLICATIVO *QUANTRGB*

O aplicativo *QuantRGB* (Figura 16) foi desenvolvido na IDE (*Integrated Development Environment*, ou Ambiente de Desenvolvimento Integrado) do Android Studio, baseada no InterliIJ IDEA (Google) por mim - Lycio Shinji Watanabe e pelo Professor Doutor Carlos Alberto Paulinetti da Camara (UEL - Departamento de Quimica - Grupo DIA) o qual pode ser operado em plataformas Android, desde o Android 4.4 (API nível 19, *KITKAT*) até o Android 9 (API nível 28, *PIE*). Esse aplicativo ainda não está disponível no *Play Store*, devido aos trâmites de direitos autorais.

Figura 16. Recursos do aplicativo *QuantRGB* desenvolvido. (a) “Tutorial” da utilização. (b) Menu de seleção da imagem – opção “Selecione imagem” da câmera para aquisição da imagem ou da galeria. (c) “Adicionar” região a ser analisada através do touch screen, juntamente com a concentração relacionada, contando com a opção, se necessário de “Remover”. (d) Aplicar a “Regressão Linear” simples para as variáveis *R*, *G* e *B*. (e) Menu “Amostra” no qual serão mostrados os resultados correspondentes em cada uma das variáveis *R*, *G* e *B*.



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O aplicativo *QuantRGB* disponibiliza um “Tutorial”, no qual há um procedimento, que explica de forma simplificada, o funcionamento básico deste aplicativo. Existem opções de se “Importar uma imagem digitalizada” da “Galeria” do equipamento ou de se acessar a “Câmera” do próprio dispositivo para executar a aquisição da imagem e projetá-la em um canvas da tela do *smartphone* ou *tablet*

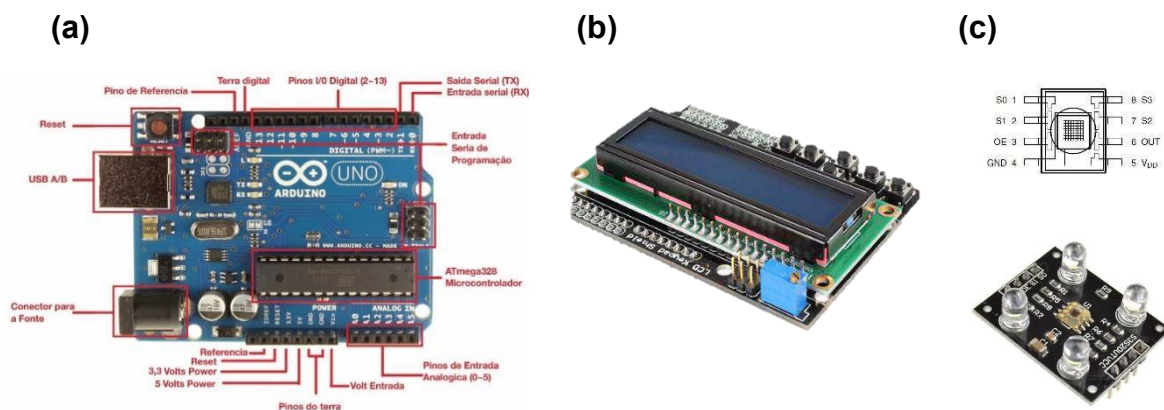
(Figura 16). Após importar a imagem, o *software* apresenta a opção, que possibilita ao usuário a seleção das áreas sobre a imagem utilizando o *touch screen*. Esta área programada será um quadrado de 10 *pixels* x 10 *pixels* (que resultará na média de 100 *pixels* para *R*, *G* e *B*). Essa área selecionada, é então dimensionada em forma matricial em conjunto com as concentrações informadas e, é adicionada pelo usuário por meio do “Adicionar”, sendo processada a “Regressão Linear” simples para as variáveis *R*, *G* e *B*, que mostram as curvas analíticas na forma de Equação da reta ($y = ax + b$), com os coeficientes de determinação (R^2) para cada variável. O resultado para a amostra desconhecida é calculado com a seleção feita pressionando o botão “Amostra” no *touch screen* da região que se deseja, que mostra os valores para cada uma das variáveis.

3.1.3. COLORÍMETRO PORTÁTIL *LAB-MADE* COM SENSOR CMOS (SISTEMA III)

3.1.3.1. HARDWARE

A prototipagem eletrônica utilizada no projeto piloto do colorímetro montado e confeccionado consistiu em uma placa arduino uno R3 (Figura 17) com processador AVR® com portas de 8 e 10-*bits* RISC, em que foi acoplado um *LCD Keypad Shield* 16x2 com 6 botões embutidos, como indicado na Figura 17.

Figura 17. (a) Placa arduino UNO R3 (b) LCD Keypad Shield 16x2. (c) Sensor de cor TSC230, utilizados no Sistema Instrumental III

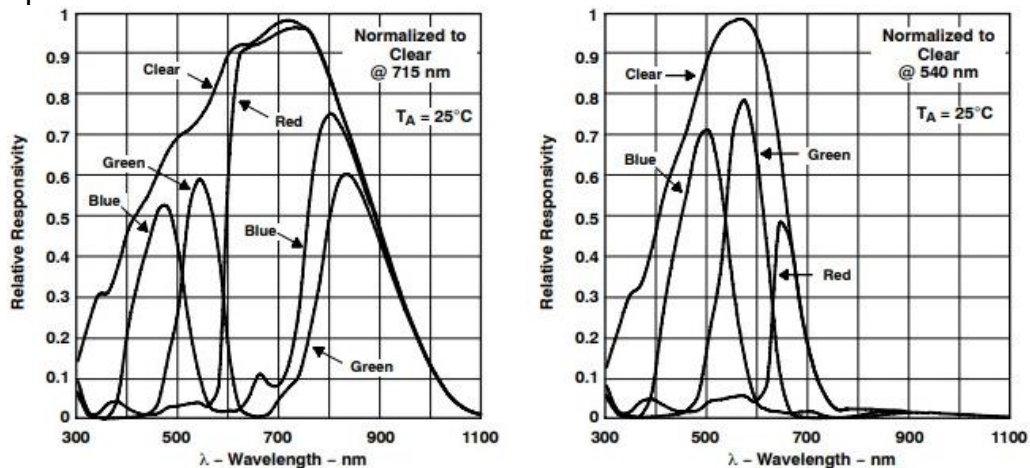


Fonte: Adaptado do site <https://www.embarcados.com.br> e <https://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/download/202765/TAOS/TCS230.html>

Optou-se pela utilização dessa plataforma de prototipagem, pois o seu *hardware* e *software* são um dos mais acessíveis e robustos, considerando ainda que esta comunidade é uma das maiores do ramo de projetos com caráter *open source* (EVANS, 2013).

O sensor TSC230 foi escolhido devido à um estudo prévio de suas características, como descrito no seu *datasheet*, apresentado na Figura 18, no qual é mostrado o range espectral que o sensor CMOS é capaz de detectar.

Figura 18. Perfil da região espectral que o sensor TSC230 é capaz de atuar em função do comprimento de onda normalizado



Fonte: <https://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/download/202765/TAOS/TCS230.html>

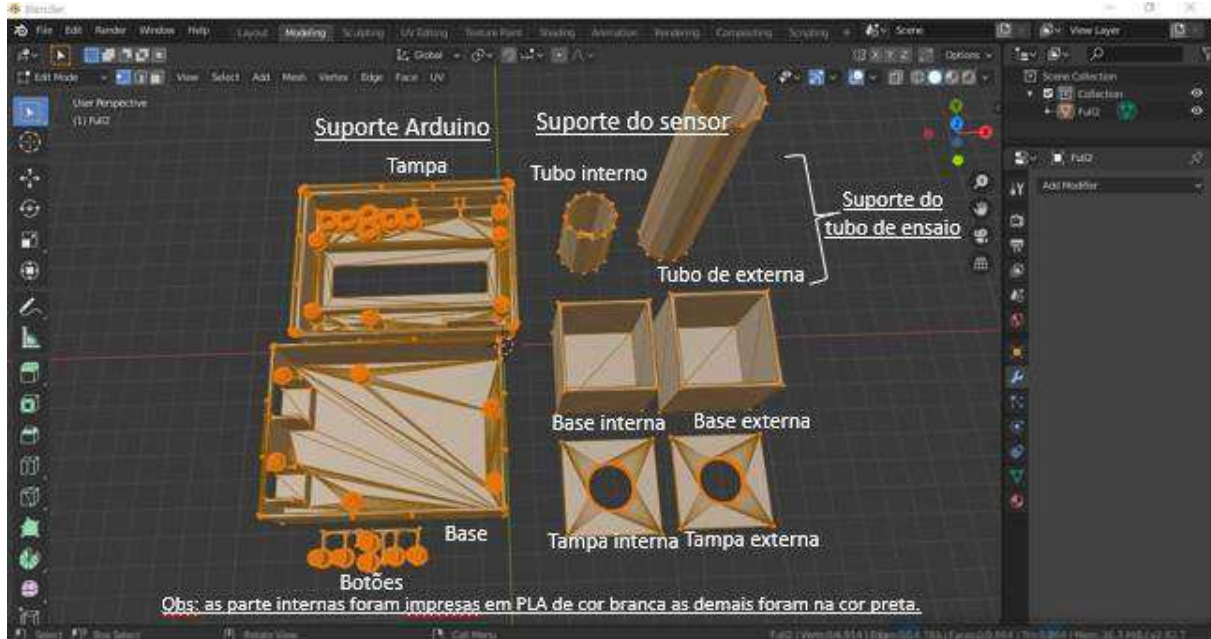
Observando a Figura 18 e estudando o *datasheet* do componente, optou-se por realizar um estudo prévio com os corantes, objetivando uma maior confiabilidade, aplicado aos sistemas projetados.

3.1.3.2. MONTAGEM DO COLORÍMETRO

A modelagem 3D do projeto piloto do colorímetro foi realizada no *software* Blender (v2.82^a) e salva em uma extensão *.stl de fácil acesso para outras plataformas de modelagem, disponibilizada no site da *Thingiverse*. As dimensões do suporte do arduino UNO com *LCD Keypad Shield* 16x2 foram de 6,50 x 8,50 x 4,00 cm, para largura x comprimento x altura respectivamente. O suporte do sensor TSC230, onde

é feito o encaixe do tubo de vidro, apresenta dimensões de 4,0 x 4,0 x 4,0 cm (largura x comprimento x altura) e orifício de 2,0 cm de diâmetro, no qual o sensor para a aquisição dos dados está posicionado na perpendicular (90°) em relação ao tubo na parte inferior, como indicado na Figura 19.

Figura 19. Prototipagem do colorímetro confeccionado neste trabalho feita no software Blender v2.82^a.

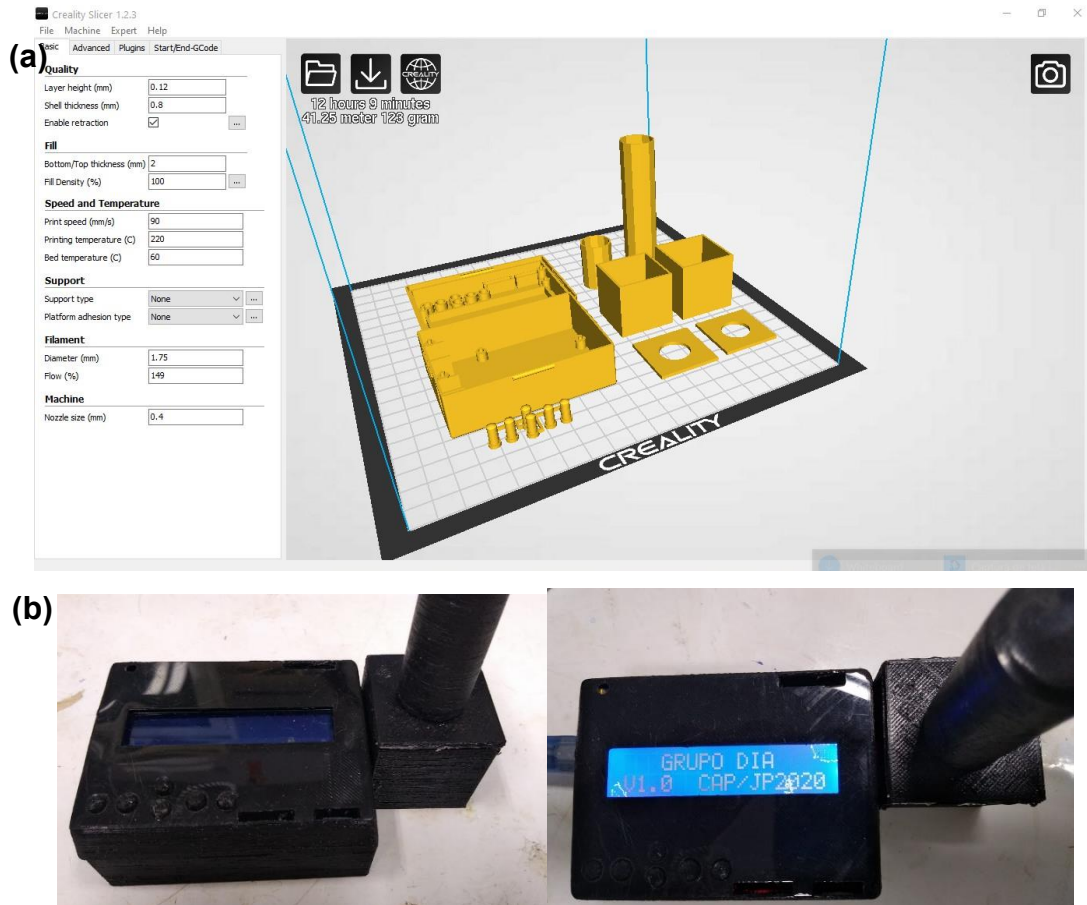


Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A parte interna do suporte (cubo e cilindro menores) foram impressas com PLA (poliácido láctico) branco, considerando-se que o sensor utilizado detecta o espalhamento da luz (reflexão) da solução analisada. Já as demais partes do equipamento foram impressas em PLA preto, para evitar possíveis interferências da luminosidade exterior.

As impressões foram realizadas em uma impressora 3D da PCYes, modelo Faber 3 (31724) com resolução de 100 microns, temperatura da mesa de 60 °C e extrusor em 200 °C, utilizando o *software* *Creatality Slicer 1.2.3* (Figura 20(a)).

Figura 20. (a) Software Creality Slicer 1.2.3 utilizado para a impressão. (b) Sistema Instrumental III – colorímetro lab-made montado



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

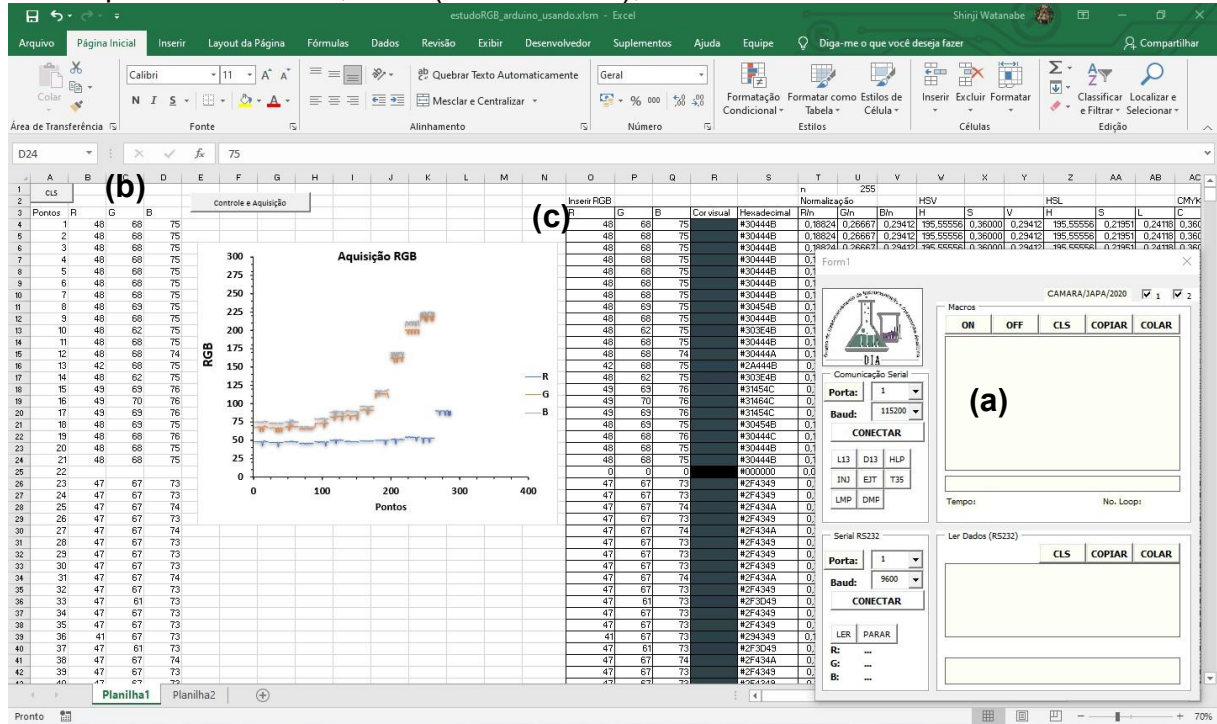
A montagem final do protótipo do colorímetro, indicado na Figura 20 (b), dispõe da possibilidade de se colocar uma bateria de 5,0 a 25,0 V como alimentação externa, tornando-o um dispositivo portátil.

3.1.3.3. SOFTWARE

A linguagem de programação utilizada neste projeto foi o C/C++, programado na própria IDE do arduino (versão 1.8.13) e compilada para placa via cabo USB 2.0 Am/Bm. No código desenvolvido foram criadas duas bibliotecas: uma para o controle dos botões e outra para o cálculo de regressões linear simples durante a aquisição do sensor TSC230. Foi desenvolvido ainda uma interface no Microsoft Office Excel versão 2019 via Visual Basic Application (VBA), para aquisição online via USB, como indicado na Figura 21. Os macrocomandos foram desenvolvidos pelo Professor

Doutor Carlos Alberto Paulinetti da Camara e por mim - Lycio Shinji Watanabe (UEL - Departamento de Quimica - Grupo DIA).

Figura 21. Recursos do Microsoft Office Excel para a) “comunicação serial via USB com arduino, (b) adquirindo os dados R, G e B, com um conversor e normalizador de dados para a cor visual, HEX (hexadecimal), HSV ou HSL e CYMK.



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

A interface apresenta um drive de comunicação serial que consegue fazer a aquisição dos dados recebido do arduino via *USB*, mas especificamente do sensor TCS230. Além da aquisição dos dados, a aplicação programada em VBA permite: efetuar a plotagem online; mostrar os dados brutos no gráfico; visualizar a cor; normalizar e converter os dados em outros modelos de cor, como o *HSV* ou *HSL* e *CYMK*.

3.2. CUSTOS DOS PROTÓTIPOS

Os componentes e materiais utilizados no desenvolvimento e construção dos três Sistemas (I, II e III), adquiridos no comércio local e loja virtuais estão apresentados na Tabela 2, juntamente com os seus valores.

Tabela 2. Preços dos componentes utilizados nos protótipos

Materiais	Sistema I	Sistema II	Sistema III
Placa de Nylon	50,00		
Madeiras	10,00		
<i>Scanner</i> de mesa	350,00		
<i>Smartphone</i>		800,00	
Fita de Leds		7,50	
Madeiras		20,00	
Tinta spray branca e preta		20,00	
Potenciômetro		2,50	
Baterias/fonte 12 V		10,00	
Arduino UNO R3			40,00
Sensor TSC230			10,00
Suporte impresso em PLA			10,00
Custo total (R\$)	370,00	860,00	60,00

Estes valores de aquisição no início do desenvolvimento deste trabalho, não estando computado o custo do tempo gasto para o desenvolvimento dos *softwares*. Pode-se notar que para o Sistema I e II, apesar de valores mais elevados, os seus suportes, sem somar os instrumentos de aquisição (*scanner* e *smartphone*), apresentam valores equivalentes aos do Sistema III de R\$ 60,00.

3.3. EXPERIMENTAL

3.3.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais utilizados foram: balões volumétricos de 50, 100, 250 e 1000 mL (PYREX®; UNIGLASS®); béqueres de 250 mL (UNIGLASS®); Erlenmeyer de 250 e 1000 mL (PYREX®); micropipetas de 10 a 200 µL e 1 a 10 mL (LABMATE®); barras magnéticas; suporte para eletrodo; tubos de ensaio 13x100 mm de vidro (HACH®). Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: sonificador ultrassônico Elmasonic P (Elma, Singen, Alemanha); forno estufa ar circulante (LUCADEMA, Brasil); Agitador Vórtex (Warmnest modelo VX-28, Brasil); espectrofotômetro UV-Vis (UV Mini1240, Shimadzu, Japão); agitador magnético (QUIMIS® 261A11); potenciômetro (MS

TECNOPON - MPA-210); balança analítica (Precisa® XT220A); destilador de água tipo Pilsen (Logen Scientific®); purificador de água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹ a 25°C Milli-Q®, Millipore); eletrodo de pH (Ag/AgCl₂, Analyser®); e os tampões de calibração 7,00 ± 0,02 e 4,00 ± 0,02 (MS TECNOPON, Piracicaba, São Paulo).

3.3.2. AMOSTRAS

As amostras de leite fresco fluido, utilizadas para as aplicações nos Sistemas instrumentais I, II e III desenvolvidos, foram disponibilizadas pelo Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA). As amostras foram coletadas diariamente, na primeira ordenha do dia de animais na Leiteria da Fazenda Escola da própria Universidade Estadual de Londrina (UEL).

3.3.3. CALIBRANTES DOS SISTEMA

Para o estudo das melhores condições analíticas para cada Sistema desenvolvido, considerando as etapas de calibração, foram selecionados corantes alimentícios (MIX®) violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho. Os corantes foram inicialmente secos em estufa 105,0 °C até a massa constante, por aproximadamente 10 horas. Após a secagem foram mantidos em dessecador e, após resfriamento foram dissolvidos em água deionizada na concentração de 1000,0 mg L⁻¹ (solução estoque). Posteriormente, cada solução estoque dos 6 diferentes corantes foram diluídas para 10,00; 7,50; 5,00; 2,50; 1,00; 0,50 e 0,10 mg L⁻¹. As soluções dos corantes foram armazenadas em frasco âmbar em geladeira de 4-8 °C e monitoradas por 30 dias. A caracterização e monitoramento foram feitas pelo espectrofotômetro UV-VIS.

3.3.4. TRATAMENTO DOS DADOS

O tratamento aplicado durante todo o trabalho foi a normalização dos dados

R , G e B , pelo valor máximo 255 ($R/255$ $G/255$ $B/255$) que representa a cor branca, seguida da logaritmização negativa desse valor normalizado. Resumidamente, foram utilizados nas formas $-\log (R/255)$, $-\log (G/255)$ e $-\log (B/255)$, $-\log((R,G,B)/255)$. Outra forma de tratamento, comumente utilizado em aplicações de imagem digital na química analítica também foi testada, em que os valores de R , G e B são normalizados pelo branco analítico (R_0 G_0 B_0), como indicado no ANEXO I.

3.3.5. OTIMIZAÇÃO E CALIBRAÇÃO PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DOS SISTEMAS

Os parâmetros instrumentais avaliados, considerando a melhor condição para a aquisição dos dados de cada Sistema foram: iluminação, resolução/qualidade e, volume de amostra utilizada em cada um dos suportes. O estudo foi conduzido de forma univariada, em que as melhores respostas analíticas se deram pelos valores de R , G e B adquiridos por cada Sistema projetado.

3.3.5.1. ILUMINAÇÃO

O estudo da iluminação dos Sistemas consistiu na avaliação da uniformidade da distribuição da luz branca e na eficiência dos suportes, quanto a proteção da luz externa. Essa avaliação foi feita pela comparação entre os valores das médias das intensidades da solução de corante vermelho em todos os poços, contendo a mesma concentração ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e o mesmo volume ($350,0 \mu\text{L}$) na placa de 96 poços do Sistema I e II. As aquisições das imagens foram feitas de forma padronizada em resolução de 300 *DPIs* e qualidade de 13 *MP* (4:3), respectivamente, pelo *scanner* e pela câmera do *smartphone*.

Para o Sistema III, foram avaliados 30 tubos distintos, realizando 10 leituras/tubos, no qual - o 1º grupo continha 10 tubos vazios; o 2º grupo continha 10 tubos com 5,0 mL de água ultrapura e, o 3º grupo foram de 10 tubos de 5,0 mL, contendo solução de corante vermelho a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em frequência de 20,0%, mantendo-se a proteção dos tubos contra a radiação exterior.

Como nos Sistemas I e III, os LEDs já são intrínsecos da própria eletrônica dos sensores, esses foram fixados em sua maior eficiência para aquisição. Já no Sistema II, a intensidade das fitas de LED, foram ajustadas pelo potenciômetro de 10,0 k Ω , avaliando-se três níveis de potência dos LEDs - alta (1,44 W), média (1,27 W) e baixa (1,10 W); comparando-se as inclinações das curvas analíticas para o corante vermelho (Tabela 3).

Tabela 3. Planejamento para avaliar a melhor resposta da inclinação para os 6 corantes alimentícios estudados na placa de 96 poços em função de suas curvas analíticas, variando-se as concentrações entre 0,00 a 10,00 mg L⁻¹

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço	Corante
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	1	Vermelho
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	2	Vermelho
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	3	Verde
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	4	Verde
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	5	Azul
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	6	Azul
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	7	Violeta
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	8	Violeta
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	9	Laranja
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	10	Laranja
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	11	Amarelo
0,00	0,10	0,50	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0	12	Amarelo

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A escolha da melhor condição de trabalho da fita de LEDs foi determinada pelo maior valor, ou seja, pelas maiores inclinações das curvas analíticas do corante vermelho, calculadas nos três níveis de intensidade luminosa.

3.3.5.2. VOLUME DE AMOSTRAS

Para o estudo do volume, inicialmente, pipetou-se para a placa de 96 poços, volumes de 50,0 a 400,0 μ L de uma solução de corante vermelho na concentração de 10,0 mg L⁻¹, como indicado na Tabela 4. Este estudo preliminar complementa o estudo de influência dos volumes nos Sistemas, considerando a luz refletida sobre as soluções.

Tabela 4. Planejamento para avaliação preliminar dos volumes ideais a serem utilizados na placa de 96 poços, com variação entre 50,0 a 400,0 μL e utilizando-se uma solução de corante vermelho 10,0 mg L^{-1}

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
300	400	350	250	100	50	150	75	1
300	400	350	250	100	50	150	75	2
300	400	350	250	100	50	150	75	3
300	400	350	250	100	50	150	75	4
300	400	350	250	100	50	150	75	5
300	400	350	250	100	50	150	75	6
300	400	350	250	100	50	150	75	7
300	400	350	250	100	50	150	75	8
300	400	350	250	100	50	150	75	9
300	400	350	250	100	50	150	75	10
300	400	350	250	100	50	150	75	11
300	400	350	250	100	50	150	75	12

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Para fazer a escolha do volume ideal para cada um dos Sistemas, pipetou-se nas placas de 96 poços dos Sistemas I e II os melhores resultados do teste inicial, fixando-se a resolução das aquisições das imagens em 300 *DPI* e qualidade de 13 *MP* (4:3), para o *scanner* e *smartphone*, respectivamente. O planejamento deste experimento foi executado como na Tabela 4, variando os volumes, e o volume final empregado em ambos os Sistemas foi selecionado, baseando-se nas maiores inclinações das curvas analíticas do corante vermelho.

As mesmas concentrações das soluções do corante vermelho foram pipetadas em tubos distintos para avaliar o Sistema III, lidas em 10 repetições ($n = 10$), variando-se apenas os volumes de 0,0 a 10,0 mL adquiridos em frequência de 20,0%. O volume ideal a ser utilizado no Sistema III também foi escolhido pela maior inclinação da curva analítica empregando o corante vermelho.

3.3.5.3. RESOLUÇÃO, QUALIDADE (DENSIDADE) E FREQUÊNCIA

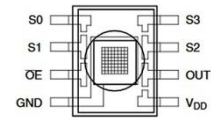
O estudo da melhor condição da resolução e qualidade para a aquisição das imagens digitais dos Sistemas I e II, respectivamente, foram avaliados pelas imagens

das placas obtidas com volumes fixos de 350,0 μL de solução dos corantes variando-se as concentrações de 0,00 a 10,00 mg L^{-1} , da mesma forma que o planejamento demonstrado na Tabela 5, alterando-se apenas a resolução do escaneamento (Sistema I) avaliando imagem em 50, 300 e 600 DPIs, e as fotos tiradas em qualidade de 6 MP (16:9), 8,7 MP (18:9) e 13 MP (4:3).

No Sistema III, avaliou-se a frequências de saída do sensor TCS230, manipulando os pinos de controle (S0 e S1), como indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Possíveis frequências do sensor TSC230 do Sistema III

Pino S0	Pino S1	Escala de frequência de saída (%)
LOW	LOW	Desligado
LOW	HIGH	2,0
HIGH	LOW	20,0
HIGH	LOW	100,0



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Os pinos de controle S0 e S1 do sensor são usados para escalar a frequência de saída. A frequência pode ser escalada para três valores predefinidos diferentes de 2%, 20% ou 100%. Esta função de escala de frequência permite que o sensor seja usado para o microcontrolador de forma eficiente.

3.3.6. CALIBRAÇÃO DOS SISTEMAS E PARÂMETROS ANALÍTICOS

Para a calibração dos sistemas instrumentais foram utilizados os corantes alimentícios, preparados como descrito no tópico 3.2.3. Os parâmetros avaliados nas curvas analíticas variando-se as concentrações de 0,00 a 100,00 mg L^{-1} foram: linearidade, faixa de trabalho e a precisão da pipetagem e da imagem adquirida, conforme descrito na Tabela 6 para o suporte de placa de 96 poços dos Sistemas I e II, realizados em triplicata genuínas. Para o uso no Sistema III pipetou-se volume específico (determinado no estudo do volume), lidos em triplicata das concentrações dos corantes de 0,00 a 100,00 mg L^{-1} , utilizando o macro do MS Excel 2019.

Tabela 6. Planejamento utilizado na avaliação dos Sistemas I e II, quanto a linearidade e a faixa de trabalho das curvas analíticas dos corantes, variando-se a concentração entre 0,00 e 100,00 mg L⁻¹

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
s	100,00	0,00	100,00	s	0,00	100,00	0,00	1
s	75,00	0,10	75,00	s	0,10	75,00	0,10	2
s	50,00	0,50	50,00	s	0,50	50,00	0,50	3
s	25,00	1,00	25,00	s	1,00	25,00	1,00	4
s	10,00	2,50	10,00	s	2,50	10,00	2,50	5
s	7,50	5,00	7,50	s	5,00	7,50	5,00	6
s	5,00	7,50	5,00	s	7,50	5,00	7,50	7
s	2,50	10,00	2,50	s	10,00	2,50	10,00	8
s	1,00	25,00	1,00	s	25,00	1,00	25,00	9
s	0,50	50,00	0,50	s	50,00	0,50	50,00	10
s	0,10	75,00	0,10	s	75,00	0,10	75,00	11
s	0,00	100,00	0,00	s	100,00	0,00	100,00	12
	amarelo	laranja	violeta		azul	verde	vermelho	Corante

s = poço vazio.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

As curvas analíticas selecionadas foram as que apresentaram melhor desempenho em termos de repetitividade e reprodutibilidade de variáveis para a faixa de trabalho escolhida. A exatidão foi calculada pela comparação de 12 amostras de corantes, lidas nos três Sistemas propostos (I, II, III) e comparadas com os resultados do espectrofotômetro UV-Vis, seguindo o documento DOQ-CGCRE-008/2016 do INMETRO.

Já para a calibração dos métodos analíticos, aplicados nas amostras de leite fresco fluido, foram feitos os estudos de alguns parâmetros analíticos como: a seletividade dos agentes cromogênicos, para cada analito estudado; a linearidade e faixa de trabalho das curvas analíticas; estudo da precisão (intra-dia - repetitividade e inter-dias - reprodutibilidade); exatidão por adição e recuperação; comparação com métodos recomendados de referência; limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), como descrito na RDC no 166/2017 da ANVISA. Os limites de detecção e o limite de quantificação foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão do intercepto da curva analítica e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma, de acordo com as Equações 11 e 12.

$$LD = \frac{DP_0 \times 3}{IC} \quad Eq. (11)$$

$$LQ = \frac{DP_0 \times 10}{IC} \quad Eq. (12)$$

Em que:

IC é a inclinação da curva

DP_0 é o desvio padrão do intercepto com eixo y das três curvas analíticas construídas em triplicata (BRASIL, 2017).

3.3.7. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Após a calibração dos Sistemas instrumentais I, II e III desenvolvidos com os corantes alimentícios, esses foram aplicados em análises de rotina do leite cru (fluido), incluindo a identificação de adulterantes, visando verificar a eficiência de cada Sistema. As análises seguiram os métodos estabelecidos como oficiais pela Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2018 do Ministério da Agricultura Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (MAPA). Esses métodos estão mais detalhadamente descritos no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao *International Standard Book Number* (ISBN) sob o número 978-85-7991-111-8, disponível no sítio eletrônico do MAPA.

O manual é destinado para realização de ensaios em amostras de produtos de origem animal, incluindo o leite fluido (fresco), as quais são oriundas dos programas e controles oficiais, cuja adoção é compulsória pelos laboratórios integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária. Apesar do laboratório no qual foram realizados os testes na universidade, não terem critérios e normas exigidas pela ABNT NBR ISO 17.025, os métodos recomendados como oficiais foram tomados como tal.

Algumas metodologias de alguns adulterantes que não foram mencionados no Manual, a exemplo da análise de ureia, não estão descritos no mesmo, pelo fato do teste não ser executado rotineiramente.

3.3.7.1. DETERMINAÇÃO DO PH (1ª APLICAÇÃO)

A determinação do pH é uma prova obrigatória, tanto na recepção do leite cru pelo transportador, quanto nos laticínios. Segundo a IN 68, a determinação do pH é realizada pelo método potenciométrico, e o valor que o leite fresco fluido tende a apresentar está entre 6,6 e 6,8 (BRASIL, 2018).

Outro teste comumente aplicado é o teste do alizarol. Este teste é composto por duas provas: a 1ª prova do pH é feita com indicador alizarina e, a 2ª prova consiste na prova de estabilidade do leite feita com álcool a 72 GL (Gay-Lussac) ou %(v/v). A prova da estabilidade do leite é uma análise rápida, que prevê se o leite fresco pode ou não ser pasteurizado. Se o leite coagular com esta proporção de álcool, o produto não pode ser pasteurizado, pois irá coagular e precipitar nas tubulações. Existem diversos autores, que questionam o teste do alizarol, com relação ao número elevado de casos de falso-positivo em relação à prova do álcool. Nesses casos, o leite apresenta uma acidez dentro dos parâmetros considerados normais (6,6 a 6,8), mas ele coagula na presença da solução etanólica de 72 % (v/v) ou GL, sendo denominado de leite LINA, que significa “Leite Instável Não Ácido”. O LINA é ocasionado por diversos fatores como a raça do animal, sazonalidade, alimentação entre os outros fatores (BELOTI, 2015). Entretanto, neste estudo vamos só focar no teste da alizarina, que é referente ao pH da amostra do leite.

MÉTODO DE REFERÊNCIA

O método oficial para análise do pH do leite fresco fluido é o método potenciométrico, em que se utiliza um eletrodo combinado de vidro contendo Ag/AgCl como referência. Com o potenciômetro, ligado na rede estabilizada, retira-se as soluções tampão de $7,00 \pm 0,02$ e $4,00 \pm 0,02$ da refrigeração e, as deixa em temperatura ambiente por 15 minutos. O potenciômetro, é então calibrado, com as 2 soluções tampão e, as amostras de leite fresco são lidas a temperatura 20,0 °C. Lembra-se que as amostras utilizadas foram de animais da própria Fazenda da Universidade (UEL), recém ordenhadas no primeiro período do dia, armazenadas em geladeira (4 a 8 °C) e, as leituras do pH realizadas de uma a duas horas, após a

ordena em temperatura de 20 °C, evitando-se resultados alterados de pH devido a formação de espuma no leite cru.

As amostras provenientes do LIPOA (Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA-UEL), que não apresentaram nenhum tipo de alteração (pH 6,6 a 6,8) ou adulteração, foram tomadas como amostras de referência. Estas amostras foram utilizadas para o estudo comparativo do método potenciométrico (oficial) versus o método colorimétrico (proposto), aplicando-se a análise por imagem digital com o uso dos Sistemas instrumentais I, II e III desenvolvidos, avaliando-se a viabilidade do método proposto.

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO PARA OS SISTEMAS

As amostras de leite normal, tomadas como referência, advindas do LIPOA, foram acidificadas e basificadas, com ácido láctico e hidróxido de sódio a 1,0 mol L⁻¹ respectivamente, visando acertar o pH de alíquotas de 25,0 mL. O pH foi variado em 2 faixas: de 5,00 a 8,00 em intervalo de 0,50; e de 6,00 a 7,00 em intervalo de 0,10; totalizando 15 níveis de pH, como indicado no planejamento da Tabela 7.

Tabela 7. Planejamento do estudo do pH de amostras de leite fresco, com variações entre 5,00 a 8,00, com intervalos de 0,50 (H a E) e 0,10 (A a D), utilizando-se ácido láctico e hidróxido de sódio, ambos a 1,0 mol L⁻¹

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
5,00	5,00	5,00	5,00	6,00	6,00	6,00	6,00	1
5,50	5,50	5,50	5,50	6,10	6,10	6,10	6,10	2
6,00	6,00	6,00	6,00	6,20	6,20	6,20	6,20	3
6,50	6,50	6,50	6,50	6,30	6,30	6,30	6,30	4
7,00	7,00	7,00	7,00	6,40	6,40	6,40	6,40	5
7,50	7,50	7,50	7,50	6,50	6,50	6,50	6,50	6
8,00	8,00	8,00	8,00	6,60	6,60	6,60	6,60	7
s	s	s	s	6,70	6,70	6,70	6,70	8
a1	a1	a1	s	6,80	6,80	6,80	6,80	9
a2	a2	a2	s	6,90	6,90	6,90	6,90	10
a3	a3	a3	s	7,00	7,00	7,00	7,00	11
a4	a4	a4	s	s	s	s	s	12

s: poço vazio; a1, a2, a3 e a4: amostras de leite

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A precisão intermediária (inter-dias) e a estabilidade nas determinações de pH foram avaliadas em 2 dias diferentes, utilizando-se amostras de leite cru armazenadas em geladeira (4 a 8 °C) e amostras recém ordenhadas. Os resultados obtidos para as medidas de pH empregando-se os 3 Sistemas propostos foram comparados aos valores fornecidos pelo método de referência, utilizando-se um pHmetro comercial.

TESTE DE INDICADORES: ALIZARINA, AZUL DE BROMOTINOL E INDICADOR MISTO

Três diferentes indicadores foram testados, para verificar a melhor resposta para a determinação do pH por meio colorimétrico utilizando as imagens digitais, em cada um dos 3 Sistemas projetados. As soluções indicadoras de pH de azul de bromotimol (Merck®) e a mistura de indicadores (vermelho de metila e tetrabromometacresolsulfonftaleína ou verde de bromo cresol), foram preparadas a 1,0 % (m/v) em etanol na concentração de 72 % (v/v), bem como a solução etanólica de alizarina (1,2-dihidroxi-antraquinona-3-sulfonato de sódio ou vermelho de alizarina S) adquirida comercialmente (LABLAC®) a 0,20% (m/v).

Os testes dos Sistemas I e II propostos foram feitos nas placas de 96 poços utilizando um volume final de 350,0 µL (amostra + solução indicadora). Para o Sistema III utilizou-se um volume 5,0 mL, para estudar a proporcionalidade entre o volume de amostra e o volume de indicador. Posteriormente, foram feitos estudos avaliando-se a linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e interferentes.

3.3.7.2. DETERMINAÇÃO DE AMIDO (2ª APLICAÇÃO)

O amido pode ser encontrado em diversos cereais como: batata, trigo, milho, arroz, mandioca entre outros. A adulteração por adição no leite tem como objetivo a reconstituição do produto, após a diluição com água ou soro. Como o amido é um polissacarídeo constituído por moléculas de glicose, sua estrutura é composta basicamente por duas macromoléculas: amilose (glicoses ligadas por ligação $\alpha(1,4)$) e

amilopectina (que apresenta ramificações de ligações alfa $\alpha(1, 6)$); as quais se complexam com íons iodetos na forma I_3^- e I_5^- (LEHNINGER, 1995). Esta reação de complexação é o método de referência para a determinação de amido em leite. Neste método de triiodeto (I_3^-) e o pentaiodeto (I_5^-) se complexam com a estrutura do amido, produzindo coloração azul no leite, na presença de amido. Este método é considerado um método qualitativo, sendo o método mais utilizado para determinação de amido em leite fluido.

MÉTODO DE REFERÊNCIA

O método de referência, para verificar amido no leite, emprega a complexação, em que o amido reage com o iodo, na presença do indicador iodeto de potássio (KI), solução também conhecida com o nome de Lugol. A solução de Lugol a 10,0 % (m/V) foi preparada dissolvendo-se 2,0 g de KI e 1,0 g de I_2 em água ultrapura em um balão volumétrico de 30,0 mL. As amostras de leite cru fresco, fornecidas pelo LIPOA, foram inicialmente testadas com o Lugol, para se atestar a inexistência de amido, visando utilizá-las para o preparo das curvas analíticas. Para isto, preparou-se 20 níveis de concentração, adicionando-se as massas de amido solúvel em volumes variados de leite fresco, de forma que as concentrações finais estivessem entre 0,0 e 1000,0 mg L⁻¹ (Tabela 8). Um volume de 5,0 mL dessas amostras de leite adulteradas foi transferido para tubos de ensaio e aquecido em banho-maria a 100,0 °C durante 5 minutos. Após o resfriamento das amostras, para o teste final, adicionou-se de 3 a 4 gotas de solução de Lugol a 10 % (m/V) ao tubo que foi agitado. A formação de coloração acinzentada ou azul escuro (I_3^- ou I_5^-) indica de que há presença de amido na amostra (AOAC, 2016). Se o leite continuar branco opaco ou levemente amarelado é o indicativo de que o resultado da prova foi negativo ou não foi detectado pelo analista, por conta do limite de detecção.

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO PARA OS SISTEMAS

Adaptando-se o método recomendado como oficial para as placas de 96 poços, empregando-se os Sistemas I e II, utilizou-se 340,0 µL de amostra de leite e 10,0 µL de solução de lugol a 10,0 %(v/v), visando avaliar e padronizar a mesma proporção do volume utilizado no método qualitativo (3 a 4 gotas) recomendado pelo Manual de Métodos Analíticos de Inspeção de Origem Animal (BRASIL, 2018). Posteriormente, foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD), quantificação (LQ), robustez e estabilidade do analito na amostra. O planejamento da distribuição feita nos poços contendo os pontos das curvas analíticas está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Planejamento de distribuição nas microplacas de amostras de leite fresco adulteradas em diferentes concentrações finais (0,0 e 1000,0 mg L⁻¹) de amido e a solução de lugol 10,0%, para avaliar o desempenho dos Sistemas I e II propostos, com base em sua sensibilidade

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
s	100,0	100,0	s	0,0	0,0	0,0	s	1
s	200,0	200,0	s	10,0	10,0	10,0	s	2
s	300,0	300,0	s	20,0	20,0	20,0	s	3
s	400,0	400,0	s	30,0	30,0	30,0	s	4
s	500,0	500,0	s	40,0	40,0	40,0	s	5
s	600,0	600,0	s	50,0	50,0	50,0	s	6
s	700,0	700,0	s	60,0	60,0	60,0	s	7
s	800,0	800,0	s	70,0	70,0	70,0	s	8
s	900,0	900,0	s	80,0	80,0	80,0	s	9
s	1000,0	1000,0	s	90,0	90,0	90,0	s	10
s	s	s	s	s	s	S	s	11
s	s	s	s	s	s	S	s	12

s – poço vazio

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O monitoramento das amostras de leite adulteradas com amido ocorreu com repetição genuína em triplicatas, durante 3 dias, tendo sido as amostras armazenadas em geladeira (4 a 8 °C), efetuando-se a comparação com amostras recém-preparadas diariamente.

3.3.7.3. DETERMINAÇÃO DE URÉIA(3ª APLICAÇÃO)

A determinação de ureia não é realizada rotineiramente segundo as INs, mas essa análise é comumente realizada por métodos espectroscópicos no infravermelho próximo (NIRS) ou médio (MIRS) (POONIA et al., 2017). Como essa análise de acordo com o Manual de Métodos Analíticos de Inspeção de Origem Animal (BRASIL, 2018), não há a obrigatoriedade de esta ser realizada como uma análise de rotina, não havendo nenhum outro tipo de teste que seja recomendando. Este fato pode justificar os casos ocorridos em meados de 2013 no Sul do País, em que o MAPA e os órgãos estaduais identificaram a presença de ureia agrícola (fertilizantes) em lotes de leite fluido (G1, 2013).

A ureia atua como reconstituente de densidade proteica, por possuir na sua estrutura uma carbonila na ligação peptídica(C=N). Desta forma, em determinações espectroscópicas de MIR ou NIR associadas às ferramentas quimiométricas, a similaridade dos grupamentos característicos “aparentemente” recompõe a quantidade proteica do leite mascarando a aguagem (TOLEDO, 2017). Entretanto, existem outras dificuldades associadas à esta determinação. Uma delas é baixa sensibilidade para detecção e quantificação dos métodos espectroscópicos. Outra questão, refere-se à necessidade de um banco de dados contendo um elevado número de amostras com certa variabilidade, para que os modelos de calibração possam ser criados e, as predições por eles geradas possam ser válidas. Portanto, para a análise de ureia, optou-se em utilizar um *spot test* adaptado do método de Salve et al. (2018) que utiliza o p-DMAB (para-dimetilaminobenzaldeído) como agente cromogênio.

Três curvas analíticas foram preparadas em triplicata com diferentes concentrações de ureia a partir de uma solução estoque de 10.000 mg L⁻¹ em três matrizes diferentes: água ultrapura, leite cru tomado como referência (LIPOA) e leite cru tratado com urease. A faixa de trabalho utilizada foi de 0,0 a 1.000,0 mg L⁻¹ de ureia.

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

O método espectrofotométrico empregou uma etapa de limpeza (*clean-up*) no

preparo da amostra de leite cru, seguindo o procedimento descrito por Toledo et al. (2017). Neste procedimento, 1,0 mL de leite cru foi misturado a 1,0 mL de acetonitrila em um tubo eppendorf de 2,0 mL. O tubo foi agitado em vórtex (VX-38, Warmnest, EUA) a 3800 rpm por 2 minutos e centrifugado em mini centrífuga (MiniSpin® C1008, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por 5 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outro tubo e armazenado em geladeira a 4,0 °C. Dois mililitros do sobrenadante da amostra foram misturados com 200,0 µL de solução do agente cromogênio p-DMAB (para-dimetilaminobenzaldeído) (Nuclear®), recém preparada em concentração de 2,0 % (m/V) em etanol absoluto (Dinâmico) e 10,0 % de ácido clorídrico a 37,0% (Dinâmica). Os sobrenadantes derivatizados foram lidos em espectrofotômetro UV-Mini 1240 no comprimento de onda de 435 nm após 5 minutos de reação.

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO PARA OS SISTEMAS

Para um teste preliminar pipetou-se 340,0 µL de amostra de leite cru com 10,0 µL de solução de p-DMAB a 2,0 % (m/V, solução etanólica acidificada com 10,0 % de HCl a 37,0%) na microplaca. Após a pipetagem, a placa foi posicionada no suporte inferior do protótipo instrumental e as imagens foram adquiridas pelo *smartphone*, tendo decorrido um tempo de aproximadamente 5 minutos, após a reação de derivatização para aparecimento da cor da 1ª amostra. Posteriormente, foram feitos estudos da proporção dos volumes avaliando-se a linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e interferentes.

O estudo da estabilidade da ureia foi repetido por 2 dias diferentes, utilizando o mesmo leite armazenado em geladeira (4 a 8 °C), comparando-se as amostras recém adquiridas do LIPOA.

3.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos parâmetros instrumentais dos Sistemas I, II e III e dos métodos analíticos aplicados foram tratados e comparados pelos *softwares* Microsoft Office

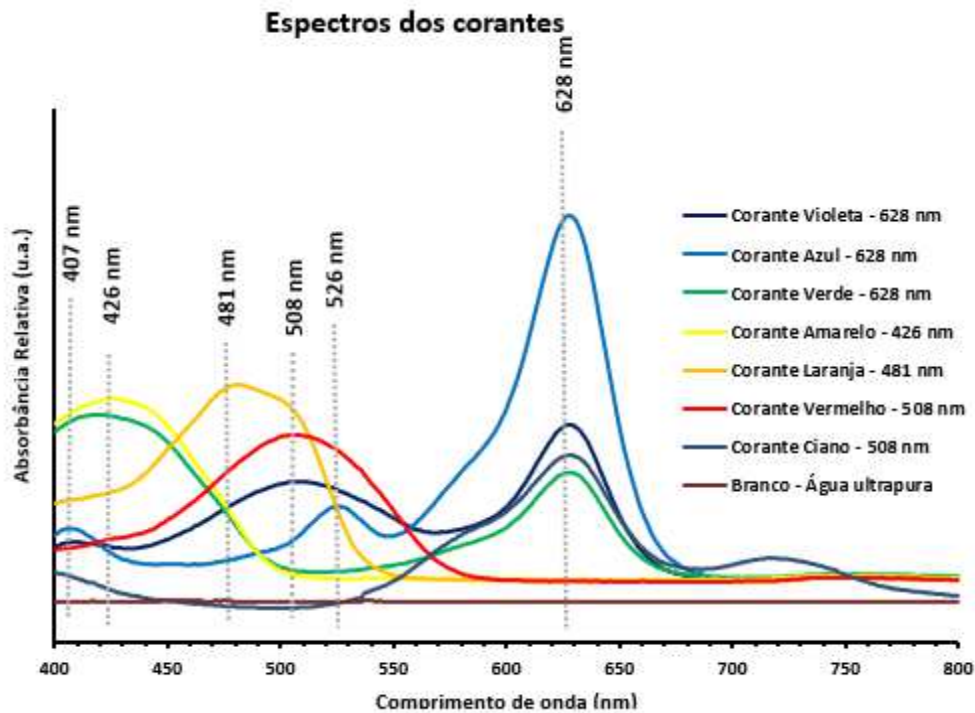
Excel versão 2019 e StatSoft Statistica® 10.0 *package* (Tulsa, OK, USA), sempre aplicando o *test t* de *Student* e a análise de variância (ANOVA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DOS CALIBRANTES DOS SISTEMAS

Os espectros de varredura das seis soluções de corantes na concentração de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ utilizados nas calibrações dos Sistemas I, II e III propostos estão ilustrados na Figura 22.

Figura 22. Espectros de varredura no visíveis dos seis corantes utilizados na calibração do Sistemas I, II e III propostos



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Pode-se observar na Figura 22 que dos 6 corantes estudados, os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) do amarelo e do verde foram de 426 nm; do azul e violeta de 628 nm; já do laranja e do vermelho foram de 481 e 508 nm, respectivamente, condizente com a Tabela 9.

A caracterização desses corantes foi fundamental no estudo de otimização e calibração dos três Sistemas propostos, pois os parâmetros ajustados foram em função de uma resposta analítica diretamente relacionada na conversão da energia luminosa em sinal eletrônico (efeito fotoelétrico), transcritos pelos conversores

analógico-digital (A/D) de 8 *bits* de cada variável (alfa, *R*, *G*, *B*), totalizando 24 *bits* (PRATT, 1991; GONZALEZ, WOODS, 2008).

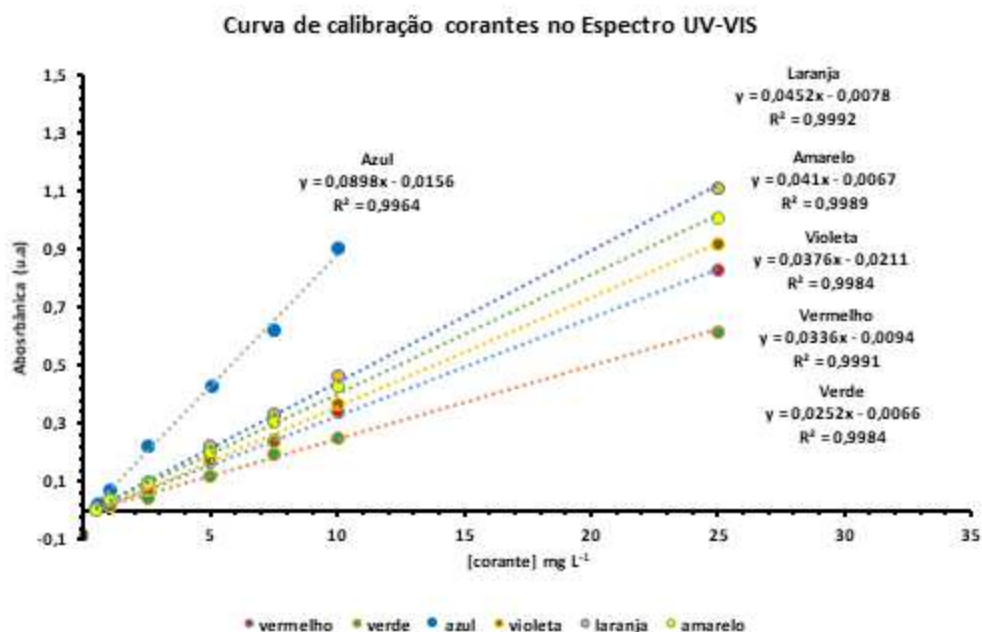
Tabela 9. Regiões espectrais (nm) de algumas cores primárias e secundárias, e suas cores complementares

Cor absorvida	Comprimento de onda (nm)		Cor complementar
Violeta	~ 380 a ~440	~ 560 a ~580	Verde-amarelado
Azul (B)	~ 435 a ~480	~ 580 a ~595	Amarelo
Azul-esverdeado	~ 480 a ~490	~ 595 a ~650	Laranja
Ciano (G + B)	~ 490 a ~500	~ 650 a ~780	Vermelho (R)
Verde (G)	~ 500 a ~560	~ 380 a ~440	Violeta
Amarelo	~ 580 a ~595	~ 435 a ~480	Azul (B)
Laranja	~ 595 a ~650	~ 480 a ~490	Azul-esverdeado
Vermelho (R)	~ 650 a ~780	~ 490 a ~500	Ciano (G + B)

Fonte: adaptado de ZOLLINGER (2001).

As curvas de analíticas dos corantes estão apresentadas na Figura 23, lidas em seus respectivos comprimentos de onda máximos, para posterior comparação com método espectrométrico UV-VIS.

Figura 23. Curvas analíticas nos comprimentos de ondas máximos dos corantes usados na calibração dos três Sistemas I, II, III desenvolvidos



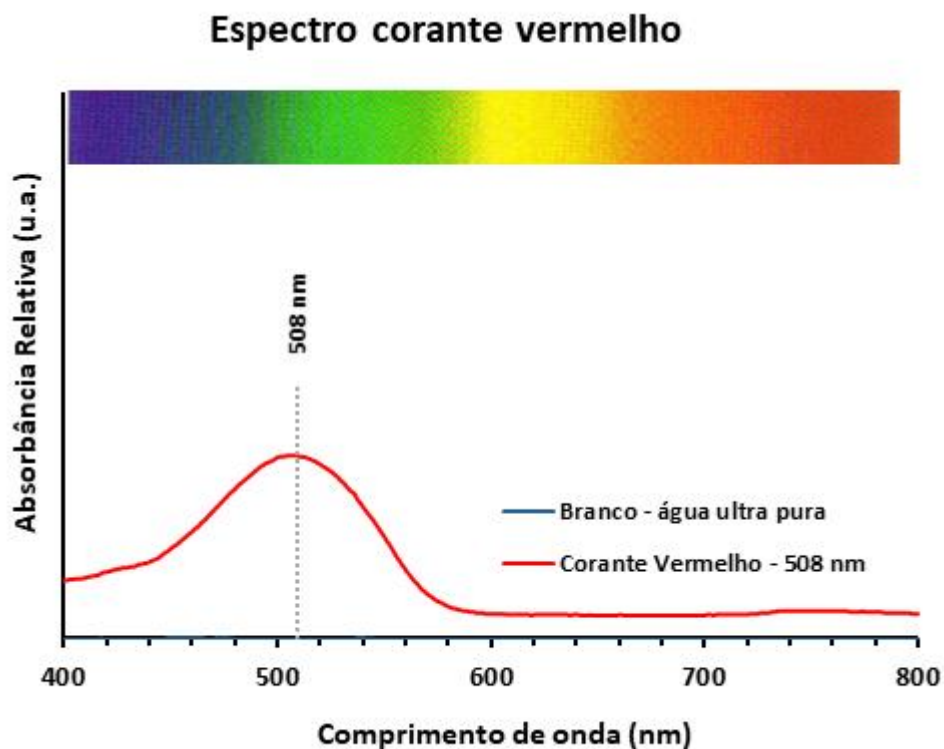
Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Esses corantes apresentam a capacidade de avaliar os sensores de imagem no *R*, *G* e *B*, dos três Sistemas propostos I, II e III, mas antes da calibração deles, os parâmetros foram otimizados para cada Sistema.

4.2. OTIMIZAÇÃO E CALIBRAÇÃO DOS PARÂMETROS DOS SISTEMAS

O estudo das otimizações dos parâmetros para os Sistemas I, II, e III foi feito com os dados do corante vermelho. O espectro de varredura do corante vermelho, como indicado na Figura 24, apresentou o comprimento de onda máximo de absorção da radiação em 508 nm, que compreende a região da verde (*G*) de azul (*B*) (Tabela 9).

Figura 24. Espectro de varredura do corante vermelho utilizado para otimizar todos os três Sistemas propostos



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

As principais comparações realizadas nestes estudos dos parâmetros (iluminação, volume e resolução) foram somente para a variável *G* ou para ambas (*G*

e B,) pois segundo a teoria das cores, como o corante utilizado foi o vermelho, a região de maior absorção é a cor ciano (~ 490 a ~ 500 nm) e/ou verde (~ 500 a ~ 560 nm).

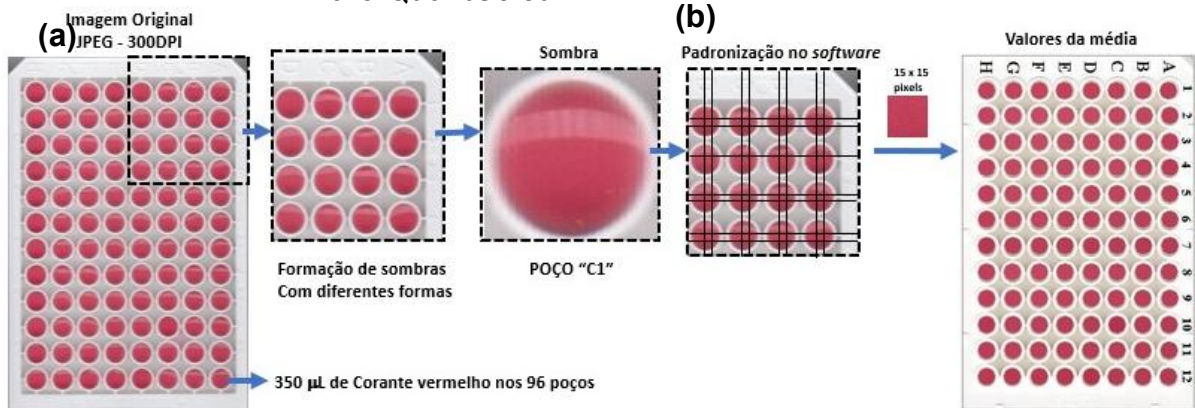
As curvas analíticas dos outros cinco corantes, utilizadas para a calibração final dos Sistemas I, II e III propostos, tendo sido realizadas com todos os parâmetros pré-fixados após a otimização dos parâmetros experimentais, estão apresentadas no ANEXO II. A precisão dos 3 Sistemas foi avaliada empregando-se concentrações conhecidas dos corantes e, a exatidão foi verificada pelo comparativo entre os resultados obtidos empregando-se um espectrofotômetro UV-Vis comercial.

4.2.1. ILUMINAÇÃO

4.2.1.1. SISTEMA I

As imagens digitalizadas pelo Sistema I, via *scanner* de mesa portátil em resolução de 300 *DPIs* estão mostradas na Figura 25.

Figura 25. Imagens obtidas utilizando o Sistema I (a) escaneada a 300 *DPIs* da placa de 96 poços com volume de 350 μL de corante vermelho na concentração de 10,0 mg L⁻¹, indicando a formação de sombras. (b) Padronizações de áreas da imagem, visando tratar via software *QuantColour* esses efeitos



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A imagem do Sistema I (Fig. 25) mostra que houve a formação de sombras na parte superior dos poços, no sentido em que a barra de LEDs percorre a linha (coluna 1 a 12 da placa).

Um dos motivos da formação dessas sombras é a distância entre a placa contendo o volume de amostra no poço (350 μL) e o vidro do *scanner*. Como o *scanner* é projetado para aquisição de documentos de superfícies planas e finas, o espaço entre a placa e o vidro do *scanner* fazem com que a luz refletida sobre a superfície (placa + solução) caminhem de forma mais difusa, espalhando-se pelas bordas de cada poço, que acaba sendo detectada pelo sensor de CCD (PRATT, 1991). As sombras e pequenos reflexos foram solucionados com auxílio do programa *QuantColour*, que apresenta uma ferramenta para cortar uma área específica das imagens, como mostrada na Figura 25b. Nas imagens adquiridas via *scanner* áreas de 15x15 *pixels* foram selecionadas automaticamente sem a presença das sombras.

Os resultados das médias e desvios das placas de 96 poços escaneadas pelo Sistema I contendo 350 μL de corante vermelho (10,0 mg L^{-1}) após o corte de uma área de 15 x15 *pixels*, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados das médias e desvios das intensidades de G do corante vermelho avaliando a iluminação da barra de LEDs do scanner, desconsiderando-se a área da sombra em cada poço feitas pelo software *QuantColour* ao empregar o Sistema I.

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
64,50 \pm 3,54	67,00 \pm 2,83	66,00 \pm 1,41	67,00 \pm 1,41	64,00 \pm 0,00	65,50 \pm 0,71	65,00 \pm 0,00	63,50 \pm 0,71	1
64,50 \pm 0,71	63,00 \pm 1,41	65,00 \pm 0,00	63,50 \pm 2,12	65,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	65,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	2
62,00 \pm 0,00	64,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	65,50 \pm 0,71	63,00 \pm 1,41	65,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	64,50 \pm 2,12	3
63,50 \pm 2,12	64,50 \pm 0,71	65,00 \pm 1,41	64,50 \pm 0,71	63,50 \pm 2,12	65,00 \pm 0,00	64,00 \pm 1,41	64,00 \pm 2,83	4
66,50 \pm 2,12	65,00 \pm 1,41	64,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	63,50 \pm 2,12	64,00 \pm 1,41	63,50 \pm 2,12	66,50 \pm 0,71	5
65,50 \pm 0,71	63,00 \pm 1,41	64,50 \pm 0,71	65,00 \pm 0,00	64,00 \pm 2,83	64,50 \pm 0,71	65,00 \pm 0,00	64,50 \pm 0,71	6
65,00 \pm 1,41	64,50 \pm 0,71	63,00 \pm 1,41	65,00 \pm 0,00	63,50 \pm 2,12	65,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	65,50 \pm 0,71	7
64,00 \pm 0,00	64,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	62,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	66,00 \pm 0,00	64,00 \pm 0,00	8
64,50 \pm 3,54	67,00 \pm 2,83	66,00 \pm 1,41	67,00 \pm 1,41	64,00 \pm 0,00	65,50 \pm 0,71	65,00 \pm 0,00	63,50 \pm 0,71	9
64,50 \pm 0,71	63,00 \pm 1,41	65,00 \pm 0,00	63,50 \pm 2,12	65,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	65,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	10
62,00 \pm 0,00	64,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	65,50 \pm 0,71	63,00 \pm 1,41	65,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	64,50 \pm 2,12	11
63,50 \pm 2,12	64,50 \pm 0,71	65,00 \pm 1,41	64,50 \pm 0,71	63,50 \pm 2,12	65,00 \pm 0,00	64,00 \pm 1,41	64,00 \pm 2,83	12

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A análise de variância (ANOVA) pós-exclusão das áreas sombreadas, evidenciou que não houve diferença significativa em nível de 5 % de confiança entre as médias de G entre o grupo de 96 poços (valor-p > 0,05), evidenciada pelo $F_{\text{calculado}}(1,17) < F_{\text{crítico}}(1,40)$; nem entre as colunas H a A ($F_{\text{calculado}}(0,83) < F_{\text{crítico}}(2,12)$) e nem

entre as linhas 1 a 12 ($F_{\text{calculado}} (0,61) < F_{\text{crítico}} (1,90)$), dados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultado da análise de variância (ANOVA) avaliando a iluminação da barra de LED do scanner no Sistema I, desconsiderando área da sombra em cada poço

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre 96 poços	208,81	95	2,20	1,17	0,23	1,40
Dentro dos grupos	181	96	1,88			
Entre colunas A a H	6,49	7	0,93	0,83	0,56	2,12
Dentro dos grupos	97,92	88	1,11			
Entre as linhas 1 a 12	7,78	11	0,71	0,61	0,81	1,90
Dentro dos grupos	96,63	84	1,15			

SQ: Soma Quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: Média Quadrática; F:MQ²/MQ²; Valor-P: 0,05.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Apesar da iluminação do sistema apresentar algumas sombras, corrigidas pelo *software QuantColour*, este parâmetro mostrou-se em certas regiões da imagem e na parte da superfície amostral regular para o volume de 350 μL fixado neste estudo.

4.2.1.2. SISTEMA II

A imagem adquirida pela câmera do *smartphone* com qualidade de 13 MP (4:3) em um sistema com fitas de LEDs com variadas potências mostrou-se mais nítida com ausência de sombras e poucos reflexos dos LEDs sobre a placa. A instalação das fitas de LEDs a 90°, mostrou menos reflexos do que os apresentados no trabalho de Benedetti (2013), em que 4 LEDs foram posicionados em cada canto da caixa.

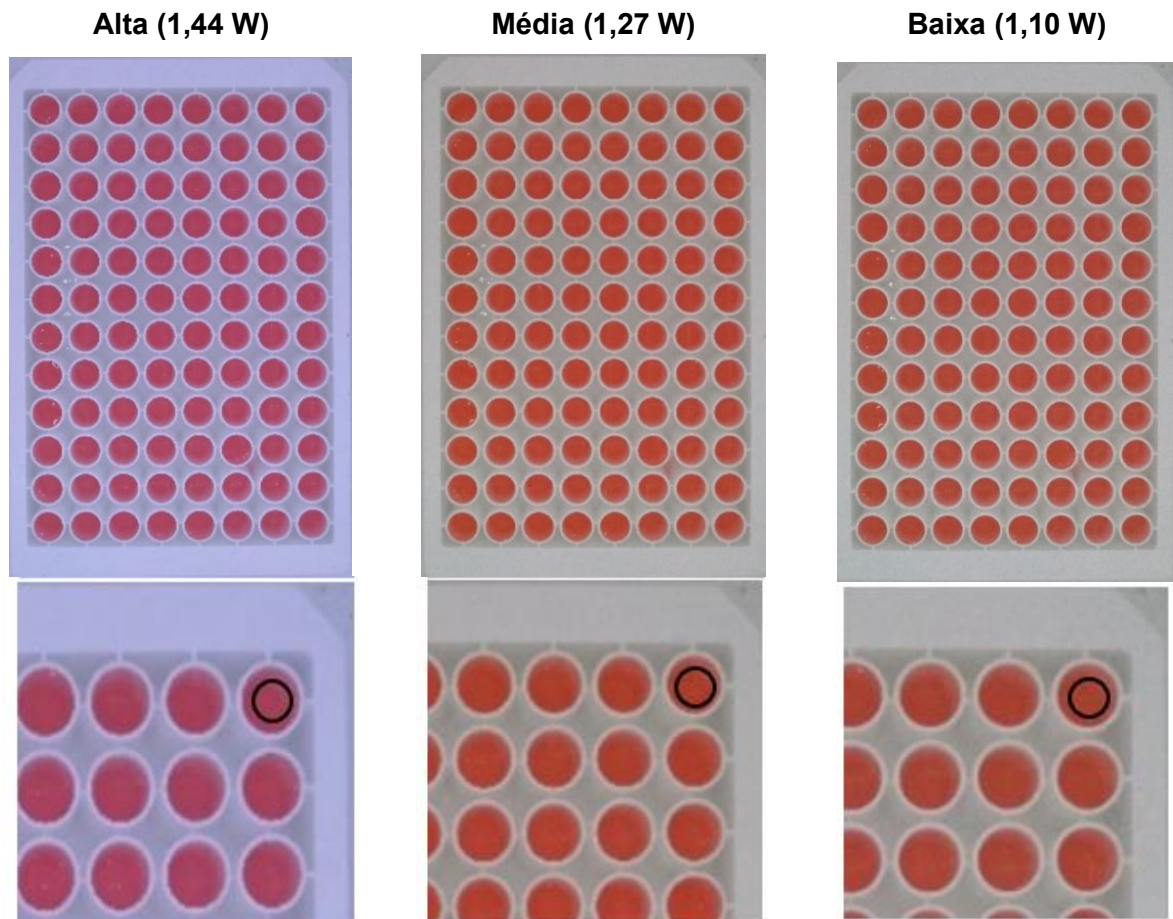
Figura 26. Imagem digital adquirida utilizando o Sistema II via câmera do smartphone Moto G, com resolução de 13 MP (4:3), da placa de 96 poços com volume amostral de 350 μ L e corante vermelho a 10,0 mg L⁻¹, sendo tratada pelo aplicativo QuantRGB



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

As imagens digitais empregando-se o Sistema II foram adquiridas em três níveis de iluminação de potência dos LEDs de 1,44, 1,27 e 1,10 W (alta, média e baixa potência), sem a utilização do *flash* e nem com o autoajuste da câmera do celular (Figura 26). As fotos mostraram os poços com menos sombras e reflexos (Fig. 27a) comparando-se com as imagens digitais adquiridas pelo *scanner* no Sistema I (Fig. 25), como indicado nas imagens ampliadas (*zoom*) destacando a seleção de uma área circular visual contendo um quadrado interno de área de 100 *pixels* (10 x 10) seleção feita via *touch screen* (Fig. 27b).

Figura 27. Imagens das placas variando a intensidade luminosa dos LEDs em alta, média e baixa potência e respectivas ampliações dessas imagens com os pontos de corte ativados via touch screen



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Comparando-se as imagens nas quais foram variadas as potências dos LEDs, nota-se que a imagem adquirida em alta potência (1,44 W) difere visualmente das outras 2 imagens (média e baixa). A ANOVA dos resultados para as intensidades médias das variáveis *RGB* para as três imagens adquiridas (Fig. 27), demonstra que houve diferença significativa em nível de 5% de significância ($p > 0,05$), fato confirmado pelo valor de $F_{cal}(6,02) > F_{crit}(3,00)$ (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado das médias e desvios das intensidades RGB em que foi variada a iluminação pelo controle da potência das fitas de LEDs do Sistema II em alta, média e baixa potência aplicando-se ANOVA e o teste de Tukey para comparar as médias (n=3)

<i>Potência dos LEDs</i>	<i>Intensidade Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Coefficiente de variância</i>			
Alta (1,44 W)	113,19 ^b	4,39	3,90			
Média (1,27 W)	100,05 ^a	5,54	5,54			
Baixa (1,10 W)	100,36 ^a	5,54	5,52			
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	32401,42	2	16200,71	6,02	0,0025	3,00
Dentro dos grupos	2315365	861	2689,15			

SQ: Soma Quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: Média Quadrática; F:MQ²/MQ²; Valor-P: 0,05.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A análise estatística (Tabela 12) mostra que não houve diferença significativa na intensidade do sinal *RGB* em nível de 5% quando a iluminação foi controlada em níveis de potências de 1,27 W (média) e a de 1,10 W (baixa) pelo teste de *Tukey*, em que a letra “a” mostra similaridade entre os valores das áreas. O elevado valor do desvio padrão pode ser explicado, pelo fato da média dos sinais *RGB* terem sido mensurados, considerando a radiação refletida.

A partir dos resultados das intensidades médias e dos desvios dos poços das imagens anteriores, optou-se em mostrar apenas os resultados das médias e desvios da iluminação dos LEDs de baixa intensidade (potência de 1,10 W), partindo-se do princípio de que em teoria, o consumo de energia da bateria é mais baixo (DIOUF, 2014). As médias e os desvios padrão das intensidades de cada poço da placa estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultado das médias e desvios da intensidade da variável G e ANOVA feita com os dados de iluminação dos LEDs do Sistema II em baixa potência (1,10 W)

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
66,00 ± 1,41	67,50 ± 3,54	68,50 ± 0,71	66,50 ± 0,71	65,50 ± 2,12	69,00 ± 1,41	71,50 ± 4,95	68,50 ± 0,71	1
68,50 ± 2,12	69,00 ± 1,41	67,50 ± 0,71	66,50 ± 0,71	70,50 ± 2,12	68,50 ± 3,54	68,00 ± 1,41	68,00 ± 2,83	2
62,50 ± 2,12	65,50 ± 0,71	67,50 ± 0,71	70,50 ± 0,71	71,50 ± 3,54	67,50 ± 2,12	66,50 ± 0,71	68,50 ± 2,12	3
67,00 ± 2,83	68,50 ± 3,54	69,50 ± 3,54	71,50 ± 2,12	68,50 ± 0,71	67,50 ± 2,12	69,50 ± 3,54	69,50 ± 0,71	4
68,50 ± 2,12	69,00 ± 1,41	72,50 ± 2,12	68,00 ± 1,41	69,00 ± 4,24	66,50 ± 0,71	69,00 ± 1,41	68,50 ± 0,71	5
67,50 ± 3,54	68,50 ± 0,71	72,00 ± 8,49	68,00 ± 1,41	69,50 ± 0,71	66,50 ± 2,12	68,50 ± 0,71	67,00 ± 1,41	6
68,00 ± 2,83	69,00 ± 1,41	72,50 ± 4,95	68,00 ± 2,83	68,00 ± 1,41	68,00 ± 2,83	67,50 ± 0,71	70,50 ± 0,71	7
67,50 ± 0,71	69,00 ± 0,00	66,00 ± 0,00	67,00 ± 0,00	70,00 ± 0,00	68,00 ± 0,00	69,00 ± 1,41	69,00 ± 0,00	8
66,00 ± 1,41	67,50 ± 3,54	68,50 ± 0,71	66,50 ± 0,71	65,50 ± 2,12	69,00 ± 1,41	71,50 ± 4,95	68,50 ± 0,71	9
68,50 ± 2,12	69,00 ± 1,41	67,50 ± 0,71	66,50 ± 0,71	70,50 ± 2,12	68,50 ± 3,54	68,00 ± 1,41	68,00 ± 2,83	10
62,50 ± 2,12	65,50 ± 0,71	67,50 ± 0,71	70,50 ± 0,71	71,50 ± 3,54	67,50 ± 2,12	66,50 ± 0,71	68,50 ± 2,12	11
67,00 ± 2,83	68,50 ± 3,54	69,50 ± 3,54	71,50 ± 2,12	68,50 ± 0,71	67,50 ± 2,12	69,50 ± 3,54	69,50 ± 0,71	12

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O resultado da ANOVA revelam que não houve diferença significativa entre as 96 intensidades médias da variável G em nível de 5% de confiança (valor-p 0,23 > 0,05), concordante com o valor de $F_{cal} (1,17) < F_{crit} (1,40)$ (Tabela 14).

Tabela 14. ANOVA para a intensidade de sinal da variável G em 96 poços de uma placa ELISA demonstrando a variância ocorrida quando a iluminação dos LEDs da caixa do Sistema II foi controlada a baixa potência (1,10 W)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-p	F crítico
Entre 96 poços	208,81	95	2,20	1,17	0,23	1,40
Dentro dos grupos	181,0	96	1,89			
Entre colunas A a H	20,4766	7	2,93	1,08	0,38	2,12
Dentro dos grupos	237,65	88	2,70			
Entre as linhas 1 a 12	40,72	11	3,70	1,43	0,17	1,90
Dentro dos grupos	217,41	84	2,59			

SQ: Soma Quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: Média Quadrática; $F: MQ^2/MQ^2$; Valor-p: 0,05.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

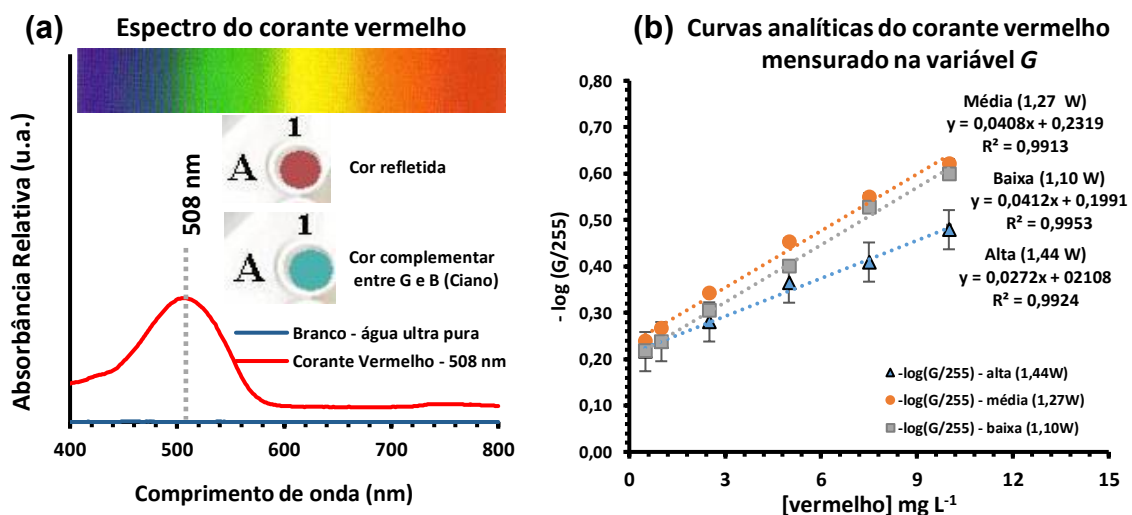
Pode-se ressaltar pelos resultados da ANOVA (Tab. 12) que não foi observada diferença na intensidade de sinal entre os poços da placa ELISA utilizando-se o Sistema II, nem ao longo das linhas 1 a 12 ($F_{cal} (1,08) < F_{crit} (2,12)$) e nem em relação às colunas A a H ($F_{cal} (1,43) < F_{crit} (1,90)$) em nível de 5 % de confiança (valor-p > 0,05) considerando-se à iluminação fixa em 1,10 W de potência das fitas de LEDs.

A escolha da melhor intensidade da luz para o Sistema II foi feita considerando a avaliação das inclinações das curvas analíticas do corante vermelho com

concentrações variando de 0,00 a 10,0 mg L⁻¹, adotando-se a variável da cor complementar para a região do comprimento de onda máximo do corante vermelho, em torno de 508 nm (Figura 28).

O valor bruto medido em *bits* (0 a 255) foi normalizado dividindo-se pela intensidade do branco (255 255 255), tendo sido este valor logaritimizado, levando em conta a região de maior absorção pela solução vermelha. Os estudos na literatura trazem diferentes formas de normalizações, como o trabalho do Benedetti (2013), em que a normalização foi feita pelo valor do branco analítico (G/G_0). No nosso estudo observa-se que a melhor normalização foi obtida pela intensidade de absorção (ANEXO I).

Figura 28. (a) Espectro de varredura do corante vermelho utilizando ($\lambda_{\text{máx}} = 508 \text{ nm}$) no Sistema II mostrando a cor refletida e complementar e (b) Intensidade do sinal do corante vermelho quando a potência de iluminação dos LEDs é variada



Níveis de iluminação	Curva de calibração do corante vermelho na variável G	Coefficiente de Determinação(R^2)
Alta (1,44 W)	$yG = 0,0272 xG + 0,2108$	0,9924
Média (1,27 W)	$yG = 0,0408xG + 0,2319$	0,9953
Baixa (1,10 W)	$y G= 0,0412xG + 0,1991$	0,9913

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A partir dos dados das curvas analíticas para a variável G ($-\log(G/255)$) a iluminação dos LEDs selecionada para incidir nas placas do Sistema II foi a de baixa potência (1,10 W), com coeficiente angular de 0,0412, não se diferenciando muito do ambiente iluminado com potência média (1,27 W) cuja inclinação foi de 0,0408. O coeficiente angular (inclinação da curva analítica) indica o quão diferenciável é a variação do sinal ($-\log(G/255)$) em relação a variação da concentração do corante

vermelho e, é conhecida como a sensibilidade de um equipamento ou método. Levando-se em conta este parâmetro, a iluminação selecionada para a aplicação nas amostras de leite foi a de baixa potência (1,10 W), além do ter o menor consumo de energia.

4.2.1.3. SISTEMA III

Os resultados dos testes preliminares e a ANOVA dos valores médios das intensidades empregando-se 10 tubos: vazios, com 5,0 mL da água ultrapura (branco analítico) e com de solução de corante vermelho lidos por 10 vezes ($n = 10$) para as variáveis G estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15. Intensidades médias da variável G com os respectivos desvios padrão e o resultado da ANOVA das dez leituras de dez tubos distintos, com água ultrapura e com solução de corante vermelho na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 10$) utilizando o Sistema III

TUBOS	Média (G) \pm DP					
Vazio	255,0 ^a \pm 0,00					
Água ultrapura (branco)	255,0 ^a \pm 0,00					
Corante vermelho ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$)	184,8 ^b \pm 1,80					
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	32853,6	2	16426,8	17325,1	1,08E-42	3,35
Dentro dos grupos	25,6	27	0,9			

SQ: Soma Quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: Média Quadrática; F: MQ^2/MQ^2 ; Valor-P: 0,05.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O resultado da ANOVA revela que houve diferença significativa em nível de 5,0%, indicado pelo $\text{valor-p}(1,08E-42) < 0,05$, evidenciado pelo $F_{\text{calculado}} (17325,1) > F_{\text{crítico}} (3,35)$. E o teste de Tukey, mostrou que após calibração do sensor com corante branco e preto, não houve diferença significativa entre as médias das intensidades da variável G de tubos vazios e utilizando-se 5,0 mL de água ultrapura (letra “a”); contudo, houve diferenciação dos tubos que continham a solução de corante vermelho a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (“b”) (Tabela 15).

A iluminação do Sistema III mostrou-se estável durante o estudo, demonstrada pela repetibilidade e reprodutibilidade dos valores das intensidades da radiação refletida pelos tubos vazios, com água ultrapura e com solução de corante

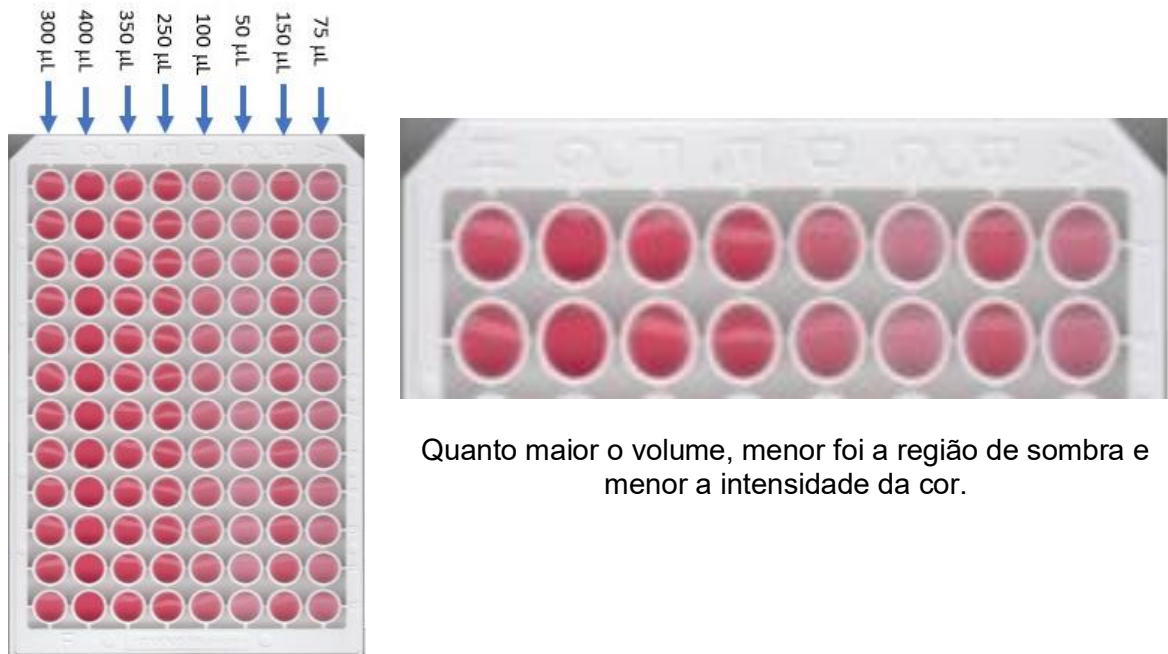
vermelho, indicando que a quantidade de 4 LEDs foi adequada para uma análise nesse Sistema.

4.2.2. VOLUME AMOSTRA

4.2.2.1. SISTEMA I

Como o *scanner* de mesa foi originalmente projetado para digitalização de documentos de baixa espessura, inicialmente testou-se a variação do volume da solução do corante vermelho ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) na tentativa de se minimizar o efeito do sombreado (Figura 29).

Figura 29. Imagem escaneada no Sistema I, na qual os volumes de amostragem variaram de 75,0 a 400,0 μL distribuídos ao longo das colunas A a H da placa de 96 poços



Quanto maior o volume, menor foi a região de sombra e menor a intensidade da cor.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

No teste preliminar, a imagem escaneada dos poços que apresentou menor região sombreada foi a da coluna que continha 400,0 μL de volume do corante vermelho. Pôde-se notar que, conforme o volume de padrão foi aumentado, menor foi a sombra formada e maior a intensidade da cor do pigmento vermelho. Apesar do

melhor resultado ter se apresentado para o volume de 400,0 μL de amostra, o fato deste ser o máximo volume do poço, levou-se em conta que, qualquer descuido no manejo poderia causar um erro maior, o que tornaria inviável a calibração.

A partir das médias dos volumes testados para cada coluna (Figura 29 e Tabela 16), selecionou-se 3 níveis de volumes, do quais as médias não tivessem diferenças significativas em nível de 5% de confiança no sinal de intensidade da variável G.

Tabela 16. Resultado das médias e desvios padrão das intensidades na variável G quando o volume de amostra foi variado de 50,0 a 400,0 μL nas colunas de A à H da placa de 96 poços

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
77,00 \pm 1,41	66,50 \pm 0,71	71,00 \pm 1,41	75,50 \pm 2,12	103,50 \pm 2,12	123,00 \pm 1,41	88,50 \pm 2,12	113,00 \pm 1,41	1
70,00 \pm 0,00	67,50 \pm 0,71	73,50 \pm 0,71	76,00 \pm 2,83	104,50 \pm 0,71	125,50 \pm 0,71	90,00 \pm 0,00	114,00 \pm 0,00	2
78,50 \pm 0,71	67,50 \pm 0,71	73,50 \pm 0,71	73,50 \pm 2,12	102,50 \pm 0,71	128,00 \pm 0,00	91,00 \pm 0,00	113,50 \pm 0,71	3
79,00 \pm 1,41	65,00 \pm 0,00	71,50 \pm 0,71	77,50 \pm 0,71	101,00 \pm 0,00	126,00 \pm 1,41	89,50 \pm 0,71	113,50 \pm 0,71	4
77,00 \pm 0,00	63,50 \pm 0,71	72,00 \pm 0,00	70,50 \pm 0,71	100,00 \pm 0,00	125,50 \pm 0,71	87,50 \pm 0,71	112,50 \pm 0,71	5
75,00 \pm 0,00	64,50 \pm 0,71	71,00 \pm 1,41	76,50 \pm 0,71	100,00 \pm 0,00	125,00 \pm 0,00	88,50 \pm 0,71	112,00 \pm 0,00	6
78,00 \pm 1,41	56,00 \pm 0,00	74,00 \pm 0,00	77,00 \pm 0,00	103,50 \pm 0,71	117,50 \pm 0,71	82,00 \pm 0,00	116,50 \pm 0,71	7
70,50 \pm 0,71	66,50 \pm 0,71	72,00 \pm 0,00	70,50 \pm 0,71	106,50 \pm 0,71	127,50 \pm 0,71	88,00 \pm 4,24	117,50 \pm 0,71	8
76,50 \pm 0,71	65,00 \pm 0,00	71,00 \pm 1,41	74,50 \pm 0,71	101,00 \pm 0,00	124,00 \pm 0,00	90,00 \pm 1,41	113,50 \pm 0,71	9
70,50 \pm 0,71	69,00 \pm 0,00	76,00 \pm 1,41	70,00 \pm 1,41	105,00 \pm 0,00	118,50 \pm 0,71	83,00 \pm 0,00	110,50 \pm 0,71	10
74,50 \pm 0,71	61,00 \pm 0,00	69,50 \pm 0,71	72,00 \pm 0,00	100,50 \pm 0,71	123,50 \pm 0,71	87,50 \pm 0,71	112,50 \pm 0,71	11
70,50 \pm 0,71	64,50 \pm 0,71	73,50 \pm 0,71	78,00 \pm 1,41	105,50 \pm 0,71	120,00 \pm 1,41	85,00 \pm 0,00	108,00 \pm 0,00	12

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A ANOVA indicou que houve diferença significativa em nível de 5,0% (valor-p < 0,05) de confiança entre as médias das colunas quando os volumes foram variados (Figura 29), demonstrado pelo $F_{calculado} (51,15) > F_{crítico} (2,12)$. Entretanto, o teste de Tukey indicou que não houve diferença significativa (5 %) entre as médias dos volumes 400,0 μL (coluna G) com as médias dos volumes de 250,0 μL (coluna E), 350,0 μL (coluna F) e 300,0 μL (coluna H), todos representado pela letra “a” sobrescrita nas médias da Tabela 17.

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) avaliando a média das intensidades da variável G em função dos diferentes volumes amostrais adotados no Sistema I proposto

<i>Volumes (μL)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Coefficiente de variância</i>			
A - 75,0	102,50 ^d	2,85	2,78			
B - 150,0	78,25 ^{b,c}	2,44	3,11			
C - 50,0	112,13 ^d	3,39	3,03			
D - 100,0	89,04 ^{b,d}	2,45	2,76			
E - 250,0	64,38 ^a	2,85	4,42			
F - 350,0	63,88 ^a	2,47	3,87			
G - 400,0	65,29 ^a	2,12	3,24			
H - 300,0	65,77 ^{a,b}	2,38	3,62			
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	37321,45	7	5331,64	51,15	2,41E-28	2,12
Dentro dos grupos	9172,94	88	104,24			

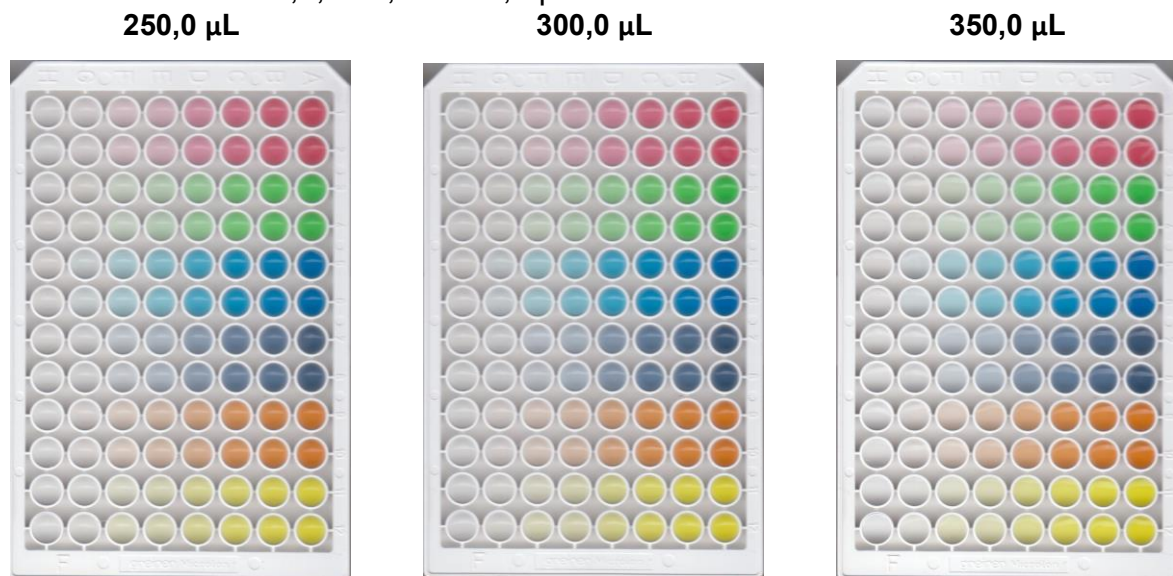
SQ: Soma Quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: Média Quadrática; F:MQ²/MQ²; Valor-P: 0,05.

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Os demais volumes estudados (50,0; 75,0; 100,0 e 150,0 μL) apresentaram diferença significativa em nível de 5% com relação a variável G tendo sido representados pelas outras letras “b”, “c” e “d”.

Desta forma, o melhor volume de amostragem foi avaliado e selecionado em função dos maiores coeficientes angulares das curvas analíticas dentre os volumes de 250,0; 300,0 e 350,0 μL (Figura 30) dos corantes estudados na faixa de 0,0 a 10,0 mg⁻¹, lembrando que o de 400,0 μL foi descartado por ser o volume máximo do poço.

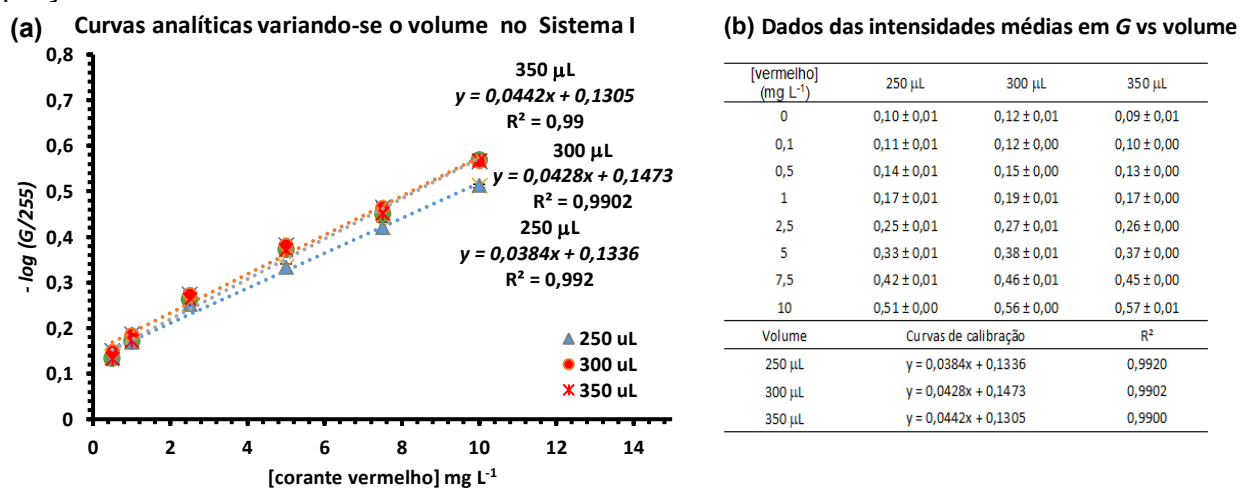
Figura 30. Imagens escaneadas das placas com os 6 corantes estudados variando-se a concentração de 0,0 a 10,0 mg L⁻¹ (conforme planejamento da Tabela 2) em volumes fixos de 250,0; 300,0 e 350,0 µL no Sistema I



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Desta maneira, selecionou-se o volume amostral a ser utilizado no Sistema I partir da maior inclinação proveniente das curvas analíticas para a variável G ($-\log(G/255)$) em função da concentração do corante vermelho, como apresentado na Figura 31.

Figura 31. (a) Curvas analíticas do corante vermelho (0,5 a 10,0 mg L⁻¹) em função dos diferentes volumes amostrais (250,0; 300,0 e 350,0 µL) empregando o Sistema I. (b) Resultados das médias das intensidades de G normalizadas com as respectivas Equação das retas



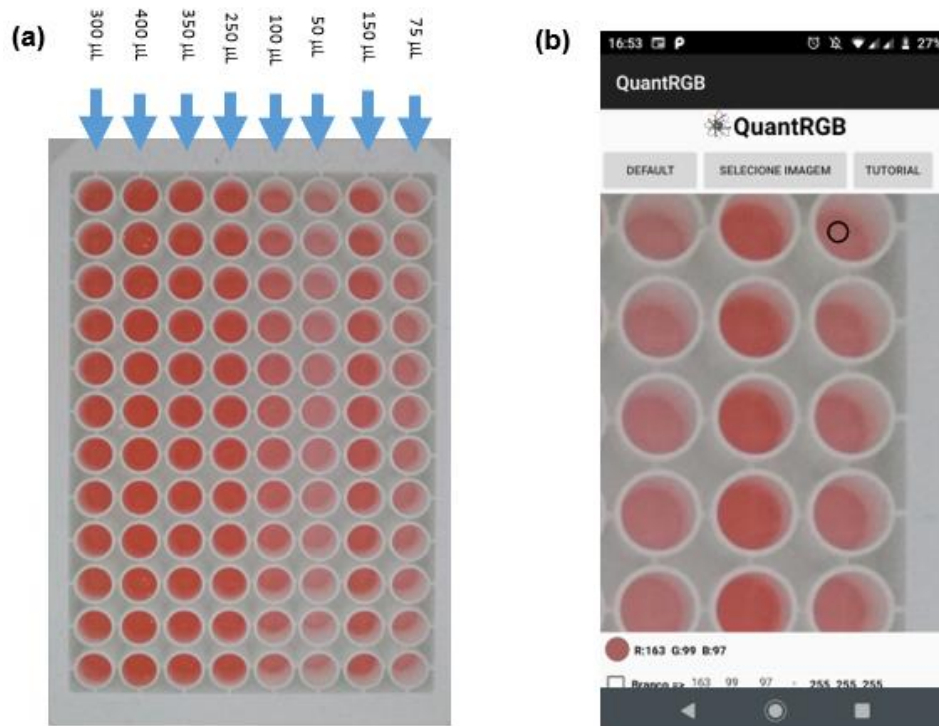
Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O coeficiente angular (inclinação da curva) que obteve maior valor foi o da curva analítica utilizando o volume de 350,0 μL (0,0442), variando pouco em relação ao coeficiente da curva de 300,0 μL (0,0428). Portanto, o volume final escolhido para a aplicação nas amostras de leite foi de 350,0 μL .

4.2.2.2. SISTEMA II

Como as placas de 96 poços utilizadas nos Sistemas I e II são do mesmo tipo, o procedimento para a avaliação do melhor volume foi similar. No Sistema II não houve problemas com a formação de sombras (Figura 31(a)), mas variando os volumes houve uma pequena distorção do volume do corante vermelho, como indicado na coluna A da Figura 32 (b).

Figura 32. (a) Foto da placa de 96 poços adquirida via câmera do smartphone na resolução de 13 MP (4:3) variando os volumes de 75,0 a 400,0 μL distribuídos ao longo das colunas A à H. (b) Tela do aplicativo QuantRGB utilizado no tratamento das imagens do Sistema II



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

As médias e os desvios das intensidades da variável G foram representados na Tabela 18, nas quais em cada coluna, o volume foi variado de forma aleatorizada, de 50,0 a 400,0 μL (Figura 32(a)).

Tabela 18. Resultado das médias das intensidades da variável G e desvios, quando o volume nas colunas de A à H da placa de 96 poços foi de 50,0 a 400,0 μL .

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
73,50 \pm 0,71	68,00 \pm 1,41	67,50 \pm 2,12	68,50 \pm 0,71	86,50 \pm 0,71	102,00 \pm 0,00	77,50 \pm 0,71	96,00 \pm 1,41	1
72,50 \pm 2,12	73,00 \pm 1,41	67,50 \pm 0,71	69,50 \pm 0,71	86,50 \pm 0,71	107,00 \pm 1,41	79,50 \pm 0,71	98,50 \pm 0,71	2
70,00 \pm 0,00	65,50 \pm 0,71	63,50 \pm 0,71	69,00 \pm 0,00	86,00 \pm 0,00	107,50 \pm 0,71	81,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	3
72,00 \pm 0,00	67,00 \pm 0,00	65,00 \pm 0,00	70,00 \pm 1,41	87,50 \pm 0,71	110,50 \pm 2,12	83,50 \pm 0,71	104,00 \pm 0,00	4
74,50 \pm 0,71	70,00 \pm 0,00	66,50 \pm 0,71	71,00 \pm 0,00	91,50 \pm 0,71	111,00 \pm 0,00	84,00 \pm 0,00	103,50 \pm 0,71	5
75,50 \pm 0,71	69,00 \pm 0,00	68,50 \pm 0,71	70,50 \pm 0,71	92,50 \pm 0,71	112,00 \pm 0,00	85,50 \pm 0,71	105,00 \pm 0,00	6
73,50 \pm 0,71	72,50 \pm 2,12	70,00 \pm 0,00	73,50 \pm 0,71	92,00 \pm 0,00	112,00 \pm 0,00	87,00 \pm 0,00	104,50 \pm 0,71	7
74,50 \pm 0,71	70,00 \pm 0,00	71,00 \pm 0,00	75,00 \pm 0,00	93,00 \pm 1,41	113,00 \pm 0,00	90,50 \pm 0,71	108,50 \pm 0,71	8
70,00 \pm 1,41	72,00 \pm 0,00	72,50 \pm 0,71	76,50 \pm 0,71	94,00 \pm 0,00	112,00 \pm 0,00	89,50 \pm 2,12	107,50 \pm 0,71	9
69,00 \pm 1,41	77,50 \pm 0,71	76,00 \pm 0,00	76,50 \pm 2,12	93,00 \pm 0,00	113,00 \pm 0,00	88,00 \pm 0,00	105,00 \pm 0,00	10
72,50 \pm 0,00	73,00 \pm 0,00	77,50 \pm 0,71	79,00 \pm 0,00	92,50 \pm 0,71	111,50 \pm 0,71	91,00 \pm 1,41	102,00 \pm 0,00	11
74,50 \pm 0,71	71,00 \pm 0,00	73,00 \pm 0,00	78,00 \pm 1,41	98,50 \pm 0,71	113,00 \pm 0,00	87,50 \pm 0,71	106,00 \pm 0,00	12

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Houve variação das intensidades médias da variável G em função dos volumes, que diferiram entre si em nível de confiança de 5,0% (valor- $p < 0,05$), confirmada pelo valor de $F_{calculado} (227,58) < F_{crítico} (2,12)$ (Tabela 19).

Tabela 19. ANOVA comparando os diferentes volumes amostrais para o Sistema II

Volumes (μL)	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)			
A – 75,0	103,38 ^d	3,68	3,56			
B – 150,0	85,38 ^b	4,00	4,69			
C – 50,0	110,38 ^e	3,30	2,99			
D – 100,0	91,13 ^c	3,77	4,14			
E – 250,0	73,08 ^a	1,20	1,64			
F – 350,0	69,88 ^a	2,29	3,28			
G – 400,0	70,71 ^a	3,22	4,55			
H – 300,0	72,67 ^a	2,08	2,86			
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre os volumes	20938,36	7	2991,19	227,58	1,6E-53	2,12
Dentro dos grupos	1156,625	88	13,14			

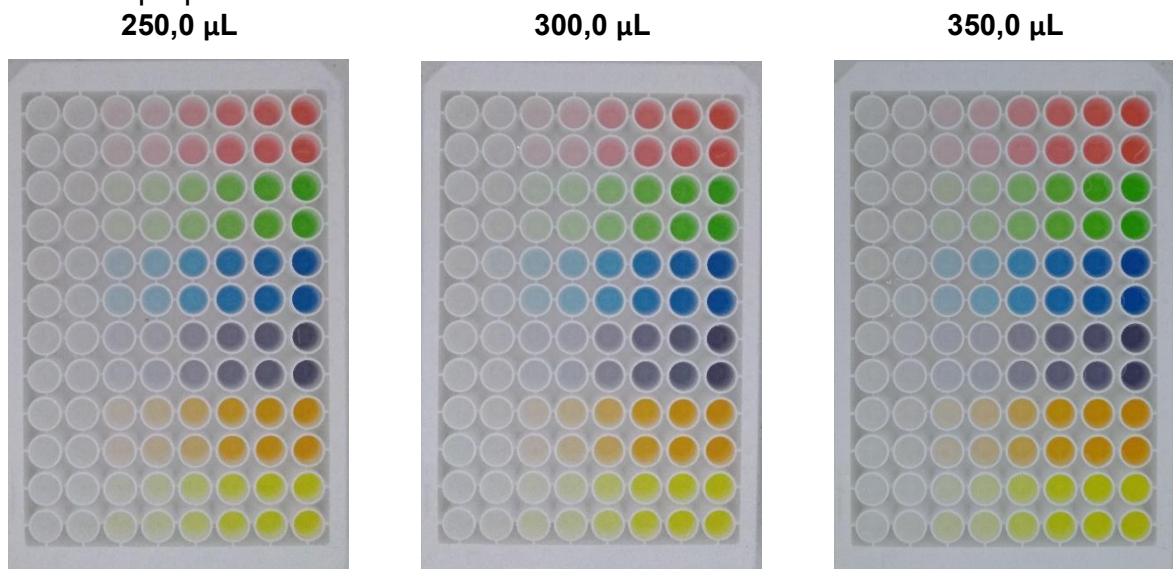
SQ: Soma Quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: Média Quadrática; F: MQ^2/MQ^2 ; Valor-P: 0,05;

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O teste de *Tukey* indicou que não houve diferença significativa (5,0 %) entre as médias das intensidades de sinal quando empregado o Sistema I para os volumes de 400,0; 350,0; 300,0 e 250,0 μL (coluna G, F, H e E) representados pela letra “a” sobrescrita na Tabela 18. Conforme as demais médias da variável *G* iam se distanciando da média do grupo “a”, foram sendo marcadas como “b” – 150,0 μL , “c” – 100,0 μL , “d” – 75,0 μL e “e” – 50,0 μL , tendo diferenças significativas em nível de 5% de confiança.

Fazendo semelhante consideração em relação ao Sistema I sobre o volume máximo do poço, o volume 400 μL não foi utilizado na curva analítica. Assim, o melhor volume foi escolhido pelos maiores valores de sensibilidade referentes aos coeficientes angulares das curvas analíticas empregando os volumes de 250,0; 300,0 e 350,0 μL (Figura 33) dos corantes nas concentrações de 0,0 a 10,0 mg L^{-1} .

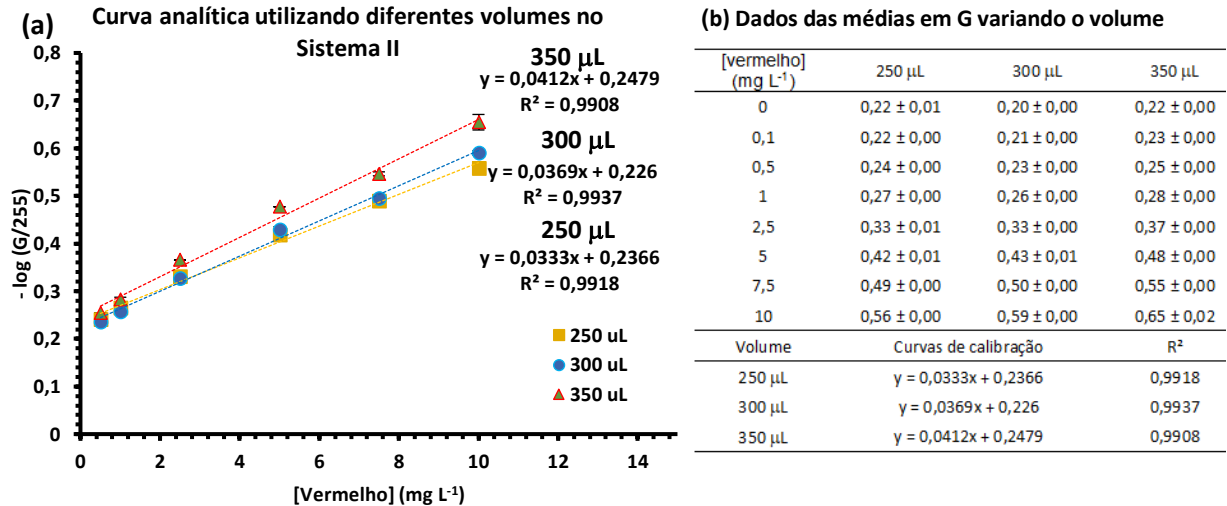
Figura 33. Fotos das placas com os 6 corantes estudados variando-se as concentrações de 0,0 a 10,0 mg L^{-1} (conforme planejamento da Tabela 2 – 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0) em volumes fixos de 250,0; 300,0; e 350,0 μL , adquiridas com qualidade de 13 MP (4: 3) e intensidade baixa (1,10 W) da potência dos LEDs pelo Sistema II proposto



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Com base no maior coeficiente angular apresentado pelas curvas analíticas para a variável *G* ($-\log(G/255)$) normalizada em função da concentração do corante vermelho (Figura 34), selecionou-se o volume amostral ideal a ser utilizado no Sistema II.

Figura 34. (a) Avaliação do volume ideal a ser utilizado no Sistema II considerando os maiores coeficientes angulares das curvas analíticas do corante vermelho (0,5 a 10,0 mg L⁻¹) para diferentes volumes amostrais (250,0; 300,0 e 350,0 µL). (b) Resultados das médias das intensidades da variável G normalizada com as respectivas Equações da reta



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O maior coeficiente angular foi obtido na curva analítica empregando o volume de 350,0 µL (0,0412), indicando maior sensibilidade para este volume e diferenciando-o dos demais coeficiente de inclinação para os volumes de 300,0 µL (0,0369) e 250,0 µL (0,0333). Portanto, o volume final escolhido para aplicação nas amostras de leite foi de 350,0 µL para o Sistema II.

4.2.2.3. SISTEMA III

Os resultados para avaliar à melhor resposta de intensidade de sinal para a variável G em função do volume amostral ideal a ser usado no Sistema III proposto estão apresentados na Tabela 20. Foram utilizados para as medidas 10 tubos de vidro, sendo feitas 10 leituras ($n = 10$) para cada tubo, tendo sido variados os volumes de 0,0 a 10,0 mL, tanto para o branco analítico (água ultrapura), como para a solução do corante vermelho, recém calibrado com corante branco e preto, fixando-se em 20% da frequência do sensor.

Tabela 20. ANOVA dos resultados das médias das intensidades e desvios padrão dos tubos utilizados no Sistema III no estudo de variação de volume de 0,0 a 10,0 mL, lidos dez vez (n=10) com solução do corante vermelho (10,0 mg L⁻¹) e água ultrapura (branco analítico), recém calibrado com corante branco e preto em frequência fixa de 20%

Volume (mL)	R	G	B	Cor	Volume (mL)	R	G	B	Cor
*Branco Analítico	255 ± 0	255 ^a ± 0	255 ± 0		5,50	250 ± 0	184 ^g ± 0	187 ± 0	
0,00	255 ± 0	255 ^a ± 0	255 ± 0		6,00	250 ± 0	184 ^g ± 0	187 ± 0	
0,50	255 ± 0	250 ^a ± 3	251 ± 0		6,50	252 ± 2	184 ^g ± 0	190 ± 8	
1,00	255 ± 0	234 ^a ± 2	240 ± 8		7,00	250 ± 0	184 ^g ± 0	187 ± 0	
1,50	255 ± 0	222 ^b ± 2	226 ± 0		7,50	250 ± 0	184 ^g ± 0	188 ± 2	
2,00	255 ± 0	206 ^c ± 2	209 ± 0		8,00	250 ± 0	189 ^{f,g} ± 10	187 ± 0	
2,50	255 ± 0	197 ^d ± 2	203 ± 8		8,50	251 ± 2	184 ^g ± 0	192 ± 11	
3,00	255 ± 0	194 ^{e,f} ± 2	196 ± 0		9,00	251 ± 2	184 ^g ± 0	187 ± 0	
3,50	255 ± 0	188 ^{f,g} ± 0	192 ± 0		9,50	250 ± 0	184 ^g ± 0	192 ± 11	
4,00	253 ± 3	187 ^g ± 2	196 ± 14		10,00	250 ± 0	186 ^g ± 8	192 ± 11	
4,50	252 ± 2	187 ^g ± 5	187 ± 0		**BRANCO	253 ± 3	253 ^a ± 6	251 ± 10	
5,00	252 ± 2	185 ^g ± 2	187 ± 0		**PRETO	2 ± 3	2 ^h ± 6	4 ± 10	
<i>Fonte da variação</i>		<i>SQ</i>	<i>gl</i>		<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Entre os volumes		537274,0	23,0		23359,7	1856,9	1,9E-234	1,58	
Dentro dos grupos		2717,2	216,0		12,6				

SQ: Soma Quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: Média Quadrática; F:MQ²/MQ²; Valor-P: 0,05;

**Branco analítico do corante - água ultrapura com 10,0 mL.*

***BRANCO – corante branco utilizado na calibração da frequência do sensor com 10,0 mL.*

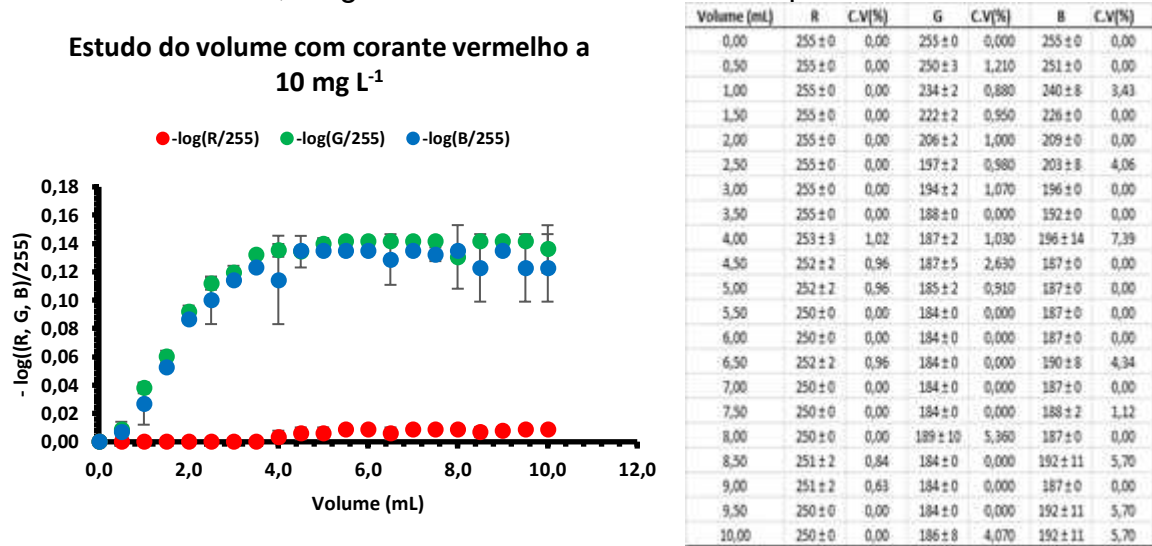
***PRETO – corante preto utilizado na calibração da frequência do sensor com 10,0 mL.*

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

A ANOVA indicou que houve diferença significativa (5,0 %) entre as médias das intensidades de sinal G, no estudo do volume amostral ($F_{\text{calculado}} (1856,9) > F_{\text{crítico}} (1,58)$), reforçado pelo valor-p ($p < 0,05$). O teste de *Tukey* evidenciou que não houve diferença entre as médias dos grupos dos tubos vazios (0,0 mL), com 0,5 mL de corante vermelho a 10,0 mg L⁻¹ e com 10,0 mL água ultrapura (branco analítico), não diferenciando-se também, da média do tubo com 10,0 mL de corante branco (letra “a”). As maiores diferenças das médias de G foram observadas em volumes de 1,0 a 3,5 mL (“b”, “c”, “d”, “e” e “f”), dado justificado pela posição da altura do sensor que detecta a quantidade de luz refletida pelos 4 LEDs do Sistema III. A partir do volume de 4,0 a 10,0 mL, as médias de G não diferenciaram significativamente em nível de 5,0 % entre si, representado pela letra “g” de forma sobrescrita na Tabela 19.

No gráfico da Figura 35, pode ser observado melhor a variação dos sinais R, G e B, que foram normalizados por 255 e logaritmizados para o estudo da variação do volume amostral.

Figura 35. Gráfico do o sinal R, G e B no estudo do melhor volume do Sistema III com corante vermelho a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e os calibrantes branco e preto utilizados



CV- Coeficiente de Variação

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

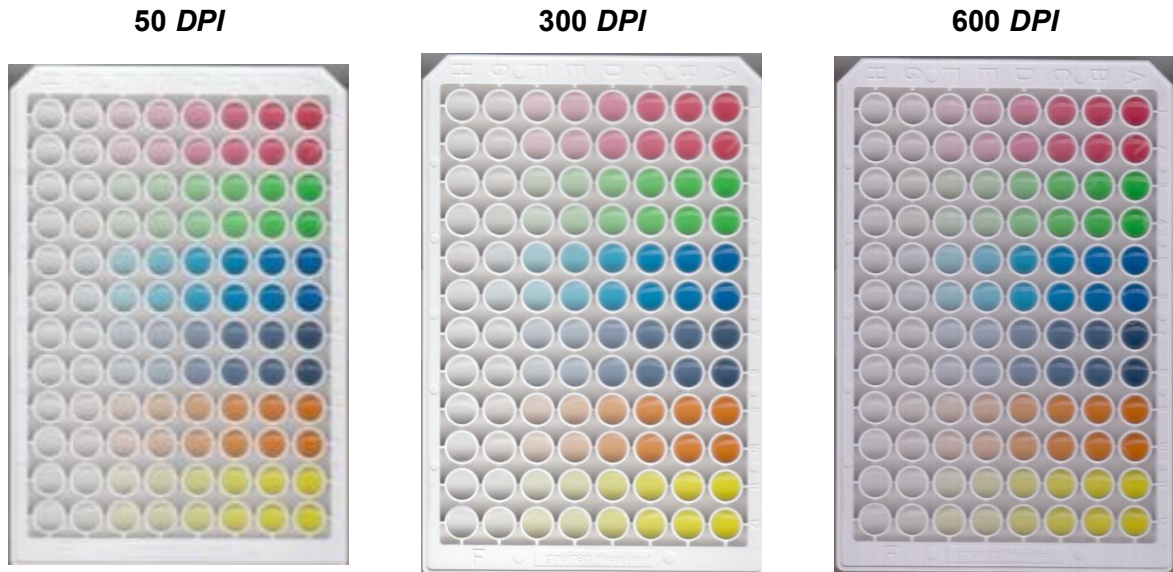
O estudo do volume amostral indicou-se que o volume mínimo para uma análise nos tubos utilizados é de 4,0 mL, podendo ser variado até 10,0 mL. Apesar do volume mínimo amostral ser de 4,0 mL, o mesmo apresentou baixa precisão, representado pelo coeficiente de variação ($CV > 5,0\%$) da tabela da Figura 35. Portanto o volume amostral utilizado para a calibração do sistema e aplicação em amostras de leite cru foi de 5,0 mL.

4.2.3. RESOLUÇÃO, QUALIDADE (DENSIDADE) E FREQUÊNCIA

4.2.3.1. SISTEMA I

A resolução do *scanner* de mesa portátil foi testada em três níveis de resolução: 50, 300 e 600 *DPI*, em que os seis corantes foram utilizados variando-se de 0,0 a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 36).

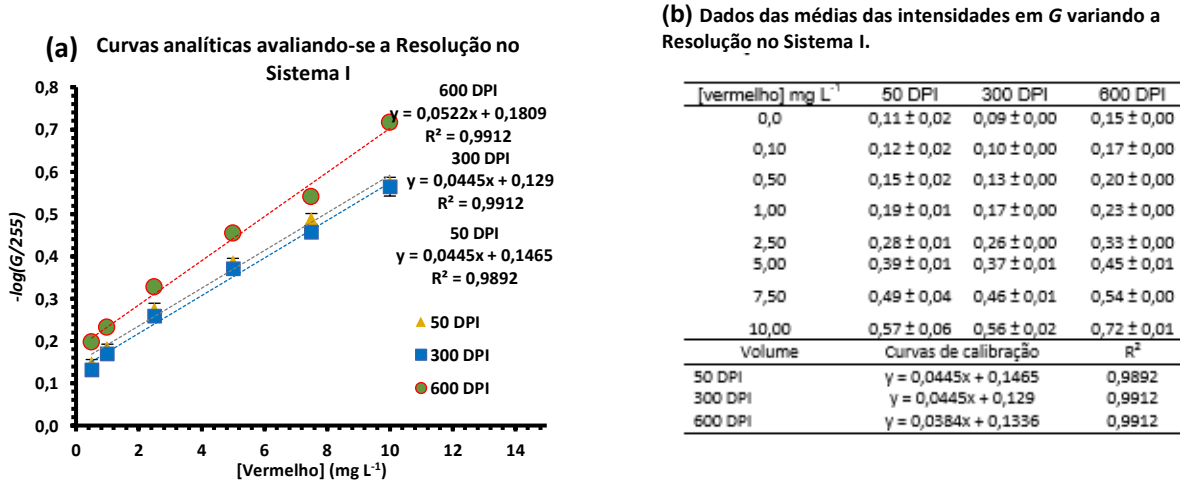
Figura 36. Imagens escaneadas das microplacas contendo os 6 corantes estudados variando-se a concentração de 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg L⁻¹ (conforme planejamento da Tabela 2) nas resoluções de 50, 300 e 600 DPI utilizando o Sistema I



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

As curvas analíticas para a variável G ($-\log(G/255)$) em função da concentração do corante vermelho dos escaneamentos em resolução de: 50, 300 e 600 DPI estão apresentadas na Figura 35. Estes parâmetros foram selecionados, considerando que 60 DPI é a resolução mínima, 300 DPI é a resolução padrão (*default*) do *software* do *scanner* e 600 DPI é a máxima resolução em que o *scanner* pode ser utilizado.

Figura 37. Avaliação da resposta das intensidades de sinal médias de $-\log(G/255)$ em função da variação das resoluções de 50, 300 e 600 DPI utilizando o Sistema I pela inclinação das curvas analíticas do corante nas concentrações de 0,0 a 10,0 mg L⁻¹



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

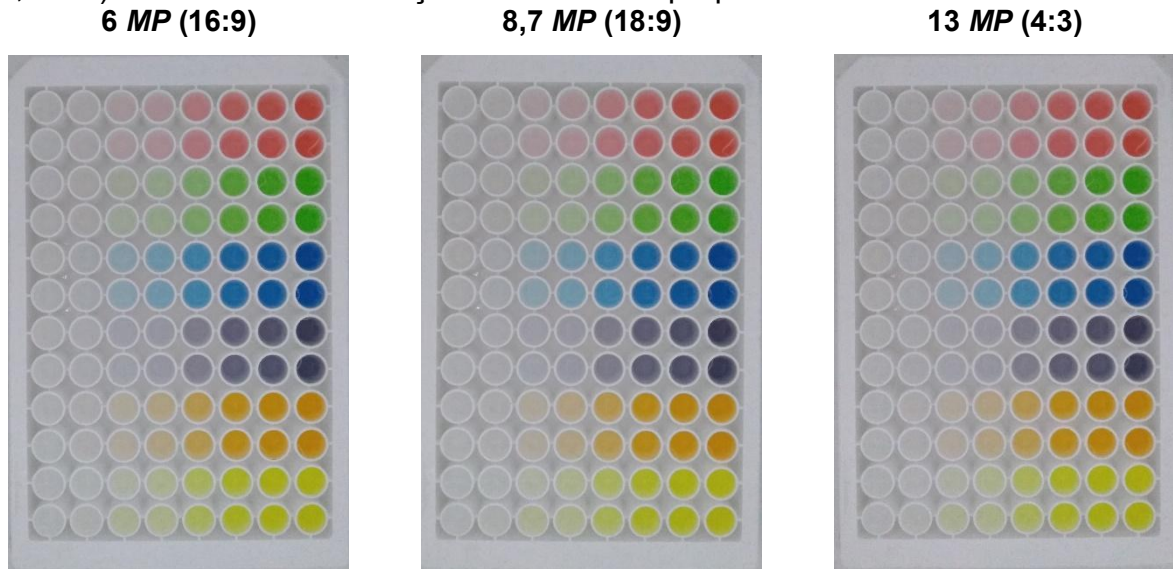
O coeficiente angular que obteve maior valor utilizando o Sistema I foi o da curva analítica na resolução de 600 *DPI* (0,0522), indicando maior sensibilidade para identificar variações nas intensidades médias de *G* em função da concentração de corante vermelho, comparado às imagens em 300 e 50 *DPI*, que apresentaram coeficientes iguais a 0,0445.

Apesar de a imagem de 600 *DPI* indicar que foi mais eficaz na diferenciação da concentração vermelha, tem-se que ressaltar que ao realizar os escaneamentos, notou-se que o tempo de escaneamento total pelo *scanner* em resolução de 600 *DPI* (máxima resolução desse modelo) foi de aproximadamente 50 s, maior que os tempos em 50 e 300 *DPI*, que foram ambos de 28 s. Para os estudos dos corantes, o intervalo de tempo é pouco relevante, pois o corante manteve-se constante após as diluições, como indica a precisão das curvas anteriores. Entretanto, nos casos de reações colorimétricas que apresentam cinética rápida, o intervalo de tempo da aquisição, pode ser um fator importante.

4.2.3.2. SISTEMA II

Para o Sistema II a resolução foi variada pelas câmeras digitais do *smartphone* que adquiriu as fotos com qualidade de 6 *MP* (16:9), 8,7 *MP* (18:9) e 13 *MP* (4:3) das placas de 96 poços com os corantes variando de 0,0 a 10,0 mg⁻¹, aqui representado em dimensões relativas para uma melhor visualização (Figura 38).

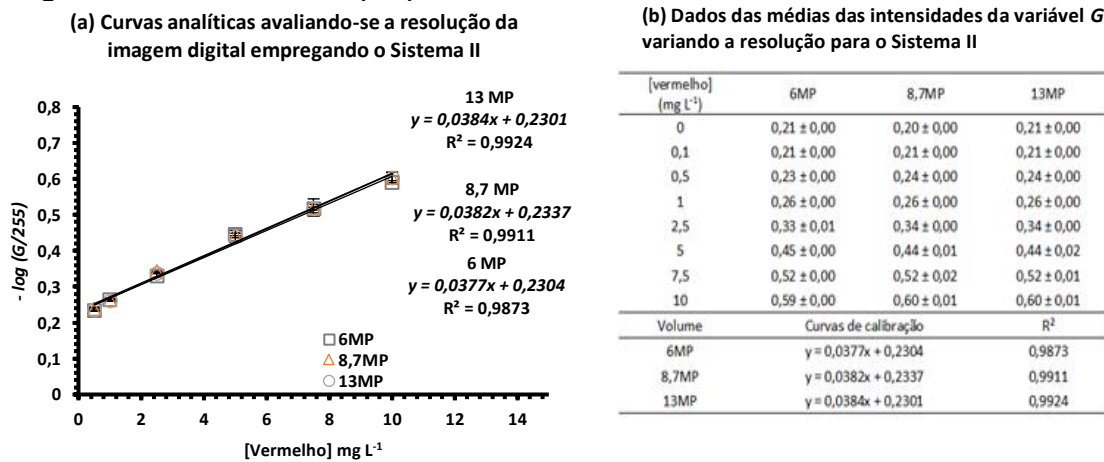
Figura 38. Fotos das placas das curvas analíticas dos 6 corantes variando sua concentração de 0,0 a 10,0 mg L⁻¹(conforme planejamento da Tabela 2), tiradas com qualidade variando de 6, 8 e 13 MP, empregando a intensidade baixa de potência (1,10 W) dos LEDs na iluminação do Sistema II proposto



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Os dados das curvas de calibração para a variável G ($-\log(G/255)$) em função da concentração do corante vermelho estão apresentados na Figura 39. A qualidade das fotos foi definida por meio do coeficiente angular das curvas analíticas.

Figura 39. Curvas analíticas do corante vermelho variando de 0,0 a 10,0 mg L⁻¹ avaliando-se a qualidade das imagens em diferentes resoluções: 6; 8,7 e 13 MP empregando-se o Sistema II proposto



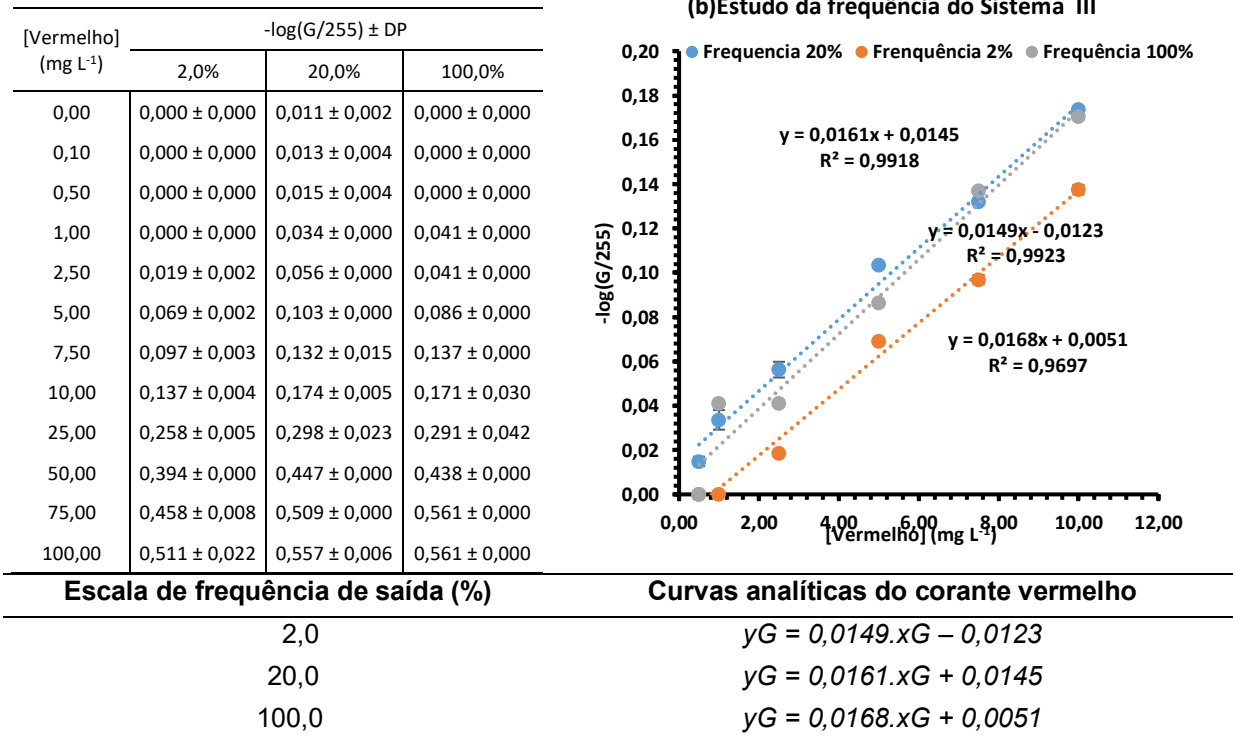
Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O coeficiente angular que teve maior valor para a variável *G* foi o da curva analítica adquirida na qualidade de 13 *MP* (0,0384) (Figura 39), diferenciando-se pouco das fotos com qualidade 8,7 (0,0382) e 6 *MP* (0,0377). Esta pequena variação, pode ser justificada considerando-se que a resolução e a qualidade de uma imagem representam conceitos dependentes, mas são distintos, como mencionado anteriormente, em que a qualidade está atrelada somente o tamanho do *pixel*, enquanto a resolução se refere a quantidade de *pixel* que regulam o tamanho de uma imagem digital. Portanto, a qualidade ou densidade das fotos adquiridas na aplicação da amostra foram em 13 *MP*, pré-setado como valor *default*, sendo o máximo de resolução da câmera do *smartphone* utilizado.

4.2.3.3. SISTEMA III

No Sistema III, a aquisição de dados foi avaliada alterando-se três níveis de frequência possíveis dados pelos pinos *S0* e *S1* do sensor fotoelétrico TCS230 obtido via porta digital, variando-se 2,0, 20,0 e 100,0 %, como indicado na Figura 40.

Figura 40. Curvas analíticas do corante vermelho variando de 0,0 a 10,0 mg L⁻¹ avaliando-se a qualidade em relação a melhor frequência de conversão dos dados do sensor TSC230 do Sistema III



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O sensor mostrou-se com maior sensibilidade (coeficiente angular) em 100% de frequência de conversão do sinal, com valor de 0,0168. Entretanto, o sinal nesta frequência mostrou baixa precisão em baixas concentrações, sofrendo maior interferência nesta faixa. Por este motivo, a frequência escolhida para a calibração e aplicação amostral foi de 20%, cujo coeficiente angular foi de 0,0161 apresentando adequada precisão em baixas concentrações.

4.3. CALIBRAÇÃO DOS SISTEMAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

A Tabela 21 apresenta as condições selecionadas, para cada um dos parâmetros instrumentais estudados nos 3 Sistemas desenvolvidos, utilizando o corante vermelho como referência.

Tabela 21. Resumos dos parâmetros adotados após a otimização das condições experimentais analíticas nos Sistemas I, II e III propostos

Parâmetros instrumentais	Sistema I	Sistema II	Sistema III
Iluminação	Barra de LEDs	30 LEDs (1,10 W)	4 LEDs
Volume amostral	350,0 µL	350,0 µL	5,0 mL
Resolução/Qualidade/Frequência	300 DPI	13 MP	20,0%

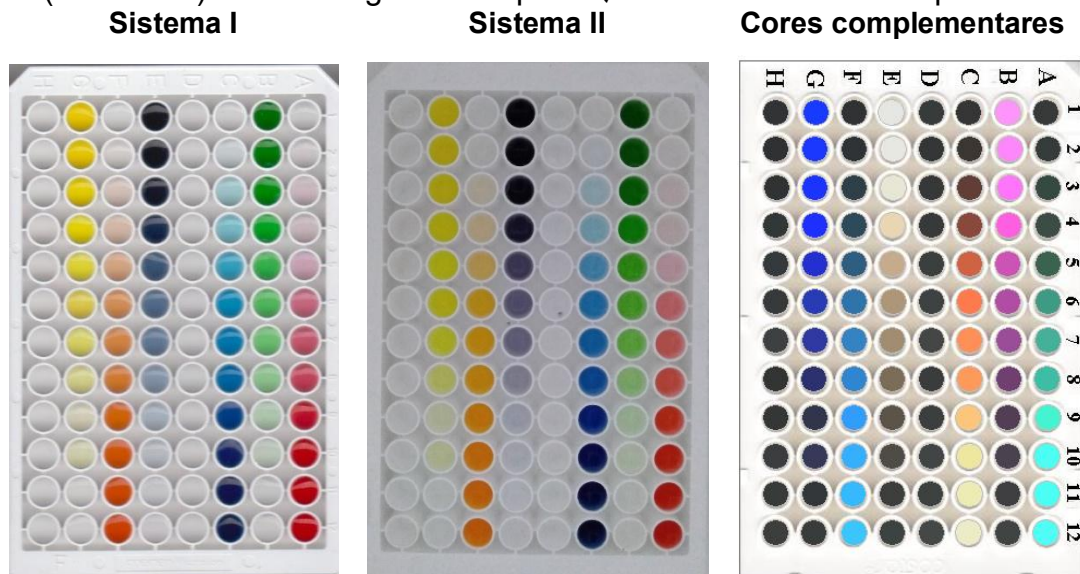
Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Após a padronização dos parâmetros instrumentais dos Sistemas I, II e III propostos com os 6 corantes alimentícios, foram adquiridos os dados e as imagens para os três Sistemas nas condições descritas na Tabela 21.

4.3.1. ESTUDO DA LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO

As imagens digitais adquiridas dos Sistemas I e II estão apresentadas na Figura 41, nas quais foram variadas as concentrações dos corantes de 0,00 a 100,00 mg L⁻¹ realizadas em triplicata nas placas de 96 poços, com o objetivo de se determinar a linearidade e a faixa de trabalho para cada corante.

Figura 41. Imagens digitais das placas com os 6 corantes estudados variando-se a concentração de 0,00 a 100,00 mg L⁻¹ (n=3) (conforme planejamento da Tabela 4), adquiridas na qualidade de 300 DPI (Sistema I), 13 MP e na intensidade dos LEDs 1,10 W (Sistema II) e uma imagem dada pelo *QuantColour* da cor complementar



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Os dados das médias das intensidades refletidas em *R*, *G* e *B* utilizando-se o Sistema III estão apresentados na Tabela 22, do modo em que aparecem no *MS Excel 2019*.

Tabela 22. Intensidade média de dez leituras feitas em triplicata das cores refletidas em *R*, *G* e *B* utilizando-se o Sistema III a frequência de 20% e volume de 5,0 mL de corantes variando as concentrações de 0,00 a 100,00 mg L⁻¹

Corante	mg L ⁻¹	R	G	B	Cor	Corante	mg L ⁻¹	R	G	B	Cor
Vermelho	0,00	250	248	247		Violeta	0,00	251	250	247	
	0,10	248	247	243			0,10	246	245	245	
	0,50	250	246	246			0,50	236	235	236	
	1,00	246	236	239			1,00	234	238	237	
	2,50	246	224	223			2,50	226	225	230	
	5,00	242	201	201			5,00	207	206	217	
	7,50	241	188	189			7,50	196	194	208	
	10,00	242	171	178			10,00	174	168	188	
	25,00	240	128	127			25,00	126	103	134	
	50,00	234	91	90			50,00	95	56	80	
	75,00	233	79	85			75,00	81	43	56	
100,00	231	71	80		100,00	73	29	41			
Verde	0,00	251	252	251		Laranja	0,00	249	249	247	
	0,10	249	250	248			0,10	251	252	250	
	0,50	246	246	242			0,50	251	248	241	
	1,00	245	248	241			1,00	250	245	235	
	2,50	234	243	222			2,50	250	236	217	
	5,00	213	235	196			5,00	249	224	188	
	7,50	208	232	188			7,50	250	217	171	
	10,00	196	222	166			10,00	246	211	152	
	25,00	160	204	120			25,00	248	193	113	
	50,00	117	178	94			50,00	245	174	102	
	75,00	105	160	90			75,00	247	166	94	
100,00	92	138	69		100,00	247	163	90			
Azul	0,00	249	248	248		Amarelo	0,00	249	249	248	
	0,10	245	244	244			0,10	255	255	255	
	0,50	238	244	243			0,50	255	255	250	
	1,00	232	245	243			1,00	255	255	246	
	2,50	203	238	239			2,50	255	254	232	
	5,00	174	220	235			5,00	255	252	213	
	7,50	156	212	227			7,50	255	248	195	
	10,00	136	183	207			10,00	249	240	175	
	25,00	95	126	176			25,00	251	240	151	
	50,00	76	74	130			50,00	250	238	135	
	75,00	64	51	101			75,00	251	232	130	
100,00	58	40	81		100,00	245	229	125			

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

Na Tabela 23 estão os dados das médias para *R*, *G* e *B* das cores complementares de cada corante, lembrando que a cor complementar é, neste caso, a representação da cor ou faixa espectral mais absorvida pela solução de corante.

Tabela 23. Média das intensidades das cores complementares de *R*, *G* e *B* de dez leituras feitas em triplicata ($n=3$) e as respectivas cores que são absorvidas em função das concentrações de 0,00 a 100,00 mg L⁻¹

Corante	mg L ⁻¹	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>B</i>	Cor	Corante	mg L ⁻¹	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>B</i>	Cor
Vermelho	0,00	5	7	8		Violeta	0,00	6	7	7	
	0,10	8	8	12			0,10	10	11	11	
	0,50	5	9	9			0,50	17	11	12	
	1,00	9	19	16			1,00	23	11	12	
	2,50	10	31	32			2,50	52	17	16	
	5,00	14	54	54			5,00	81	35	20	
	7,50	14	67	66			7,50	99	43	28	
	10,00	13	84	77			10,00	119	72	48	
	25,00	15	127	128			25,00	160	129	79	
	50,00	21	164	165			50,00	179	181	125	
	75,00	22	176	170			75,00	191	204	154	
100,00	24	184	175	100,00	198	215	174				
Verde	0,00	5	3	4		Laranja	0,00	7	6	8	
	0,10	6	5	7			0,10	4	3	5	
	0,50	10	9	13			0,50	5	7	14	
	1,00	10	7	14			1,00	6	10	21	
	2,50	21	12	33			2,50	5	19	38	
	5,00	42	21	59			5,00	7	31	67	
	7,50	47	23	67			7,50	6	38	85	
	10,00	59	33	89			10,00	9	44	103	
	25,00	95	51	135			25,00	8	62	142	
	50,00	138	77	161			50,00	10	81	153	
	75,00	150	95	165			75,00	9	89	161	
100,00	163	118	186	100,00	9	92	165				
Azul	0,00	6	7	7		Amarelo	0,00	6	6	7	
	0,10	10	11	11			0,10	0	0	0	
	0,50	17	11	12			0,50	0	0	5	
	1,00	23	11	12			1,00	0	0	9	
	2,50	52	17	16			2,50	0	1	23	
	5,00	81	35	20			5,00	0	3	42	
	7,50	99	43	28			7,50	0	7	60	
	10,00	119	72	48			10,00	6	15	80	
	25,00	160	129	79			25,00	4	15	104	
	50,00	179	181	125			50,00	5	17	120	
	75,00	191	204	154			75,00	4	23	125	
100,00	198	215	174	100,00	10	26	130				

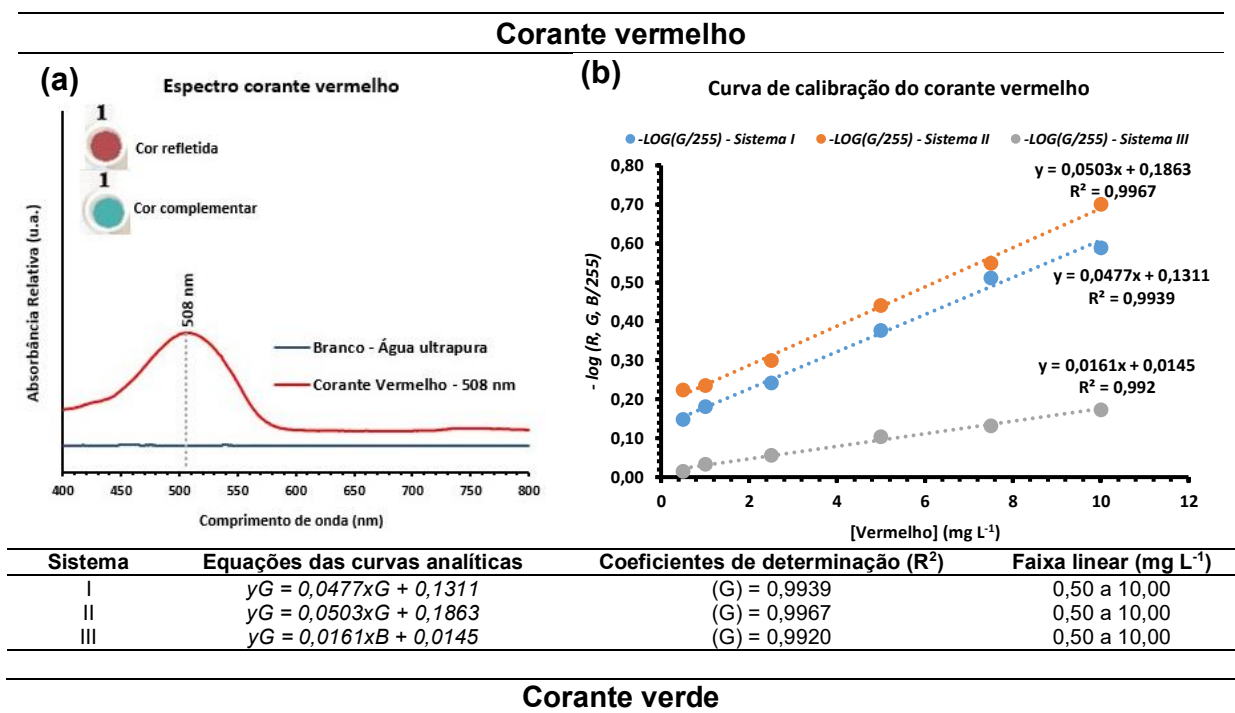
Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

As cores complementares representadas na Tabela 23 mostram a região da cor que apresentou maior absorção pelo corante. Como exemplo, podemos observar que a solução do corante amarelo, apresenta essa coloração, devido as ligações π das moléculas que as compõe, absorverem a luz branca incidente nas faixas espectrais da região do azul (Tabela 7), tendo pouca absorvidade na região do amarelo, sendo esta a cor refletida e percebida pelos nossos olhos ou detectores instrumentais.

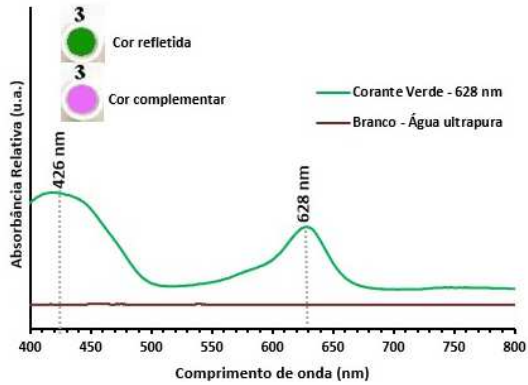
Todos os gráficos referentes ao estudo da linearidade e das suas respectivas faixas lineares de cada corante para as variáveis R , G e B estão apresentados no ANEXO I (tópico 2).

As curvas analíticas de cada corante ($-\log(R, G, B)/255$) estão contidas de forma resumida na Figura 42, juntamente com os seus respectivos espectros de absorção, indicando a capacidade de detecção de cada sensor (CCD e CMOS) de cada Sistema (I, II e III) nas faixas de cores dos corantes estudados.

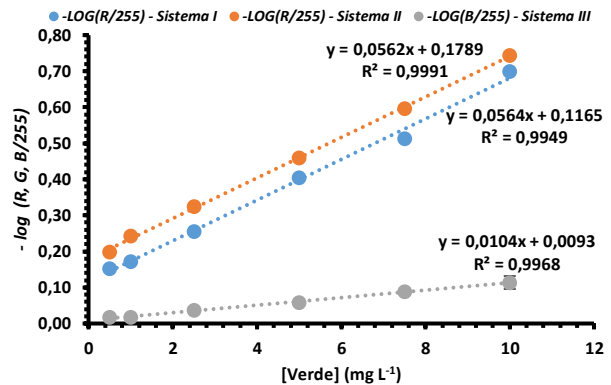
Figura 42. Espectros das cores refletidas e complementares no visível para cada um dos 6 corantes estudados. (a) Curvas analíticas apresentando a intensidade média das cores ($n=3$) pelos 3 Sistemas propostos (I, II e III) (b), com as respectivas Equações das retas, coeficientes de determinação e faixa linear de trabalho



(a) Espectro do corante verde



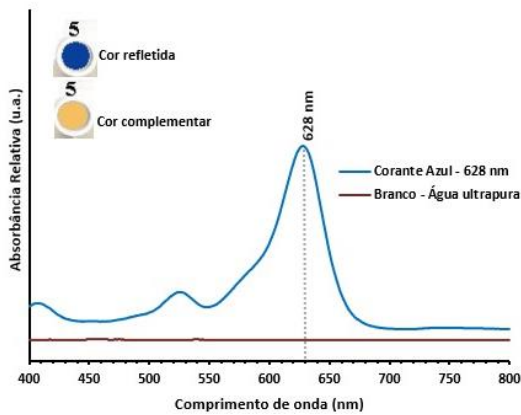
(b) Curva de calibração do corante verde



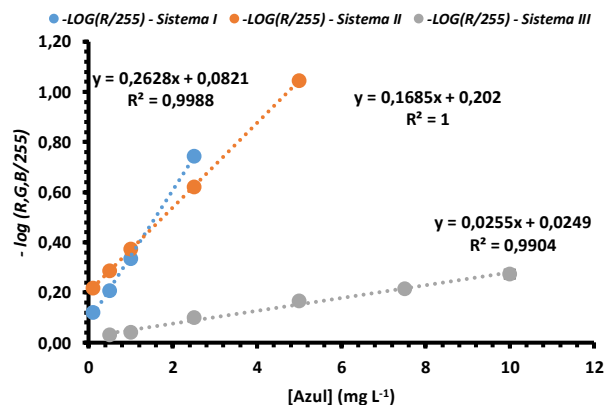
Sistema	Equações das curvas analíticas	Coefficientes de determinação (R ²)	Faixa linear (mg L ⁻¹)
I	$yR = 0,0564xR + 0,1165$	(R) = 0,9949	0,50 a 10,00
II	$yR = 0,0562xR + 0,1789$	(R) = 0,9991	0,50 a 10,00
III	$yR = 0,0104xR + 0,0093$	(R) = 0,9970	0,50 a 10,00

Corante azul

(a) Espectro do corante azul



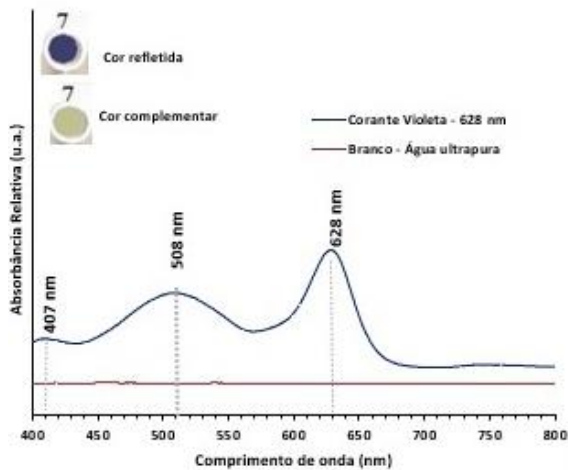
(b) Curva de calibração do corante azul



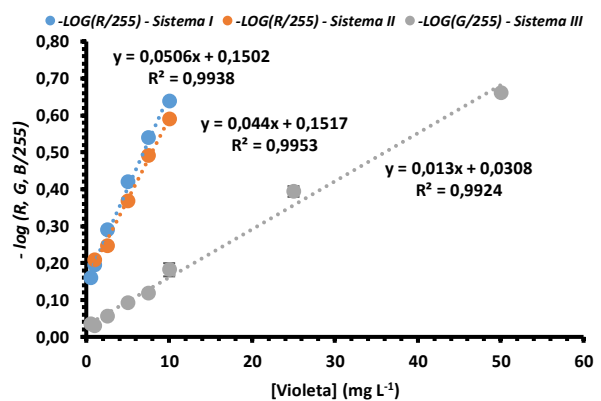
Sistema	Equações das curvas analíticas	Coefficientes de determinação (R ²)	Faixa linear (mg L ⁻¹)
I	$yR = 0,2628xR + 0,0821$	(R) = 0,9988	0,10 a 2,50
II	$yR = 0,1685xR + 0,202$	(R) = 1,0000	0,10 a 5,00
III	$yR = 0,0255xR + 0,0249$	(R) = 0,9904	0,50 a 10,0

Corante violeta

(a) Espectro do corante violeta



(b) Curva de calibração do corante violeta

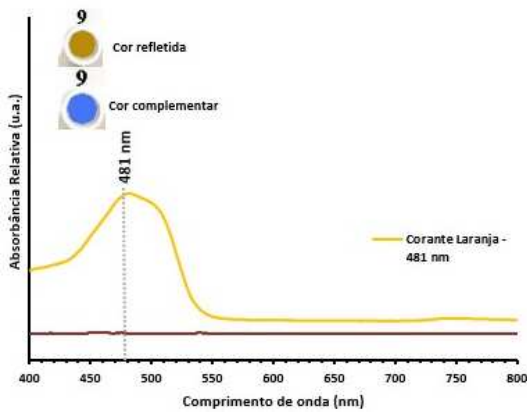


Sistema	Equações das curvas analíticas	Coefficientes de determinação (R ²)	Faixa linear (mg L ⁻¹)
I	$yR = 0,0506xR + 0,1502$	(R) = 0,9938	0,10 a 2,50
II	$yR = 0,044xR + 0,1517$	(R) = 0,9953	0,10 a 5,00
III	$yR = 0,013xR + 0,0308$	(R) = 0,9924	0,50 a 10,0

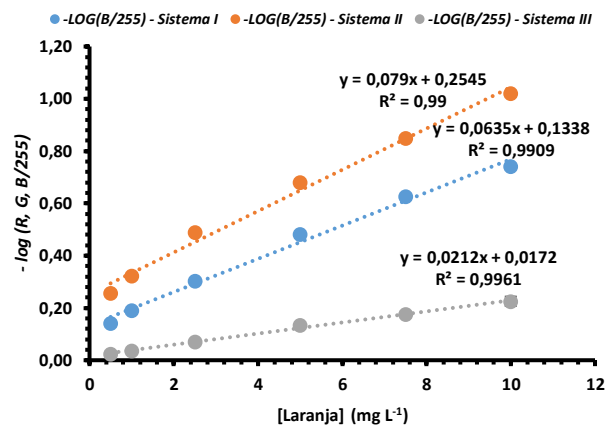
Sistema	Equações das curvas analíticas	Coefficientes de determinação (R ²)	Faixa linear (mg L ⁻¹)
I	$yR = 0,0506xR + 0,1502$	(R) = 0,9938	0,50 a 10,00
II	$yR = 0,0440xR + 0,1517$	(R) = 0,9953	0,50 a 10,00
III	$yG = 0,0130xG + 0,0308$	(G) = 0,9924	0,50 a 50,00

Corante laranja

(a) Espectro do corante laranja



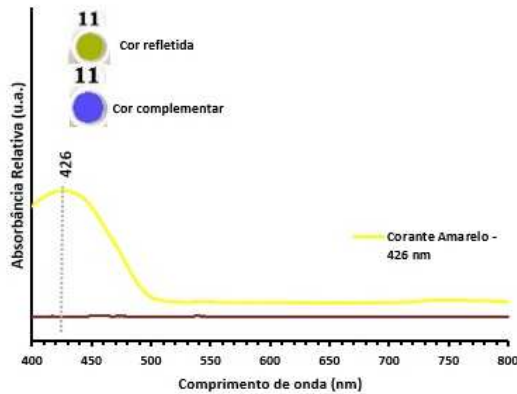
(b) Curva de calibração do corante laranja



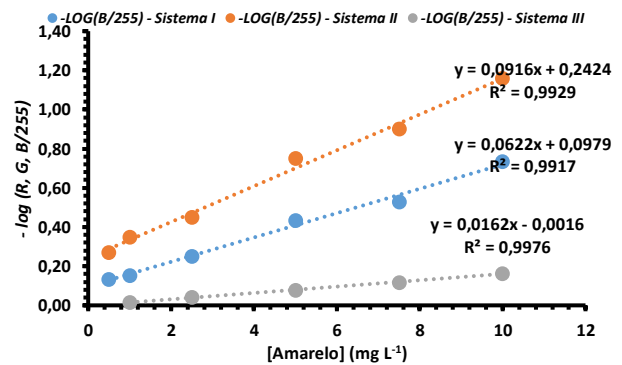
Sistema	Equações das curvas analíticas	Coefficientes de determinação (R ²)	Faixa linear (mg L ⁻¹)
I	$yB = 0,0635xB + 0,1338$	(B) = 0,9909	0,50 a 10,00
II	$yB = 0,0790xB + 0,2545$	(B) = 0,9900	0,50 a 10,00
III	$yB = 0,0212xB + 0,0172$	(B) = 0,9961	0,50 a 10,00

Corante amarelo

(a) Espectro do corante amarelo



(b) Curva de calibração do corante amarelo



Sistema	Equações das curvas analíticas	Coefficientes de determinação (R ²)	Faixa linear (mg L ⁻¹)
I	$yB = 0,0622xB + 0,0979$	(B) = 0,9917	0,50 a 10,00
II	$yB = 0,0916xB + 0,2424$	(B) = 0,9929	0,50 a 10,00
III	$yB = 0,0162xB + 0,0016$	(B) = 0,9976	1,00 a 100,00

Fonte: Próprio autor – Grupo DIA – UEL (2020).

O Sistema II apresentou maiores coeficientes angulares do que o Sistema I e III para os corantes vermelho, laranja e amarelo, indicando que o sensor CMOS do *smartphone* utilizado foi mais sensível na região do amarelo ao vermelho do espectro visível (580 a 750 nm). Já, o Sistema I mostrou resultados com coeficientes angulares maiores para os corantes verde, azul e violeta, indicando que o sensor CIS do scanner apresentou maior sensibilidade para a região do violeta ao verde (400 a 550 nm). O

Sistema III apresentou menor sensibilidade quando comparado ao Sistema I e II por apresentar menor área de detecção (8x8 pixels), porém este apresentou maiores faixas lineares que os demais Sistemas para os corantes amarelo, azul e violeta.

4.3.2. PRECISÃO E EXATIDÃO

O resultado para as 12 amostras lidas em triplicatas nos 3 Sistemas propostos está mostrado na Tabela 24. A acurácia dos Sistemas (I, II e III) foi mensurada por essas 12 amostras de corantes alimentícios, recém preparadas em níveis de concentração baixa, média e alta, lidas de forma aleatória, tendo sido ainda lidas no espectrofotômetro UV/Vis comercial em seus comprimentos de onda máximos, cuja absorbância foi calculada pelas curvas analíticas apresentadas no tópico 4.1.

Tabela 24. Acurácia avaliada pela ANOVA por comparação das respostas dadas por 12 amostras de corantes alimentícios, preparadas em concentrações nas faixas lineares de cada corante, determinadas nos 3 Sistemas I, II e III propostos e pelo espectrofotômetro UV/Vis (n=3)

Sistemas	I	II	III	UV/Vis	ANOVA	
Corante	[corante] ± DP (mg L ⁻¹)				F _{crítico} (4,07)	Valor-p (0,05)
Vermelho	0,51 ^a ± 0,03	0,50 ^a ± 0,03	0,40 ^a ± 0,16	0,50 ^a ± 0,02	1,27	0,347
	4,93 ^a ± 0,05	4,94 ^a ± 0,11	4,73 ^a ± 0,18	4,99 ^a ± 0,02	3,55	0,067
Verde	0,50 ^a ± 0,02	0,55 ^a ± 0,03	0,48 ^a ± 0,11	0,50 ^a ± 0,00	0,04	0,987
	4,97 ^a ± 0,04	4,89 ^a ± 0,05	5,23 ^a ± 0,13	5,01 ^a ± 0,02	1,57	0,271
Azul	0,49 ^a ± 0,01	0,52 ^a ± 0,02	0,57 ^a ± 0,21	0,52 ^a ± 0,01	0,30	0,823
	1,01 ^a ± 0,01	0,98 ^a ± 0,01	1,12 ^a ± 0,11	0,99 ^a ± 0,01	4,24	0,045
Violeta	10,30 ^b ± 0,09	9,94 ^b ± 0,09	10,30 ^a ± 0,11	10,01 ^a ± 0,02	15,04	1,2E-3
	4,92 ^a ± 0,10	4,91 ^a ± 0,05	5,21 ^b ± 0,09	5,02 ^{a,b} ± 0,02	10,70	3,6E-3
Laranja	2,54 ^a ± 0,03	2,46 ^a ± 0,04	2,80 ^b ± 0,10	2,49 ^a ± 0,01	25,10	2,0E-4
	10,28 ^b ± 0,10	9,77 ^a ± 0,23	9,69 ^a ± 0,20	9,99 ^{a,b} ± 0,01	6,72	0,014
Amarelo	4,93 ^a ± 0,04	5,11 ^{a,b} ± 0,06	5,55 ^b ± 0,41	5,01 ^a ± 0,01	5,39	0,025
	7,55 ^a ± 0,06	7,61 ^a ± 0,09	7,34 ^a ± 0,24	7,51 ^a ± 0,03	2,27	0,158

DP: Desvio Padrão; F_{calculado} = 4,07; valor-p = 0,05;

Fonte: Próprio autor – Grupo DIA – UEL (2021).

Analisando as médias das 12 amostras dos corantes, observou-se que não houve diferença significativa em nível de 5% das absorbâncias medidas pelo espectrofotômetro UV/Vis com relação aos resultados empregando os demais Sistemas I, II e III propostos. Entretanto, quando se compara os resultados de amostras mensuradas pelos Sistemas I, II e III, observa-se diferenças entre as médias indicadas pelo ($F_{calculado} > F_{crítico}$) e pelo valor $p < 0,05$. As médias do Sistema I divergiram do Sistema II, apenas para a concentração de 2,50 mg L⁻¹ do corante

amarelo. Com relação ao Sistema III houve divergências em dois casos, para o corante violeta na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e para o corante amarelo a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Já, as médias do Sistema II divergiram do III, para ambas as amostras do corante violeta e laranja a $2,50 \text{ mg L}^{-1}$.

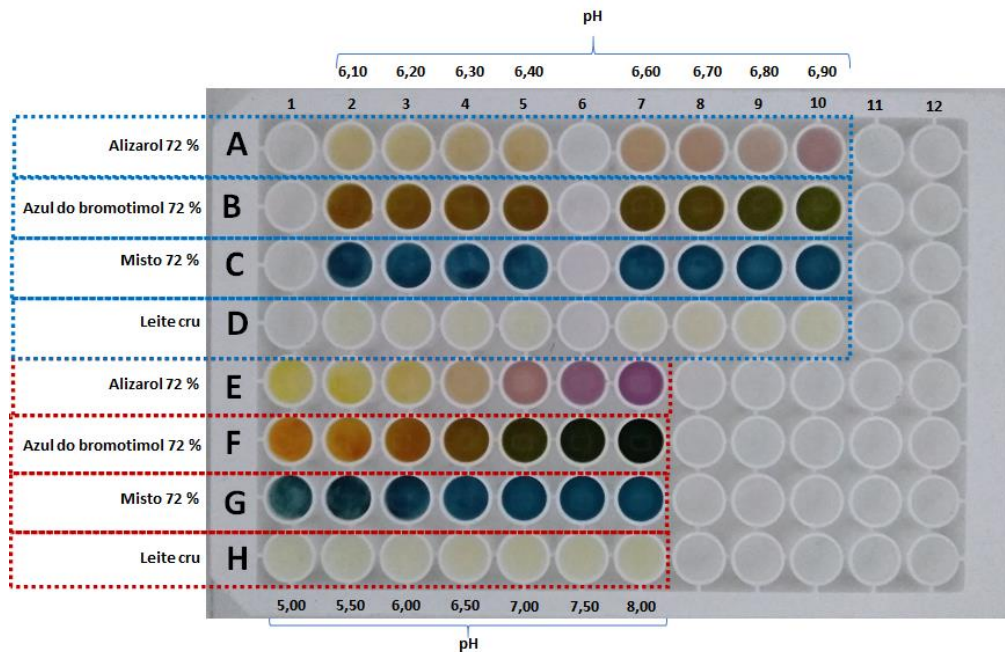
Além disso, os desvios padrão das amostras em baixas concentrações mostraram elevados coeficiente de variação (acima de 5,0%), principalmente para o Sistema III nas concentrações de 0,5 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Isso pode ser justificado pela pequena área de aquisição da luz refletiva pelo CMOS, diminuindo a quantidade de informações adquiridas da cor refletida. No entanto, para as concentrações de 5,00 e $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ empregando os demais Sistemas I, II e UV-Vis, os coeficientes de variação apresentaram-se próximos ou inferiores a 5,0%, indicando assim, precisão nas leituras nesses sistemas. Todavia, considera-se que o fato de que as médias dos resultados das 12 amostras de corantes não divergiram em relação aos resultados obtidos no espectrofotômetro UV-Vis importante, por esta ser a técnica colorimétrica de referência.

4.4. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS PROPOSTOS EM AMOSTRAS DE LEITE

4.4.1. DETERMINAÇÃO DO PH

A escolha do melhor indicador foi avaliada pela imagem feita utilizando o *smartphone* do Sistema II, mostrada na Figura 43. Nos poços de A a H foram pipetados $340,0 \mu\text{L}$ do leite cru, recém preparado com o pH variando de 5,0 a 8,0 ajustado em potenciômetro com ácido láctico e NaOH (ambos a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$), e $10,0 \mu\text{L}$ de solução indicadora a 72,0% (v/v), com exceção de D e H, em que os $10,0 \mu\text{L}$ foram de solução etanólica a 72,0% (v/v) representando o branco analítico. Nos poços A e E utilizou-se a solução indicadora de alizarina a 0,20 % (m/V) (1,2-dihidroxi-antraquinona-3-sulfonato de sódio ou vermelho de alizarina S); em B e F, azul de bromotimol; e em C e G a solução indicadora mista (vermelho de metila e verde de bromocresol).

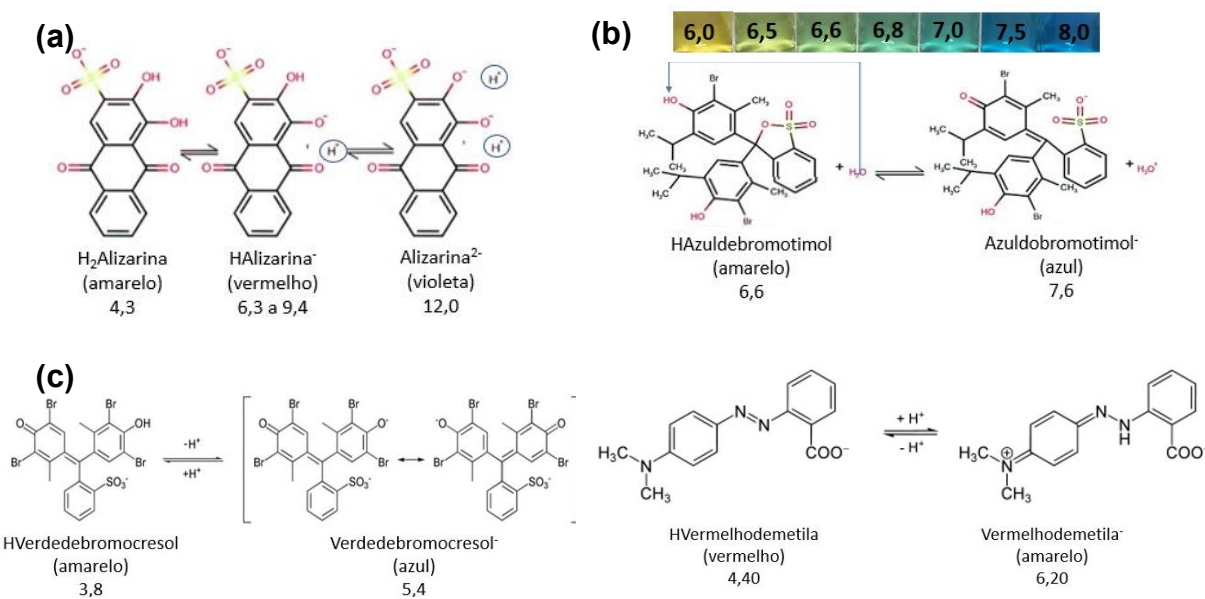
Figura 43. Imagem digital adquirida pelo smartphone no Sistema II dos indicadores testados, utilizando-se 340,0 μL de amostra de leite cru com 10,0 μL de diversos indicadores a 72 % (v/v) em diferentes pHs de 5,00 a 8,00 (intervalos de 0,10 e 0,50)



Fonte: Próprio autor – Grupo DIA – UEL (2021).

O indicador que mostrou melhor diferenciação visual para a faixa de 6,5 a 7,0, que inclui a faixa do pH de um leite fluido fresco entre 6,6 a 6,8 (IN 77, BRASIL, 2018), foi o alizarol ou alizarina (vermelho de alizarina S), comumente utilizado. A alizarina (vermelho de alizarina S), apresenta uma estrutura com dois prótons ionizáveis, com dois pK_a , o primeiro em 5,82 e o segundo em 10,78. A forma protonada de sua estrutura ($\text{H}_2\text{alizerina}$) apresenta cor amarela em pH abaixo de 6,5 (início dos poços A e E). A partir do pH de 6,6 até 7,0 a cor vai tornando-se rosada tendendo para o violeta, indicando a desprotonação da alizarina (Halizerina^- e alizerina^{2-}). A cor do indicador em água ultrapura em pH acima de 6,5 é ligeiramente avermelhado (Halizerina^-), intensificando-se em pHs mais elevados e, quando há formação da espécie desprotonada (alizerina^{2-}), a cor torna-se violeta (Figura 41). No leite cru, a cor violeta apareceu em pH acima de 7,0 ao final da fileira A, confirmado na fileira E, como indicado na Figura 44.

Figura 44. Reação dos indicadores (a) alizarina, (b) azul de bromotimol, (c) misto (verde de bromocresol e vermelho de metila) de meio ácido para um meio básico (pH de 5,0 a 8,0)



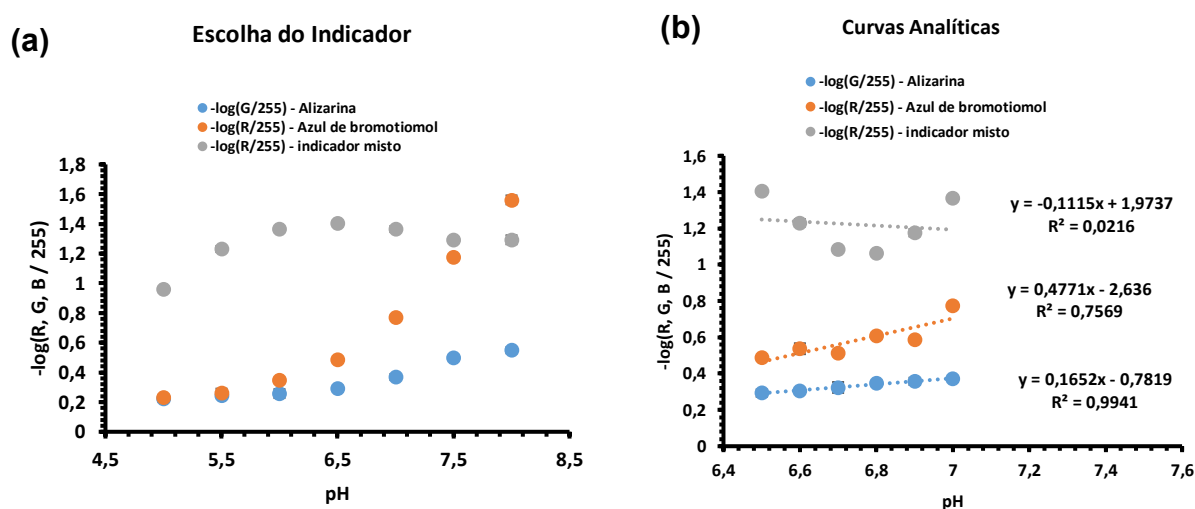
A imagem digital para o azul de bromotimol fileiras B e F (Fig. 42), poderia ser outra alternativa, uma vez que o seu pK_a é de 7,1 e a faixa de transição do pH está entre 6,2 a 7,6, mesmo não havendo tanta diferença visual, como nota-se na Figura 43 fileira B no pH de 6,5 a 7,0 a diferenciação é difícil como para a alizarina (SABNIS, 2007). A escolha deste indicador consistiu no fato do azul de bromotimol apresentar variação de cor em água quando o pH do meio varia de 6,0 a 8,0 (Figura 44 (b)). Quando o pH do leite está abaixo de 6,0 o leite vai ficando alaranjado, devido a presença da espécie protonada (HAzuldebromotimol) e em pH acima de 6,0, o leite acaba tendo tonalidades de azul escuro (Azuldebromotimol⁻).

Já o indicador misto, localizado nas fileiras C e G (Fig. 43), composto por verde de bromocresol de pK_a 4,66 e vermelho de metila com pK_a 5,05 (SABNIS, 2007), tendo faixas de transição de 3,8 a 5,4 e 4,4 a 6,2, respectivamente, não apresentou tanta diferenciação de cor, mantendo-se sempre esverdeado. Esta cor se deve ao fato do indicador verde de bromocresol apresentar coloração azul em pH acima de 5,4 (Verdedebromocresol⁻) e o indicador vermelho de metila apresenta cor amarela em pH acima de 6,2. Considerando que o pH para um leite fluido fresco deve apresentar pH entre 6,6 e 6,8, a ideia inicial foi verificar a variação linear dessa cor esverdeada na faixa de interesse de 6,5 a 7,0, o que não se observou, inferindo-se

que talvez a quantidade de indicadores tenha ofuscado a variação da tonalidade.

Para se confirmar a melhor diferenciação, utilizou-se o maior valor do coeficiente angular para cada indicador em sua variável mais diferenciável (R , G ou B), como representado na Figura 45.

Figura 45. (a) Perfil de resposta de $-\log(R, G, B / 255)$ em função da variação do pH para avaliar o sinal dos diferentes indicadores testados. (b) Curvas analíticas para os indicadores testados empregando-se o Sistema II

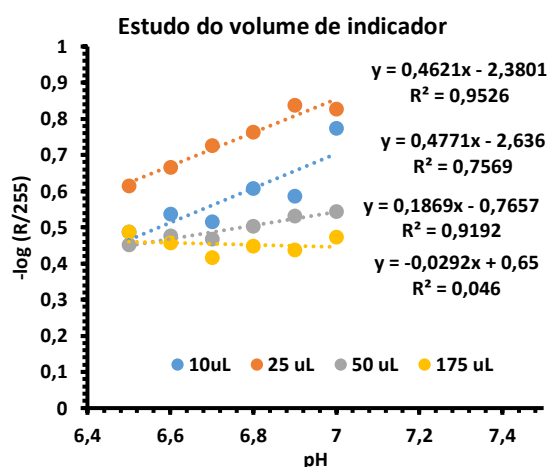


Fonte: Próprio autor – Grupo DIA – UEL (2021).

As variáveis que tiveram maior variação de sinal ($-\log(R, G, \text{ ou } B) / 255$) foram a G para o indicador alizarina, R para o azul de bromotimol, e R para o misto (verde de bromocresol e vermelho de metila). A curva analítica que obteve melhor linearidade para a faixa de pH de 6,5 a 7,0 foi da alizarina com $R^2 = 0,9941$, mas sua sensibilidade (0,1652) foi menor do que a do azul de bromotimol (0,4771). O indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila) não apresentou uma resposta adequada para a determinação de pH.

Para uma melhor avaliação do uso do indicador de azul de bromotimol como alternativa à alizarina, o volume de indicador empregado foi variado de 10, 25, 50 e 175 μL , perfazendo em todos os casos um volume final de 350 μL , cujos resultados estão mostrados na Figura 46.

Figura 46. Escolha do volume ideal de indicador de azul de bromotimol na concentração de 1,0 % (m/v) para melhor diferenciação do sinal de $-\log (R/255)$ para a determinação do pH



$$10,0 \mu\text{L} \Rightarrow yR = 0,477 xR - 2,636$$

$$R^2 = 0,7569$$

$$25,0 \mu\text{L} \Rightarrow yR = 0,462 xR - 2,380$$

$$R^2 = 0,9526$$

$$50,0 \mu\text{L} \Rightarrow yR = 0,187 xR - 0,766$$

$$R^2 = 0,919$$

$$175,0 \mu\text{L} \Rightarrow yR = -0,029 xR + 0,650$$

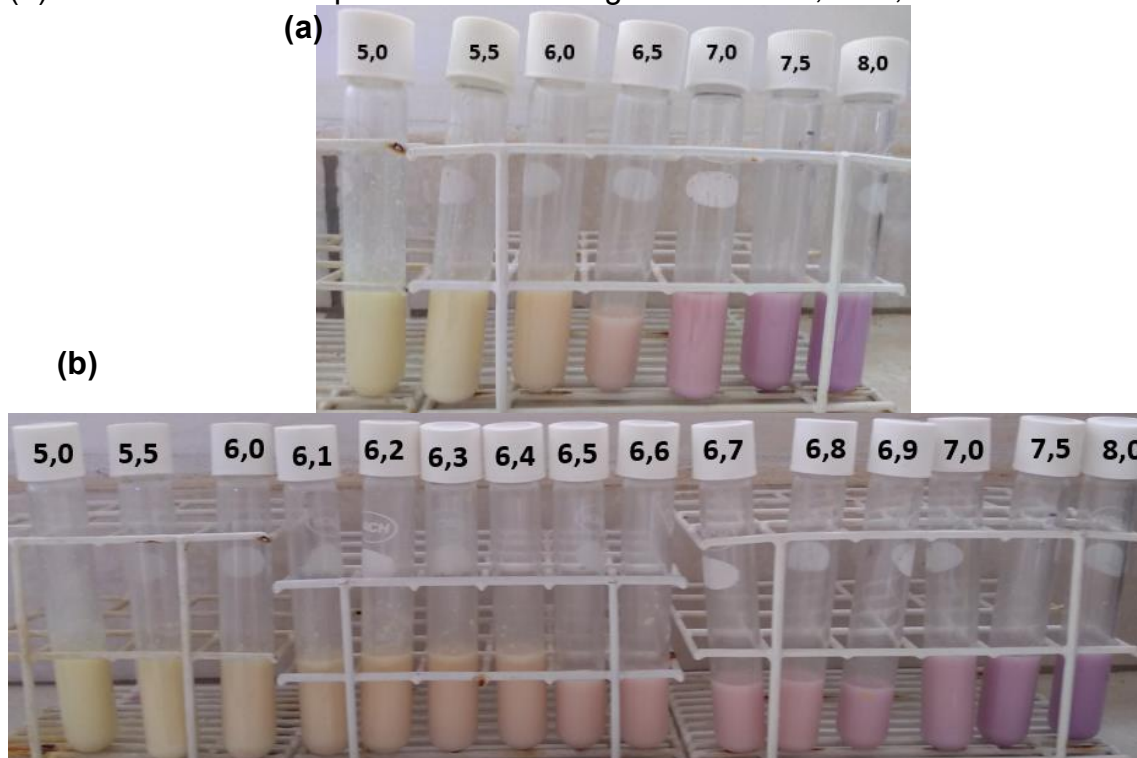
$$R^2 = 0,046$$

Fonte: Próprio autor – Grupo DIA – UEL (2021).

O maior coeficiente angular foi obtido empregando-se 10,0 µL do indicador de azul de bromotimol com o valor de 0,477, mas o volume de 25,0 µL mostrou-se com sensibilidade próxima (0,462) e um maior coeficiente de determinação R^2 de 0,953, demonstrando que 95,3% dos dados de $-\log (R/255)$ seguem um modelo linear com relação ao pH. Portanto, o volume dos indicadores selecionados (alizarina e azul de bromotimol) para avaliação do pH de amostras de leite cru foi de 25,0 µL para 325,0 µL de amostra, aplicados nos Sistemas I e II, no mesmo suporte de 96 poços.

Para o Sistema III (Figura 47) foi utilizado um volume proporcional de alizarol ao volume amostral de 5,0 mL, conforme utilizado nos sistemas anteriores, equivalendo ao volume de 358,0 µL de indicador.

Figura 47. (a) Imagem dos tubos utilizados nas medidas de pH realizadas em potenciômetro recém calibrado a 20,0 oC e por meio do Sistema III, empregando 5,0 mL de amostras de leite fresco e 358,0 μ L de indicador alizarol a 0,2 % (m/V, em solução etanólica 72%), para uma faixa mais ampla de variação de pH de 5,0 a 8,0 e (b) num intervalo mais próximo ao valor legislado entre 6,6 a 6,8



Fonte: Próprio autor – Grupo DIA – UEL (2021).

Na Figura 47 (b), nota-se um degrade da cor amarela para rosa na faixa de pH de 6,0 a 7,0, a qual engloba a faixa de interesse analítico de pH entre 6,6 a 6,8, considerado o valor normal na recepção do leite fresco nos laticínios (BRASIL, 2018), sendo esta aplicada na avaliação da linearidade.


4.4.1.1. MÉTODO POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL

Apesar do indicador de azul de bromotimol apresentar potencial para ser usado na determinação do pH do leite fresco, a alizarina mostrou uma melhor diferenciação visual frente as variações de pH na faixa de 5,0 a 8,0. Considerando que a alizarina é o indicador mais utilizado comercialmente no teste do alizarol, esse foi o indicador escolhido como referência para o teste empregando-se quatro amostras de leite cru analisadas em triplicata, posicionadas nas colunas E, F e G; linhas 9 a 12,

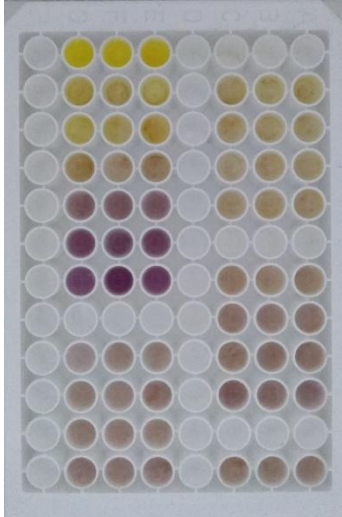
conforme planejamento e fotos apresentadas na Tabela 25, onde utilizou-se 325,0 μL de amostra com 25,0 μL de alizarol.

Tabela 25. Planejamento e resultado das imagens das curvas analíticas empregando os Sistemas I e II para a determinação do pH em amostras de leite cru na faixa de 5,0 a 8,0 utilizando-se o indicador alizarina

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
s	5,00	5,00	5,00	6,00	6,00	6,00	6,00	1
s	5,50	5,50	5,50	6,10	6,10	6,10	6,10	2
s	6,00	6,00	6,00	6,20	6,20	6,20	6,20	3
s	6,50	6,50	6,50	6,30	6,30	6,30	6,30	4
s	7,00	7,00	7,00	6,40	6,40	6,40	6,40	5
s	7,50	7,50	7,50	6,50	6,50	6,50	6,50	6
s	8,00	8,00	8,00	6,60	6,60	6,60	6,60	7
s	s	s	s	6,70	6,70	6,70	6,70	8
s	a1	a1	a1	6,80	6,80	6,80	6,80	9
s	a2	a2	a2	6,90	6,90	6,90	6,90	10
s	a3	a3	a3	7,00	7,00	7,00	7,00	11
s	a4	a4	a4	s	s	s	s	12



Sistema I



Sistema II

s: poço vazio. a1: amostra 1 de leite cru; a2: amostra 2 de leite cru; a3: amostra 3 de leite cru; a4: amostra 4 de leite cru;

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

Os resultados das intensidades médias das cores visuais e complementares empregando o Sistema III para as leituras de pHs de 5,0 a 8,0, utilizando-se os tubos com 5,0 mL de amostras de leite fresco juntamente com 358,0 μL de solução etanólica a 72% de alizarina a 0,20 % (m/V) estão apresentados na Tabela 26.

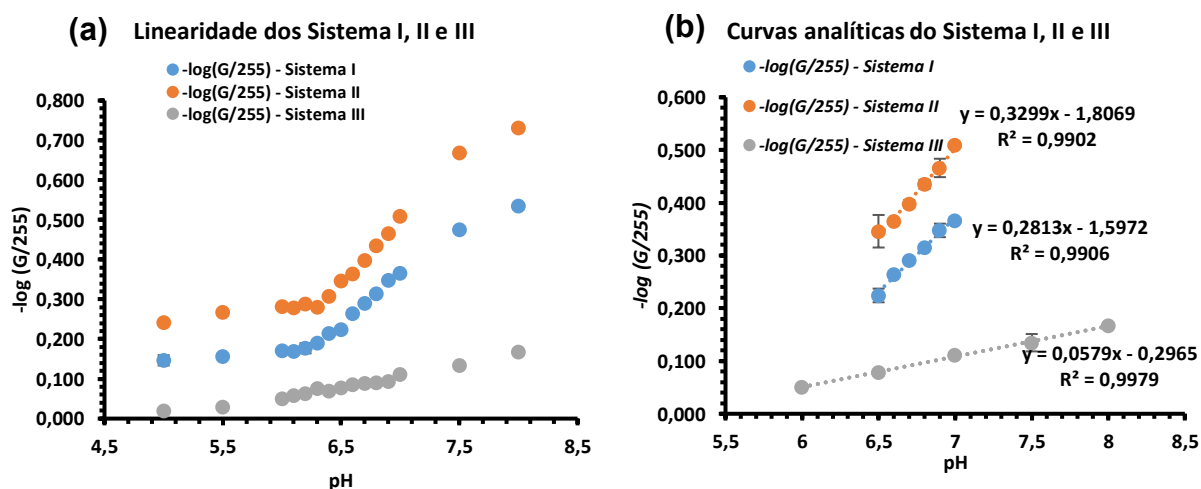
Tabela 26. Resultados dos sinais de R, G e B dos tubos com 5,0 mL de leite fresco com 358,0 μ L de solução indicadora de alizarina a (0,2 %, m/V) em pHs de 5,0 a 8,0 adquiridos pelo Sistema III

Sistema III								
pH	R	G	B	Cor visual	R	G	B	Cor complementar
5,00	255,0	243,4	214,5		0,0	11,6	40,5	
5,50	255,0	238,0	210,0		0,0	17,0	45,0	
6,00	255,0	226,8	201,0		0,0	28,2	54,0	
6,10	252,0	223,0	201,0		3,0	32,0	54,0	
6,20	251,0	220,9	201,0		4,0	34,1	54,0	
6,30	247,0	213,8	196,9		8,0	41,2	58,1	
6,40	255,0	216,8	196,8		0,0	38,2	58,2	
6,50	247,6	213,0	196,0		7,4	42,0	59,0	
6,60	245,1	209,0	196,0		9,9	46,0	59,0	
6,70	244,0	209,0	199,5		11,0	46,0	55,5	
6,80	245,1	209,4	201,0		9,9	45,6	54,0	
6,90	247,8	206,6	198,5		7,2	48,4	56,5	
7,00	238,0	198,4	194,4		17,0	56,6	60,6	
7,50	227,2	187,0	193,6		27,8	68,0	61,4	
8,00	220,0	173,5	188,0		35,0	81,5	67,0	

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

A Figura 48 apresenta a resposta analítica da intensidade do sinal da variável G utilizando-se os Sistemas I, II e III propostos para o leite cru com o indicador alizarina, quando seu pH foi variado de 5,0 a 8,0, tendo o pH as amostras sido medido em um potenciômetro recém calibrado.

Figura 48. (a) Intensidade da variável G nos Sistemas I, II e III em função do pH variado de 5,0 a 8,0. (b) Curvas analíticas da variação de sinal $-\log(G/255)$ em função do pH para o indicador alizarina para os Sistemas propostos



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

Os Sistemas I e II mostraram-se mais sensíveis e com linearidade adequada para faixa de trabalho selecionada (6,5 a 7,0), que engloba um leite cru considerado adequado para consumo (6,6 a 6,8) segundo a IN 75 de 2018 (BRASIL, 2018). O Sistema III mostrou menor sensibilidade e baixa linearidade para a faixa estuda, entretanto observou-se linearidade em faixa de pH maiores, 6,0 a 8,0, com coeficiente de determinação de 0,9979.

A média dos resultados lidos em triplicata para o pH das amostras de leite cru, medidas e calculadas pelas curvas analíticas dos Sistemas I, II e III, e comparado aos valores obtidos por meio do método potenciométrico utilizando eletrodo de vidro, estão apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27. Valores médios de pH (n=3) para as 4 amostras de leite fresco por meio das imagens digitais utilizando o indicador alizarina realizadas nos Sistemas I, II e III propostos e no potenciômetro (método de referência)

Amostra	Sistema I	Sistema II	Sistema III	Potenciômetro	ANOVA	
	pH ± DP				F _{calculado} (F _{crítico} = 4,07)	Valor-p (0,05)
a1	6,64 ± 0,06	6,56 ± 0,06	6,66 ± 0,01	6,61 ± 0,01	3,84	0,057
a2	6,74 ^a ± 0,08	6,60 ^b ± 0,06	6,62 ^b ± 0,04	6,69 ^{a,b} ± 0,01	4,23	0,046
a3	6,68 ± 0,04	6,70 ± 0,05	6,66 ± 0,04	6,71 ± 0,01	1,15	0,386
a4	6,83 ± 0,08	6,73 ± 0,11	6,71 ± 0,08	6,80 ± 0,01	1,54	0,278

DP: Desvio padrão

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

Comparando-se os valores médios (n=3) de pH das amostras a1, a3 e a4 de leite por ANOVA, não se observou diferença significativa em nível de 5% entre o pH medido colorimetricamente através da intensidade da variável G normalizada empregando-se as imagens digitais dos Sistemas Instrumentais I, II e III propostos em relação ao pH fornecido utilizando-se o método potenciômetro (referência), de acordo com os valores de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ (4,07) e confirmado pelos valor-p > 0,05, mostrados na Tabela 27. Somente a amostra a2, mostrou-se com o resultado da média distinta significativamente em nível 5,0 % com valor de $F_{\text{calculado}}$ (4,23) > $F_{\text{crítico}}$ (4,07), confirmado pelo valor-p < 0,05 no teste de *Tukey*, que não possibilitou evidenciar quais médias divergiam entre si. Entretanto, a aplicação do teste de *Fischer* evidenciou que a média da amostra a2 do Sistema I (“a”), diferenciou-se significativamente das médias obtidas pelos Sistemas II e III (“b”) não diferindo do resultado potenciômetro (“a” e “b”),

método recomendado como oficial.

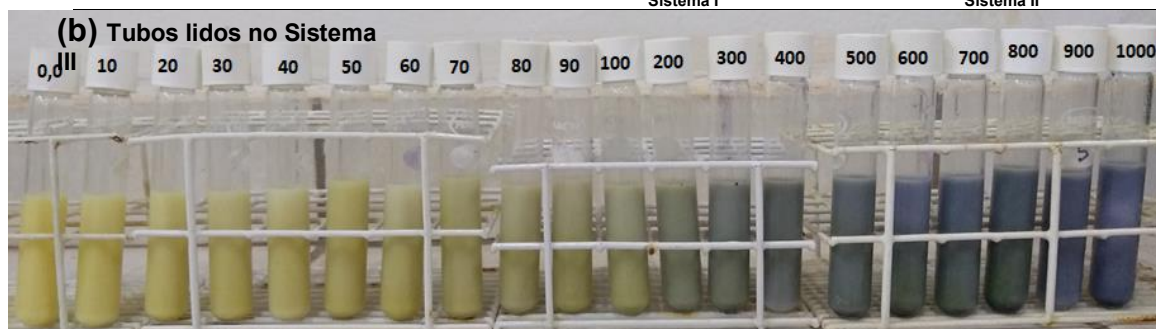
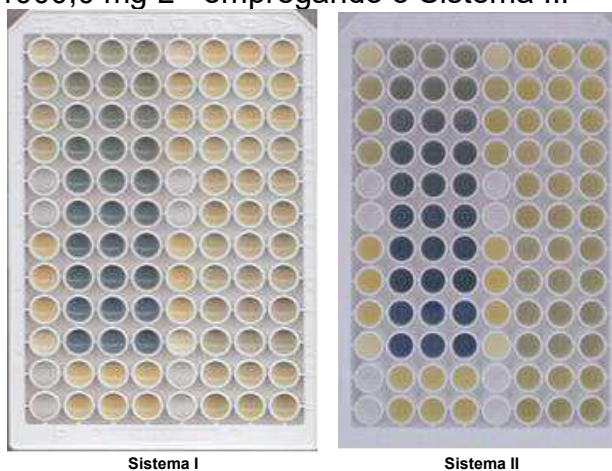
4.4.2. DETERMINAÇÃO DE AMIDO

A adição de farinhas (trigo, milho, arroz entre outras) têm a função de reconstituir a aparência do leite (densidade), quando são adicionados volumes excessivos de água. O teste proposto pelo MAPA, também conhecido como teste do iodo, é baseado em uma reação de complexação do amido (amilose e amilopectina) com o tri-iodeto (I_3^-) e penta-iodeto (I_5^-), resultando em um complexo azul ou vermelho-violáceo, respectivamente (LEHNINGER, 1995, TEITELBAUM, RUBY, MARKS, 1980) (Figura 49).

Figura 49. (a)Planejamento das posições da microplaca para a aquisição das imagens dos Sistemas I e II propostos como teste preliminar para detecção de amido no leite cru de 0,0 a 1000,0 mg L⁻¹ pela reação da solução de 25,0 µL de solução de lugol a 10,0 % (m/V). (b)Tubos com 5,0 mL de leite fresco complexados com 385,0 µL com concentração amido variando 0,0 a 1000,0 mg L⁻¹ empregando o Sistema III

H	G	F	E	D	C	B	A	Poço
a9	100	100	100	a9	0	0	0	1
a7	200	200	200	a5	10	10	10	2
a7	300	300	300	a5	20	20	20	3
a7	400	400	400	a5	30	30	30	4
S	500	500	500	s	40	40	40	5
S	600	600	600	s	50	50	50	6
a8	700	700	700	a6	60	60	60	7
a8	800	800	800	a6	70	70	70	8
a8	900	900	900	a6	80	80	80	9
a9	1000	1000	1000	a9	90	90	90	10
s	a3	a3	a3	s	a1	a1	a1	11
s	a4	a4	a4	s	a2	a2	a2	12

s: poço vazio;
a1a8: amostras de leite cru complexadas;
a9: amostra de leite cru



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

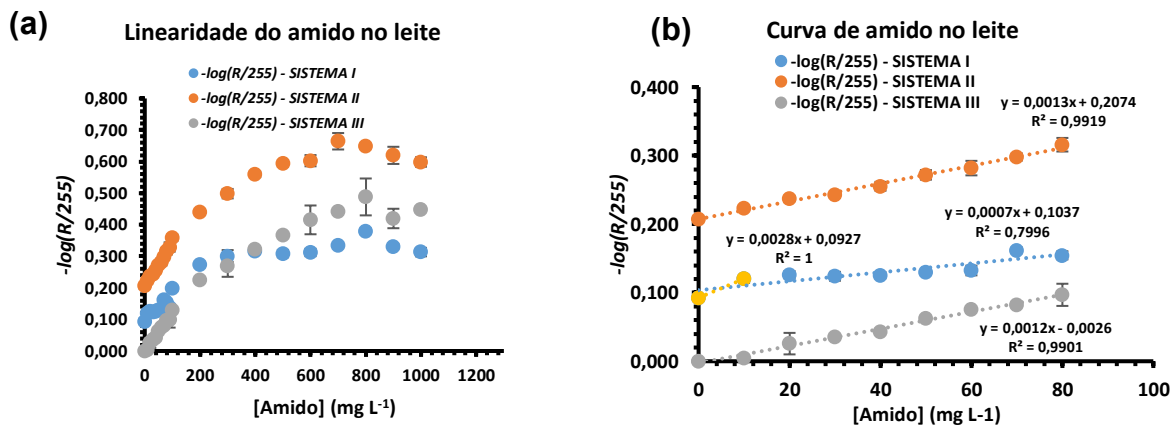
Nos testes preliminares, pôde-se notar cores diferentes nas duas faixas de concentrações testadas. Na primeira faixa de concentração de amido em leite cru variada de 0,0 a 90,0 mg L⁻¹ nota-se a variação de cor amarela para verde. Na segunda faixa de concentração de amido (100,0 a 1000,0 mg L⁻¹) observa-se a variação da coloração do verde ao azul, como representada no planejamento dos tratamentos das imagens adquiridas pelo Sistemas I e II na Figura 49(a), em que foram transferidos para a microplaca 325 µL leite cru com 25 µL de solução de lugol a 10,0% m/V; e na Figura 49(b) pela foto dos tubos contendo 5,0 mL de amostra de leite cru, variando a concentração de 0 a 1000,0 mg L⁻¹ de amido em leite fresco, complexado com 385,0 µL solução de lugol a 10,0% (m/V).

Desta forma, como a cor prevalecente foi a cor verde na faixa de 10,0 a 90,0 mg L⁻¹, resultado da união das cores amarela e azul do complexo do iodo na presença de amido, as regressões lineares foram modeladas em função da variável *R* (*red* - vermelho), que é a cor complementar ao verde, como apresentada nas cores complementares da Figura 8.

4.4.2.1. MÉTODO DETERMINAÇÃO DE AMIDO

Os dados da variação da concentração de amido no leite mostraram comportamento linear apenas nos Sistema II e III, especificamente nas faixas de 0,0 a 90,0 mg L⁻¹, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,9921 e 0,9901, respectivamente (Figura 50).

Figura 50. (a) Imagem adquirida pelo Sistema II proposto como teste preliminar para detecção de amido no leite cru de 0,0 a 1000,0 mg L⁻¹ em reação com solução de 25,0 mL de solução de lugol a 10,0 % (m/V). (b) Intensidade de sinal para as variáveis R, G e B em função da concentração do amido (b) Curvas analíticas conforme a faixa de trabalho para a variável R



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

O Sistema I não apresentou boa linearidade para as faixas seleccionadas neste estudo (0,0 a 1000,0 mg L⁻¹). No entanto, o ponto de 10,0 mg L⁻¹ empregando o Sistema I foi o que apresentou a maior média ($-\log(R/255)$) diferente da amostra isenta de amido (amostra tomada com branco analítico), tendo um valor de 0,028.

Os resultados para 8 amostras de leite estão apresentados na Tabela 28, na qual sob 4 delas adicionou-se um padrão de amido na concentração de 10,0 a 60,0 mg L⁻¹. A comparação foi realizada apenas de forma qualitativa, visando verificar o potencial de diferenciação de uma amostra com ou sem amido num limite mínimo detectável 10,0 mg L⁻¹.

Tabela 28. Valores médios de pH (n=3) para as 4 amostras de leite fresco por meio das imagens digitais utilizando o indicador alizarina realizadas nos 3 Sistemas propostos e no potenciômetro (método de referência)

Amostras	Sistema I	Sistema II	Sistema III	[Amido] adicionado	F _{calculado} (F _{crítico} = 4,07)	Valor-p (0,05)
	[Amido] ± DP					
a1	38,79 ^a ± 3,79	42,38 ^a ± 1,38	30,49 ^b ± 0,00	40,0 ^a	19,7	5E-04
a2	70,34 ^a ± 12,13	64,72 ^a ± 6,44	68,10 ^a ± 0,00	60,0 ^a	1,30	0,34
a3	16,18 ^b ± 1,83	23,73 ^a ± 3,46	22,80 ^a ± 0,00	20,0 ^{a,b}	9,02	6E-03
a4	ND	ND	ND	0,00		
a5	ND	ND	ND	0,00		
a6	14,07 ^b ± 1,82	37,65 ^c ± 5,94	30,49 ^a ± 0,00	30,0 ^a	30,82	9,6E-05
a7	ND ^b	8,22 ^a ± 2,50	7,44 ^{a,b} ± 4,22	10,0 ^a	9,68	4,9E-04
a8	ND	ND	ND	0,00		
a9	ND	ND	ND	0,00		

DP: Desvio padrão

Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

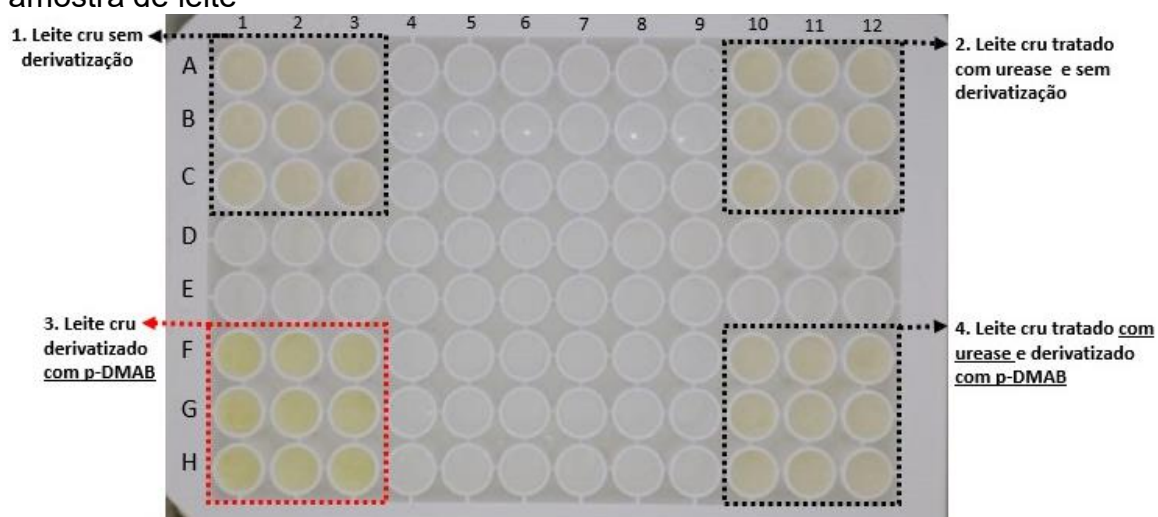
Analisando os resultados das médias das amostras, observou-se que os Sistema II e III, obtiveram um desempenho equivalente na detecção de amido em leite em uma concentração limite de 10,0 mg L⁻¹. O Sistema I não apresentou bom desempenho na determinação de amido no leite utilizando a média das intensidades e nem detectou a adição de amido em nível de 10 mg L⁻¹.

4.4.3. DETERMINAÇÃO DE UREIA

No teste preliminar a amostra de leite cru, utilizada como referência, apresentou ureia em sua composição, fator evidenciado pelo desenvolvimento de coloração amarela na amostra pós derivatização com 25,0 µL do agente cromogênio p-DMAB a 2,0 % (m/V), como indicado pelo destaque do tracejado em vermelho na Figura 51 (linhas: F, G, H e colunas: 1, 2, 3, canto inferior esquerdo da microplaca). Na Figura 51, também pode-se observar o leite cru sem nenhuma derivatização (linhas: A, B, C e colunas: 1, 2, 3, canto superior esquerdo), a mesma amostra tratada

com urease no lado direito superior (A, B, C e 10, 11, 12) sem derivatização e na parte inferior (F, G, H e 10, 11, 12) derivatizada com 25,0 μL p-DMAB a 2,0% (m/V).

Figura 51. Imagem digital de amostras de leite cru bovino analisadas pelo Sistema II em que: (1) amostra sem tratamento, tomado como referência/controla; (2) amostra tratada com urease e sem derivatização; (3) amostra derivatizada com p-DMAB; (4) amostra de leite

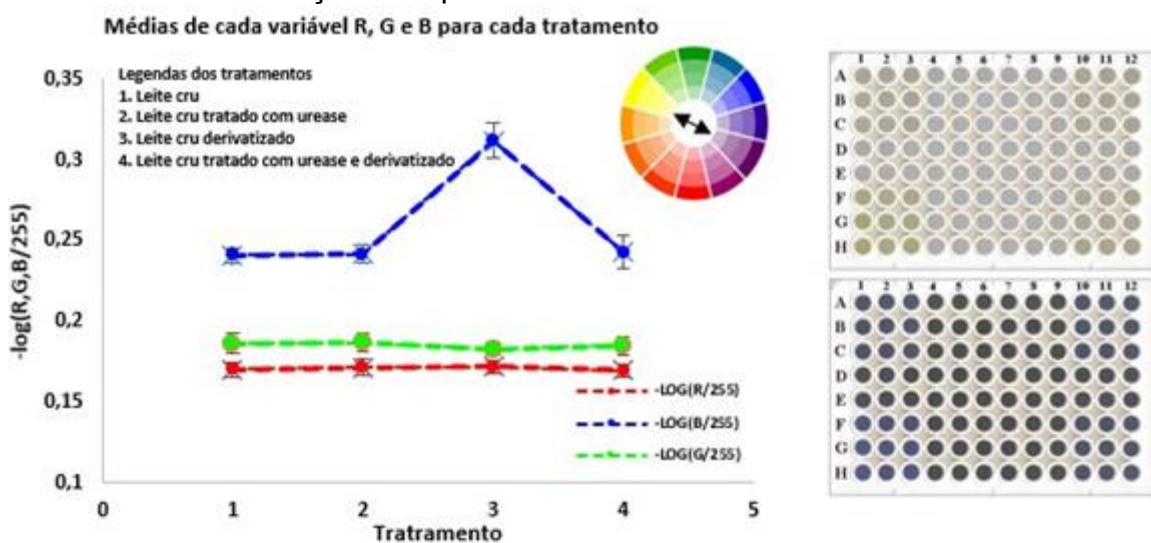


Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

As repetições ($n=9$) de cada tratamento foram realizadas utilizando um volume final de 350,0 μL para cada poço, correspondendo a 325,0 μL de leite com 25,0 μL do agente cromogênio p-DMAB, tendo sido a imagem adquirida pelo *smartphone* na caixinha do protótipo após 5 minutos da primeira pipetagem.

As médias das variáveis R , G e B , normalizadas e logaritmizadas negativamente, estão melhor representadas na Figura 52.

Figura 52. Médias de variáveis $-\log(R, G, B/255)$ ressaltando a cor complementar do amarelo – o azul nas microplacas, resultante dos controles e tratamentos aplicados com e sem derivatização com p-DMAB



Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2020).

O teste F e teste *t* de *Student* pareado em nível de 5,0% de confiança foram aplicados nos tratamentos 1, 2, 3 e 4 (Figura 52) e estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Comparação entre as médias dos tratamentos aplicados no leite cru

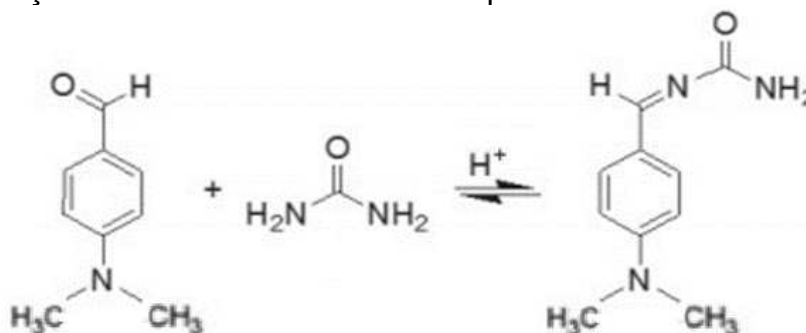
Variável	Interação	SQ	gl	MQ	$F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$	valor-p
<i>- log (B/255)</i>	1x2	4,44E-06	1	4,44E-06	0,17	0,687
	1x3	2,28E-02	1	2,28E-02	87,69	6,80E-08
	1x4	1,91E-05	1	1,91E-05	0,30	0,591
	2x3	2,21E-02	1	2,21E-02	84,63	8,66E-08
	2x4	5,13E-06	1	5,13E-06	0,08	0,783
	3x4	2,15E-02	1	0,021463	71,83	2,60E-07

SQ – Soma Quadrática; gl – graus de liberdade; MQ – Média Quadrática; $F_{\text{crítico}} = 4,49$; $p = 0,05$

O tratamento 3 para a variável *B* (leite cru sem tratamento com urease e derivatizado com p-DMAB) diferenciou-se significativamente dos demais tratamentos (destaque em cinza na Tabela 29), em que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ (4,49), indicando que as médias dos grupos apresentam diferenças significativas em nível de 5,0%. A urease mostrou-se eficiente para promover a redução da quantidade de ureia no leite, como indicado na Figura 47, em que o mesmo foi adotado como “branco analítico”, pois observou-se que não houve diferença significativa entre as médias do leite cru sem agente cromogênio de derivatização p-DMAB (1) em relação ao leite cru tratado com urease sem (2) e com derivatização com p-DMAB (4).

A coloração amarela, presente apenas no leite cru pós reação de derivatização com p-DMAB, pode ser explicada pela presença de ureia em sua composição natural, como mostra a reação da Figura 53, uma vez que o produto da reação entre a ureia e o p-DMAB possui uma estrutura com ressonância, que geralmente apresenta coloração amarelada(REFER).

Figura 53. Reação colorimétrica entre a ureia e p-dimetilaminobenzaldeído (p-DMAB)



Fonte: adaptado de Toledo et al., 2017.

Uma alternativa encontrada para a determinação de ureia comercial adicionada ao leite, na presença de ureia encontrada naturalmente no leite, passou pelo estudo da aplicação da atividade enzimática da urease.

4.4.3.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA UREASE NO LEITE CRU

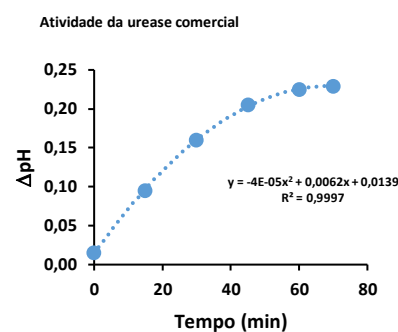
A atividade enzimática da urease foi avaliada pela variação do pH do meio contendo ureia. Neste caso, avaliou-se para o pH inicial do leite no limite inferior do valor considerado como normal que é de 6,60 até o limite superior de 6,80. A Tabela 30 apresenta os valores médios de pH monitorados em duplicata (n=2), em que pôde-se observar a variação de pH no decorrer do tempo, por meio das medidas realizadas pelo potenciômetro.

Tabela 30. Atividade enzimática da urease (n=2) em leite cru

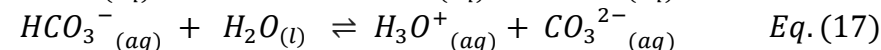
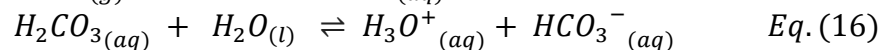
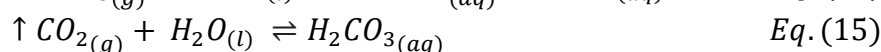
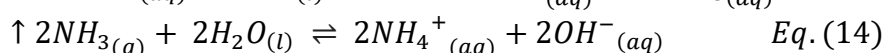
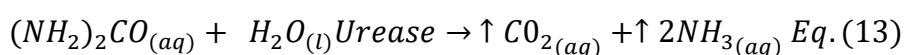
Tempo (min)	Leite cru ± DP	Leite cru com urease ± DP	Atividade da urease (ΔpH)
0	6,60 ± 0,02	6,61 ± 0,01	0,01
15	6,60 ± 0,01	6,69 ± 0,01	0,09
30	6,61 ± 0,01	6,77 ± 0,02	0,16
45	6,60 ± 0,01	6,80 ± 0,01	0,21
60	6,61 ± 0,01	6,84 ± 0,02	0,23

DP: desvio padrão

Fonte: Grupo DIA - UEL, 2020.



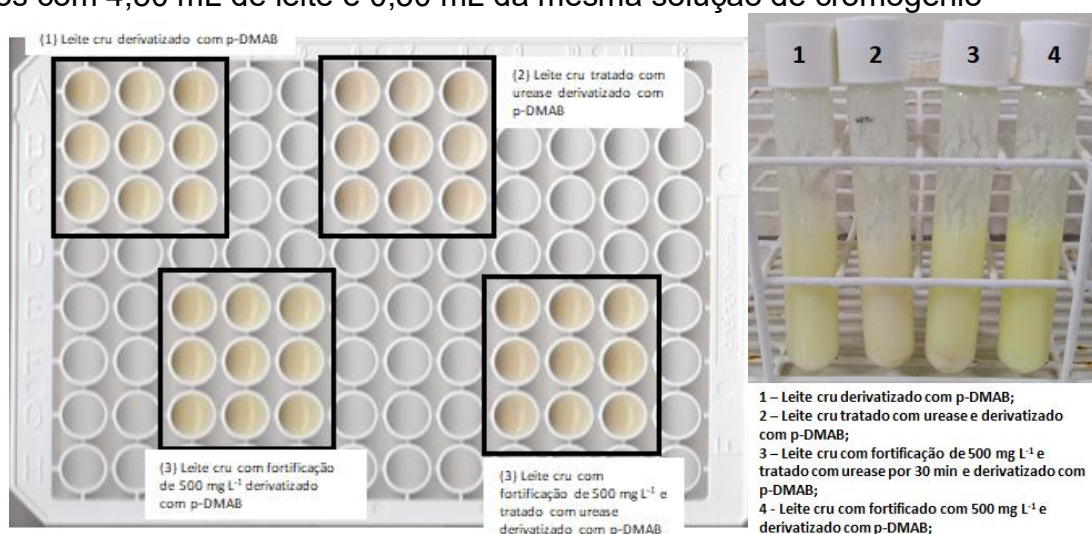
Os dados da Tabela 30, indicam uma constância no ΔpH a partir de 1 h de reação, com a maior parte da ureia presente no leite cru sendo hidrolisada, formando amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). O fato desses produtos serem gasosos, permitiria sua perda por volatilização. No entanto, ao ser hidrolisada a espécie NH_3 forma íons amônio (NH_4^+) e hidroxilas (OH^-), cuja maior parcela permanece solubilizada em água devido ao seu caráter polar, deixando o pH do leite tratado mais elevado comparado ao leite de referência. O gás CO_2 , ainda que contribua para a acidificação do meio, tem um efeito menor sobre o pH, por ser menos solúvel e formado em menor quantidade na reação de hidrólise em relação a amônia (Equação 13-17) (SKOOG, 2007).



A atividade de urease empregada mostrou-se eficiente em catalisar a hidrólise da ureia presente naturalmente no leite cru tomado como referência convertendo-a em amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2), indicada indiretamente pelo método potenciométrico (Gráfico da Tabela 30).

A partir dessa etapa, outros testes foram realizados empregando os Sistemas I e III, como indicado na Figura 54.

Figura 54. Imagens adquiridas empregando o Sistema I, utilizando 325,0 μL de amostra para 25 μL de solução de p-DMAB a 2,0 % e para o Sistema III, utilizando tubos com 4,50 mL de leite e 0,50 mL da mesma solução de cromogênio



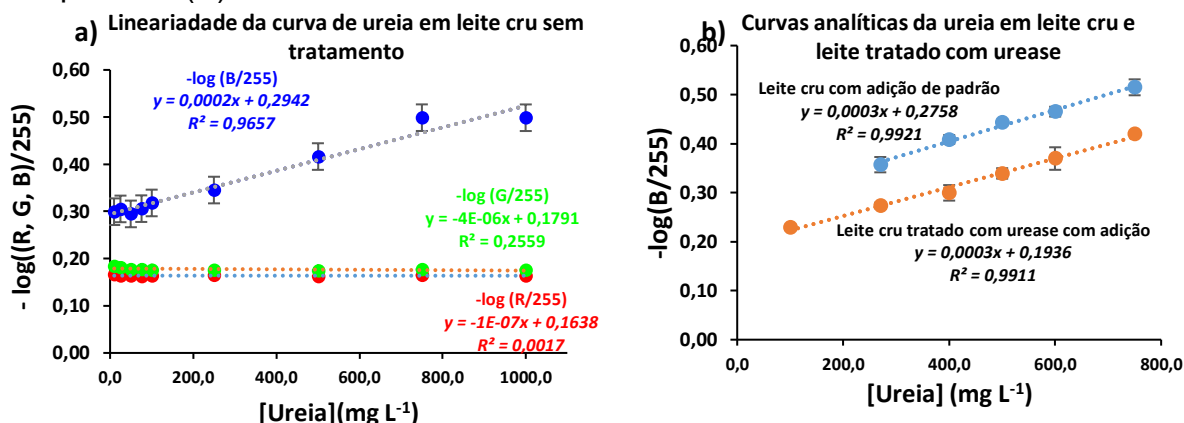
Fonte: Grupo DIA - UEL, 2021.

Como os Sistemas I e III, não apresentaram adequada diferenciação entre o leite tratado com urease e o sem tratamento, ambos derivatizados com p-DMAB, optou-se por aplicar um método de extração de ureia para um melhor entendimento do analito, porém utilizando-se somente o Sistema II, que apresentou maior sensibilidade e diferenciação comparadas aos Sistemas I e III.

3.1.1.1. Parâmetros analítico do método proposto

Os dados que melhor se ajustaram ao modelo linear aplicado foram os da cor complementar ao amarelo, que corresponde a cor azul (variável B , com coeficiente de determinação $R^2=0,9657$) (Figura 55), sendo que as demais variáveis (R e G) não seguiram o modelo linear para a faixa escolhida.

Figura 55. (a) Linearidade da curva em leite cru de 0,0 a 1000,0 mg L⁻¹ de ureia para as 3 cores primárias distintas (R-red, G-green e B-blue). (b) Faixa linear das curvas analíticas com adição de padrão de ureia ao leite cru (referência/controle – linha pontilhada azul) e do leite cru tratado com urease (linha pontilhada vermelha), utilizando a componente (B) do sistema RGB



Fonte: Grupo DIA - UEL, 2020.

Os parâmetros avaliados na etapa de validação do método, seguiram a normativa da ANVISA RDC 166/17 e estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31. Parâmetros de validação avaliados utilizando a variável B (blue) para o método proposto empregando o derivatizante p-DMAB na determinação de ureia em leite bovino cru e leite tratado com urease, empregando a câmera de um smartphone acoplada ao Sistema II com iluminação controlada

Parâmetros avaliados	Leite cru	Leite cru tratado com urease
Faixa de trabalho (ureia, mg L ⁻¹)	270,0 – 750,0	100,0 – 750,0
Curva analítica	$y = 0,0003x + 0,2758$	$y = 0,0003x + 0,1936$
R^2	0,9921	0,9911
LD (mg L ⁻¹)	88,62	32,76
LQ (mg L ⁻¹)	268,55	99,27
Precisão, $n=3$ (DPR%)	3,85	4,29
Precisão intermediária, $n=3$ DPR (%)	1,09	3,28
	100,0	77,2
Exatidão (% de recuperação)	400,0	85,0
	750,0	105,0
		110,1

R^2 - coeficiente de determinação; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação; DPR – desvio padrão relativo.

Fonte: Grupo DIA - UEL, 2020.

O limite de detecção foi calculado de acordo com a ANVISA RDC 166/17, mas também foi confirmado visualmente pelo método *screening* descrito anteriormente, para o leite cru normal (referência/controle), assim como para o leite tratado com urease, proveniente do farelo de soja. Os limites de detecção se mostraram adequados, considerando os teores naturais de ureia reportados na literatura (100,0 – 160,0 mg L⁻¹).

O método proposto apresentou precisão intra-dia e inter-dias (DPR < 5,00%).

A exatidão foi calculada pela porcentagem de recuperação, que foi avaliada pela adição em três níveis de concentrações 100,0, 400,0 e 750,0 mg L⁻¹ de ureia vendida em casas agrícolas na região de Londrina-PR em leite cru. O método mostrou-se exato, estando na faixa de 70-120 % de recuperação (ANVISA RDC 166/17).

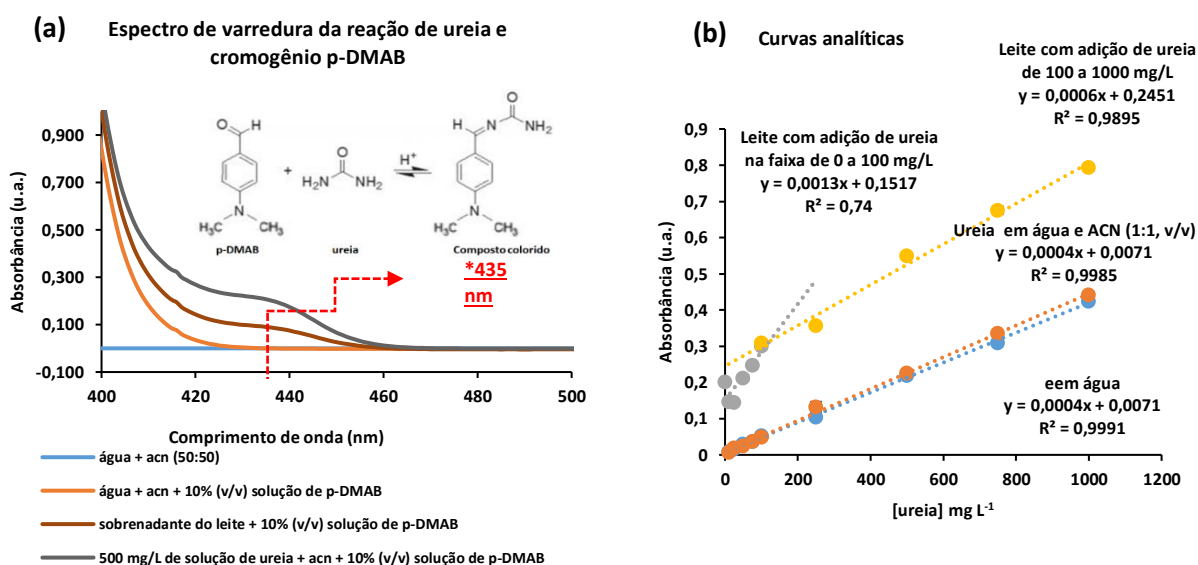
A robustez do método foi avaliada com a utilização de uma ureia comercializada na região de Londrina, conservada em geladeira 4 °C por 48 h, não apresentando variações significativas para a variável *B* (DPR < 5,0%), quando comparado com os resultados de um padrão de ureia.

4.4.3.2. MÉTODO ESPECTROFOMÉTRICO

O método espectrofotométrico, mostrou que a amostra tomada como referência apresentou ureia em sua composição. A ureia pode reagir com o p-DMAB em meio ácido, de forma que o produto pode ser uma base de *Schiff* com estrutura ressonante de quinoide, obtendo-se um composto de coloração amarelada (TOLEDO, TOCI, PEZZA, PEZZA, 2017). Alguns trabalhos relatam que o solvente pode alterar os valores das absorvâncias, por este motivo preparou-se uma solução de água destilada e acetonitrila na mesma proporção utilizada no leite cru (H₂O/ACN, 1:1 v/v), para minimizar a possível presença de interferentes no sobrenadante do leite após etapa de *clean-up* e derivatização. O comprimento de onda máximo do padrão de ureia dissolvido em água + acetonitrila (1:1, v/v) após reação com o agente cromogênio, apresentou-se similar ao comprimento de onda máximo do sobrenadante do leite cru derivatizado com p-DMAB, que foram, respectivamente, de 435 e 440 nm, com similaridade nos perfis espectrais (ROIJERS, TAS, 1964) (Figura 56).

Como parâmetro de diferenciação preparou-se um padrão de 500,0 mg L⁻¹ de ureia no leite cru e realizou-se o *clean-up* com acetonitrila e derivatização com p-DMAB, como indicado na Figura 56(a). O gráfico na Figura 56(b) apresenta as curvas analíticas determinadas.

Figura 56. (a) Espectro de varredura do produto de reação da ureia com o p-DMAB e curvas analíticas da ureia em leite cru, água e água:acetonitrila (1:1, v/v), lidas no comprimento de onda máximo em 435 nm



Fonte: Grupo DIA – UEL, 2020.

Os dados da curva analítica com adição de padrão de ureia, indicaram que seguem um modelo linear na região de 100,0 a 1000,0 mg L⁻¹ (curva amarela). Apesar da primeira região de 0,0 a 100,0 mg L⁻¹ (Figura 56(b)) aparentemente apresentar certa linearidade, ela apresenta efeito de matriz em baixas concentrações de ureia (curva cinza), considerando as diferentes inclinações das curvas. Quando as concentrações de ureia são maiores que 100,0 mg L⁻¹, o efeito de matriz diminui, como indica a curva em pontos azuis da Figura 56(b).

O leite fluido tomado como referência apresentou ureia em concentração de 119,44 mg L⁻¹, (11,94 mg dL⁻¹) dentro da faixa normalmente encontrada na literatura que varia de 100 a 160 mg L⁻¹ (JONKER, KOHN, ERDMAN, 1998).

4.4.3.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS

Os resultados da comparação entre o método espectrofotométrico (oficial) e o método proposto empregando imagem digital via *smartphone* e p-DMAB estão apresentados na Tabela 30, em que as médias de cada amostra testada foi comparada via Teste t de *Student* pareado em nível 5,0%.

Tabela 32. Parâmetros avaliados utilizando a variável B para o método proposto empregando p-DMAB na determinação ureia em leite bovino cru e leite tratado com urease, fazendo uso da câmera de *smartphone* no Sistema II com iluminação controlada (n=3)

Amostra	Método espectrofotométrico [ureia] mg L ⁻¹ ± DP	Método por imagem digital via <i>smartphone</i> Sistema II [ureia] mg L ⁻¹ ± DP	F _{calculado}	Valor p
A01	119,44 ± 0,88	113,23 ± 9,59	0,592	0,27
A02	125,59 ± 6,22	110,07 ± 14,59	0,007	0,40
A01 + 100 mg L ⁻¹	206,33 ± 3,33	212,43 ± 10,27	0,191	0,36
A02 + 100 mg L ⁻¹	191,89 ± 6,94	198,83 ± 15,51	0,007	0,45

DP - Desvio Padrão; F_{crítico} = 4,49.

Fonte: Grupo DIA – UEL, 2020.

Os dados da Tabela 32 indicam que as médias das triplicatas das amostras A01 e A02, bem como das adições de padrão de 100 mg L⁻¹ em cada uma delas (A01 + 100 mg L⁻¹ e A02 + 100 mg L⁻¹), não apresentou diferença significativa em nível de 5,0 % entre os teores de ureia obtidos pelo método espectrofotométrico e os obtidos pelo uso do método proposto com o Sistema II, feito empregando análise de imagem digital utilizando diretamente o agente cromogênio p-DMAB sem nenhum tipo de tratamento na amostra, confirmado pelos valores de $p > 0,05$ e $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ de 4,49.

Considerações parciais e perspectivas futuras

Os Sistemas Instrumentais portáteis I, II e III desenvolvidos, quando calibrados e avaliados com 6 corantes alimentícios, demonstraram viabilidade em realizar de forma versátil, semi-automatizadas e semi-quantitativa análises colorimétricas empregando imagens digitais. Comparando-se o desempenho dos 3 Sistemas, os Sistemas I e II efetuam até 96 determinações simultâneas com maior sensibilidade e precisão em relação ao Sistema III. O Sistema II se destaca pela sua praticidade, considerando a popularização dos *smartphones*, que estão cada vez mais acessíveis e contam com mais recursos tecnológicos, enquanto o Sistema III apresenta facilidade de uso em ampla faixa dinâmica de concentração.

A eficiência dos 3 Sistemas foi avaliada e comprovada em aplicações envolvendo análises de neutralizantes (meio ácido ou básico), reconstituintes (amido, ureia) e conservantes (formol da ureia agrícola), adicionados em amostras de leite cru bovino, nas faixas de concentrações compatíveis às utilizadas para mascarar fraudes em produtos comerciais. Os Sistemas Instrumentais e os Métodos propostos demonstram potencial uso em rotina de forma rápida e direta, atestado pela concordância dos resultados obtidos empregando-se métodos de referência potenciométrico (pH) e espectrofotométrico (UV-Vis) na determinação *in loco* de adulterantes do leite.

Como perspectivas futuras, pretende-se concluir o estudo de interferentes e avaliar a robustez das 3 aplicações já realizadas. Pretende-se ampliar o escopo de aplicação dos 3 Sistemas Instrumentais desenvolvidos para outros analitos, como o peróxido de hidrogênio e os hipocloritos, confrontando sua acurácia frente à métodos recomendados como oficiais.

Espera-se que as soluções instrumentais e metodológicas propostas e desenvolvidos neste trabalho, contribuíssem servindo de ferramentas para auxiliar num monitoramento de rotina mais efetivo, nas várias etapas de controle de qualidade, desde o recebimento do leite "*in natura*" nas indústrias até a fiscalização pelo MAPA e a Vigilância Sanitária dos produtos comerciais, visando assegurar um leite isento de adulterantes e apropriado para o consumo.

REFERÊNCIAS

AOAC INTERNATIONAL; CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1997.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 935.49. 20 ed. Rockville: 2016.

BELOTI, V.. Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade. 1. ed. Londrina: Editora Planta, 2015. v. 1. 415p .

BENEDETTI, L. P. S. et al. . A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. Analytical Methods. Analytical Methods, v. 7, p. 4138-4144, 2015.

BENEDETTI, L. P. S. Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de Spot Tests. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013. 76p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 30 de 26 de julho de 2018. Diário Oficial da união de 13/07/2006. Brasília, DF

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.º 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 de novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.º 77, de 26 de novembro de 2018. Ficam estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 de novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.º 78, de 26 de novembro de 2018. Estabelece requisitos e procedimentos para o registro de provas zootécnicas visando o controle leiteiro e avaliação genética de animais com aptidão leiteira. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 de novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2017.

COSTA, R. A et al.. Quantification of Milk Adulterants (starch, H₂O₂, and NaClO) using Colorimetric Assays coupled to Smartphone Image Analysis. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 156, p. 104968, 2020.

GODIN, C. S. et al.. *Interlaboratory validation of modified classical qualitative methods for detection of adulterants in milk: starch, chloride, and sucrose*. Food Analytical Methods, vol. 9, p. 2509-2520, 2016.

DE OLIVEIRA K. F. et al.. Smartphone Application for Methanol Determination in Sugar Cane Spirits Employing Digital Image-Based Method. Food Analytical Methods, v. 10, p. 2102-2109, 2016.

DE OLIVEIRA K. F. et al.. Digital Image Method Smartphone-Based for Furfural Determination in Sugarcane Spirits. FOOD ANALYTICAL METHODS, v. 10, p. 508-515, 2017.

DIOUF, B. & PODE, R., 2015. Potential of lithium-ion batteries in renewable energy, Renewable Energy, Elsevier, vol. 76(C), pages 375-380.

ESTADO DE MINAS GERAIS (2018). Empresas investigadas por fraudes em leite em pó em BH e Contagem terão que recolher produtos. Disponível em <https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2018/12/10/interna_gerais,1012073/empresas-investigadas-por-fraudes-em-leite-em-po-em-bh-e-contagem-tera.shtml>. Acessado em março de 2020.

EVANS, Martin; NOBLE, Joshua; HOCHENBAUM, Jordan. Arduino em Ação. São Paulo: Novatec, 2013.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Dairy Market Review, Over of global dairy market developments in 2018, march 2019.

FEIGL F. & ANGER V. Spot tests in inorganic analysis, Ralph E. Oesper (Trad.), 6th ed., Elsevier: Amsterdam, 1972.

FEIGL F. & ANGER V.; Spot tests in organic analysis, Ralph E. Oesper (Trad.), 7th ed., Elsevier: Amsterdam, 1975.

FEIGL, F.; Spot Tests in Inorganic Analysis, 5th ed., Elsevier: Amsterdam, 1958.

FOLEY, J.; Computer Graphics: Principles and Practice, 2nd ed., Addison-Wesley Publishing Company: Massachusetts, 1990.

FOLHA (2007) Leite adulterado era vendido para Parmalat e Calu, diz PF. Disponível em <<https://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2007/10/338822-leite-adulterado-era-vendido-para-parmalat-e-calu-diz-pf.shtml>>. Acesso em março de 2020.

G1. MP faz nova operação contra fraude no leite e prende suspeitos no RS. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2013/05/ministerio-publico-faz-nova-operacao-contradulteracao-do-leite-no-rs.html>> Acesso em: 29 nov. 2020.

GARCIA, Jerusa Simone et al. Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS. *Food Chemistry*, v. 131, n. 2, p. 722-726, 2012.

GLOBO (2017). *Quadrilha usava soda cáustica e outras substâncias para adulterar leite* Disponível em <<http://g1.globo.com/hora1/noticia/2017/03/quadrilha-usava-soda-caustica-e-outras-substancias-para-adulterar-leite.html>>. Acessado em março de 2020.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital Image Processing*. Boston, MA, USA: Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., 1992. ISBN 0201508036.

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

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; EDDINS, S. L. *Digital Image Processing using MATLAB*. 1a ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall, 2004. p. 609.

H. ZOLLINGER, *Color Chemistry* (Wiley-VCH, Weinheim, 2001), 550 p.

HOORFAR J. *Case Studies in Food Safety and Authenticity: Lessons from Real-Life Situations* (1st ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge (2012) pp. 408.

<https://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/download/202765/TAOS/TCS230.html>

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, *Pesquisa da Pecuária Municipal 2018*. Prod. Pec. Mun., Rio de Janeiro, v. 46, p.1-8, 2018

JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2681-2692, 1998.

JUNGREIS, E. *Spot Test Analysis: clinical, environmental, forensic and geochemical applications*. Vol. 75, John Willey & Sons, 1926.

KAMTHANIA M, SAXENA J, SAXENA K, SHARMA DK. *Methods of Detection & Remedial Measures*. *Int J Eng Tech Res*. 2014. 1:15–20.

KIRSCH R. A., "Precision and accuracy in scientific imaging," *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 115, no. 3, 2010.

KIRSCH R. A., L. CAHN, C. RAY, G. H. URBAN, "Experiments in processing pictorial information with a digital computer", *Eastern Joint Comp. Conf.*, pp. 221-229, 1957.

KITAURA M.; YATA K., YAMADA S., to Minolta Camera Kabushiki Kaisha. *Digital indicator for cameras*. 3,895,875, 7-22-75, Cl. 356-226.000.

KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M.; RAVAEI, F. Simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe(III) using a computer controlled hand-scanner". *Analytica Chimica Acta*. 471(1): 97, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Ed. Sarvier. Cap3. p. 159-188, 1995.

LIMA, M. J. A. et al.. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 157, p. 105042, 2020.

LUŠTICA A., "CCD and CMOS image sensors in new HD cameras," Proceedings ELMAR-2011, Zadar, 2011, pp. 133-136.

LUTHER J.L., FRAHAN V.H., LIEBERMAN M. Paper test card for detection of adulterated milk Analytical Methods, 9 (38) (2017), pp. 5674-5683, 10.1039/c7ay01321c View Record in Scopus Google Scholar

LYRA WS et al. (2011) Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital 6. image-based (webcam) flame emission spectrometric method. Anal Methods 3:1975–1980

MAGNAN P. 2003. Detection of visible photons in CCD and CMOS: A comparative view. Nucl Instrum Methods Phys Res A 504:199–212.

MASAWAT P., HARFIELD A., NAMWONG A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk Food Chem., 184 (2015), pp. 23-29

MATIAS, A. A.; VILA, M. D. C. & TUBINO, M. "Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations". J. Braz. Chem. Soc. 15(2): 327, 2004.

MITCHELL, William J. The reconfigured eye: visual truth in the post-photographic era. Cambridge: MIT Press, 1994.

MOORE, J. C.; SPINK J.; LIPP, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. J. Food Sci., 77: R118-R126, 2011.

National Institute of Standards and Technology. NIST. "Fiftieth Anniversary of First Digital Image Marked". NIST. < <https://www.nist.gov/news-events/news/2007/05/fiftieth-anniversary-first-digital-image-marked> > Acesso em 09 abril de 2020

NEUMANN C.; HARRIS DM, ROGERS L. M. (2002) Contribution of animal source foods in improving diet quality and function in children in the developing world. Nutrition Research, 22(1): 193-220.

PACIORNIK, S. ; YALLOUZ, A. V. ; CAMPOS, R. C. ; GANNERMAN, D. Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests. Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo, v. 17, n.1, p. 156-161, 2006.

PESSOA, K. D. et al. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. SPECTROCHIMICA ACTA PART A-MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY, v. 185, p. 310-316-316, 2017.

POONIA, A. et al. Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology*, v. 70, n. 1, p. 23-42, 2017.

PRATT, W. K. *Digital Image Processing*. 2a ed. New York, John Wiley, 1991. p. 698.

RAY, L., & KIRSCH, R. (1957). Finding Chemical Records by Digital Computers. *Science*, 126(3278), 814-819. Retrieved April 4, 2020, from www.jstor.org/stable/1753764

ROIJERS, A. F. M.; TAS, M. M. The determination of urea with p-dimethylaminobenzaldehyde. *Clinica Chimica Acta*, v. 9, n. 3, p. 197–202, 1964.

RUSS, J.C.; *Image Processing Handbook*, CRC Press: New York, 1992.

SABNIS R. W. (2007). *Handbook of Acid-Base Indicators*.

SAH, CHIH-TANG; WANLASS, FRANK (1963). "Nanowatt logic using field-effect metal-oxide semiconductor triodes". 1963 IEEE International Solid-State Circuits Conference. Digest of Technical Papers. VI: 32–33. doi:10.1109/ISSCC.1963.1157450.

SALVE M et al. Quantifying colorimetric assays in μ PAD for milk adulterants detection using colorimetric android application” *Micro & Nano Letters*, 2018, Vol. 13, 111, pp. 1520–1524.

SANTOS, P. M.; WENTZELL, P. D.; PEREIRA-FILHO, E. R. “Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow’s Milk.” *Food Analytical Methods*. 5(1): 89, 2012.

SANTOS, V. B. et al.. Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. *FOOD CHEMISTRY*, v. 285, p. 340-346, 2019.

SANTOS, P. M. Aplicação de imagens digitais e técnicas espectro analíticas combinadas com quimiometria para a detecção e quantificação de adulteração em leite bovino. Tese de Doutorado. USP-São Carlos – SP, 2013.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.. Digital image analysis - an alternative tool for monitoring milk authenticity. *Analytical Methods*, v. 5, n. 15, p. 3669-3674, 2013.

SCURI, A. E. *Fundamentos da Imagem Digital*. Tecgraf, Rio de Janeiro, 2002. Disponível

em:<<http://www.tecgraf.pucRio.br/ortoledo/teaching/cg1/apostila%20imagem%20digital>>. Acesso em: 28 dez. 2020.

SENA, R. C. et al. A simple method based on the application of a CCD camera as a sensor to detect low concentrations of barium sulfate in suspension. *Sensors*, v. 11, p. 864-875, 2011

SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R.P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. *FOOD CONTROL*, v. 115, p. 107299, 2020.

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

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007. 999p.

SONKA, M.; HLAVAC, V. e BOYLE, R. *Image Processing Analysis and Machine Vision*. London: Chapman & Hall, 1993. P 25.

SONKA, M.; *Image Processing, Analysis, and Machine Vision*, PWD Publishing: New York, 1999.

SOUZA S.S. et al. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach *Food Chemistry*, 124 (2011), pp. 692-695

STATISTA(2018) Disponível em <<https://www.statista.com/statistics/268191/cow-milk-production-worldwide-top-producers/>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

TOLEDO, P. R. A. B.; TOCI, A. T.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Fast and simple method for identification of adulteration of cow's milk with urea using diffuse reflectance spectroscopy. *Analytical Methods*, v. 9, p. 6357-6364, 2017.

TORINI, J.C. Determinação da temperatura para inativação da urease em amostras de casca e farelo de soja. 2009. 35 fls. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Química) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências, 2009.

UOL (2014). Operação desmonta esquema de empresas que adulteravam leite no Sul. Disponível em <<http://noticias.uol.com.br/cotidiano/ultimas-noticias/2013/05/08/operacao-desmonta-esquema-de-empresas-que-fraudavam-leite-no-sul.htm>>. Acesso em: 03 mar. 2020.

VIPIN K G., AULAKH R S, TOMAR S S. Novel Method for The Determination of Preservative (Formaldehyde) in Bovine Milk Through Smart Phone-Based Colorimetric Technology. *The Indian Journal of Veterinary – Sciences and Biotechnology* - Vol 15, No 02 (2019)

WONGWILAI, W. et al. Webcam camera as a detector for a simple lab -on- chip time-based approach. *Talanta*. 2010; 81: 1137-1141.

ZERAIK A. E. et al. (2008) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Quim Nov.* 31:731–734.

ZHELEZNYAK A.G., SIDOROV V.G. Flatbed scanner as an instrument for physical studies, *St. Petersburg Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics*, 1 (2015), pp. 134-141.

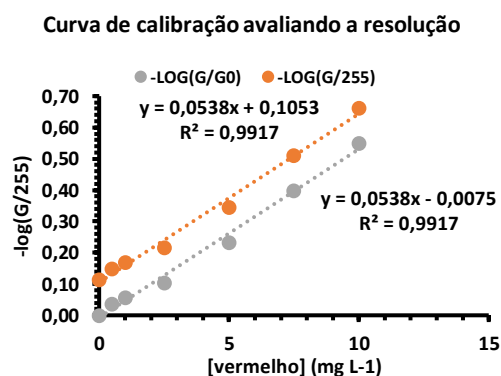
ANEXO I

1. ESTUDO DO TRATAMENTO DAS VARIÁVEIS *R*, *G* E *B*

No tratamento aplicado em dados de uma curva de 0 a 10 mg L⁻¹ de corante vermelho (Tabela 1A) não se observou diferença em sua sensibilidade, uma vez que ambos apresentam o mesmo coeficiente angular (curvas com tendências lineares e paralelas).

Tabela 1A – Resultados das intensidades médias da variável *G* e normalizados para a curva analítica para o corante vermelho de 0 a 10 mg L⁻¹ utilizando o Sistema I avaliando-se em 300 DPI de resolução

mg L ⁻¹	<i>G</i> (n=3) ± DP	-LOG(<i>G</i> /255) ± DP	-LOG(<i>G</i> / <i>G</i> ₀) ± DP
0,0	196,67 ± 0,58	0,113 ± 0,001	0,000 ± 0,000
0,5	181,00 ± 0,00	0,149 ± 0,000	0,036 ± 0,001
1,0	173,00 ± 3,61	0,169 ± 0,009	0,056 ± 0,010
2,5	158,33 ± 1,53	0,217 ± 0,004	0,104 ± 0,003
5,0	115,33 ± 0,58	0,345 ± 0,002	0,232 ± 0,002
7,5	78,67 ± 0,58	0,511 ± 0,003	0,398 ± 0,004
10,0	55,67 ± 2,08	0,661 ± 0,016	0,548 ± 0,015
Modelo	$yG = -14,097xG + 190,32$	$yG = 0,0538xG + 0,1035$	$yG = 0,0538xG - 0,0075$



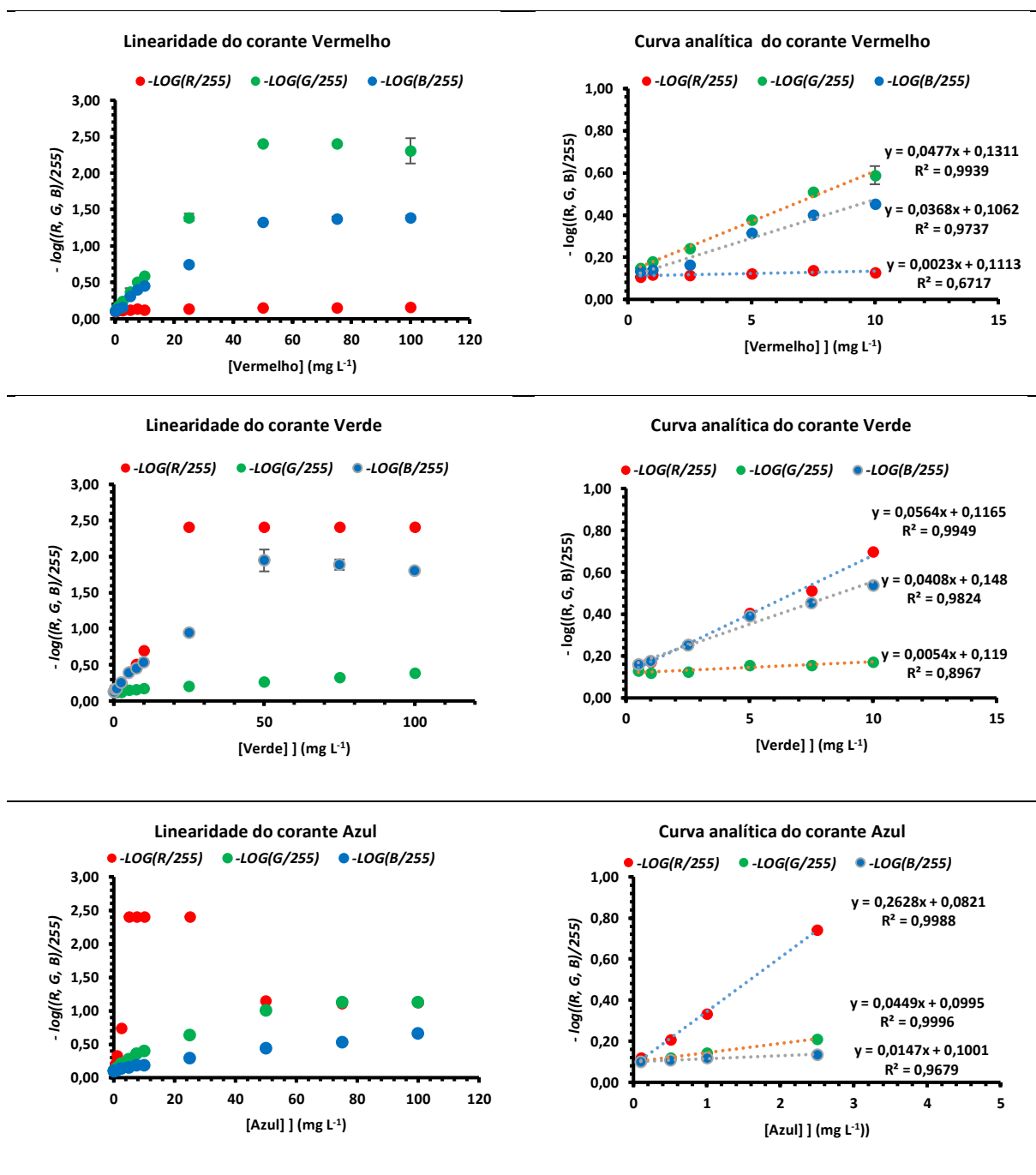
Fonte: Próprio autor - Grupo DIA – UEL (2021).

Observa-se que não houve diferenças para os valores normalizados com relação a sensibilidade. Entretanto, é possível que quando se o branco analítico estiver com cores mais intensas em que *R*₀, *G*₀ e *B*₀, tenham valores maiores que o *R*, *G*, *B* o resultado se tornem negativos (-log(*x*>1)), mostrando que o sinal refletido é maior do que o da fonte de luz incidente.

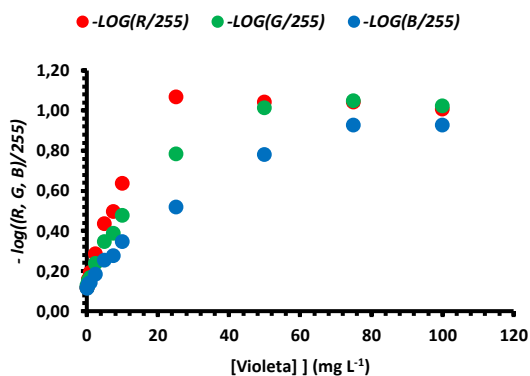
2. LINEARIDADE DOS SEIS CORANTES PARA AS VARIÁVEIS R, G E B

2.1. LINEARIDADE, FAIXA DE TRABALHO E CURVAS ANALÍTICAS EMPREGANDO O SISTEMA I

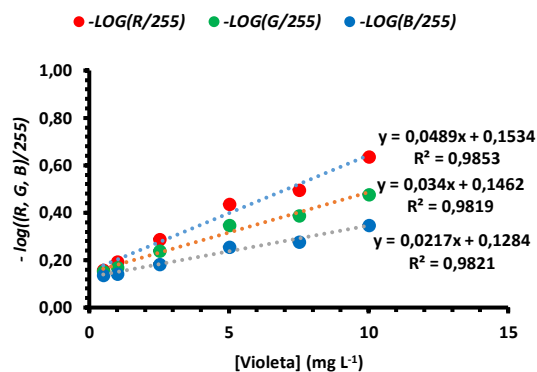
Figura A2- Linearidade e curvas analíticas dos 6 corantes alimentícios estudados utilizadas na calibração do Sistema I desenvolvido



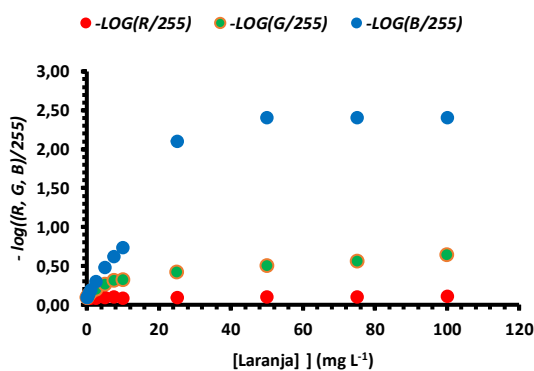
Linearidade do corante Violeta



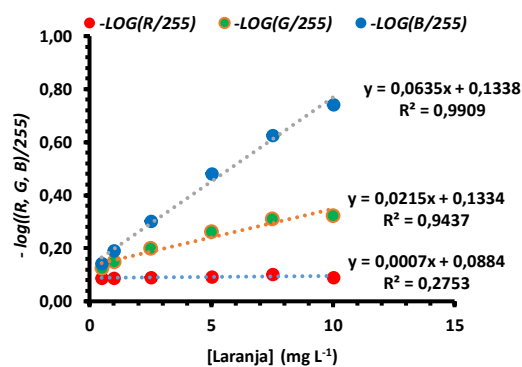
Curva analítica do corante Violeta



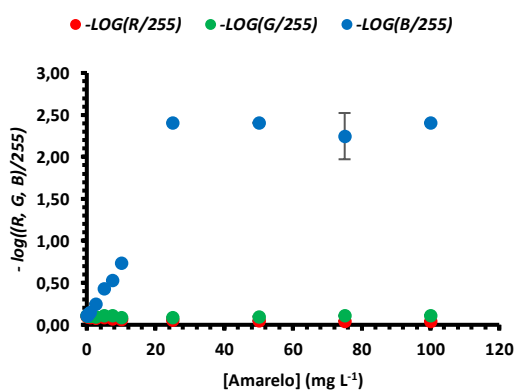
Linearidade do corante Laranja



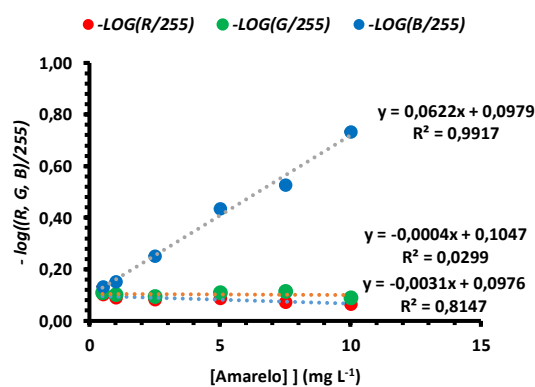
Curva analítica do corante Laranja



Linearidade do corante Amarelo

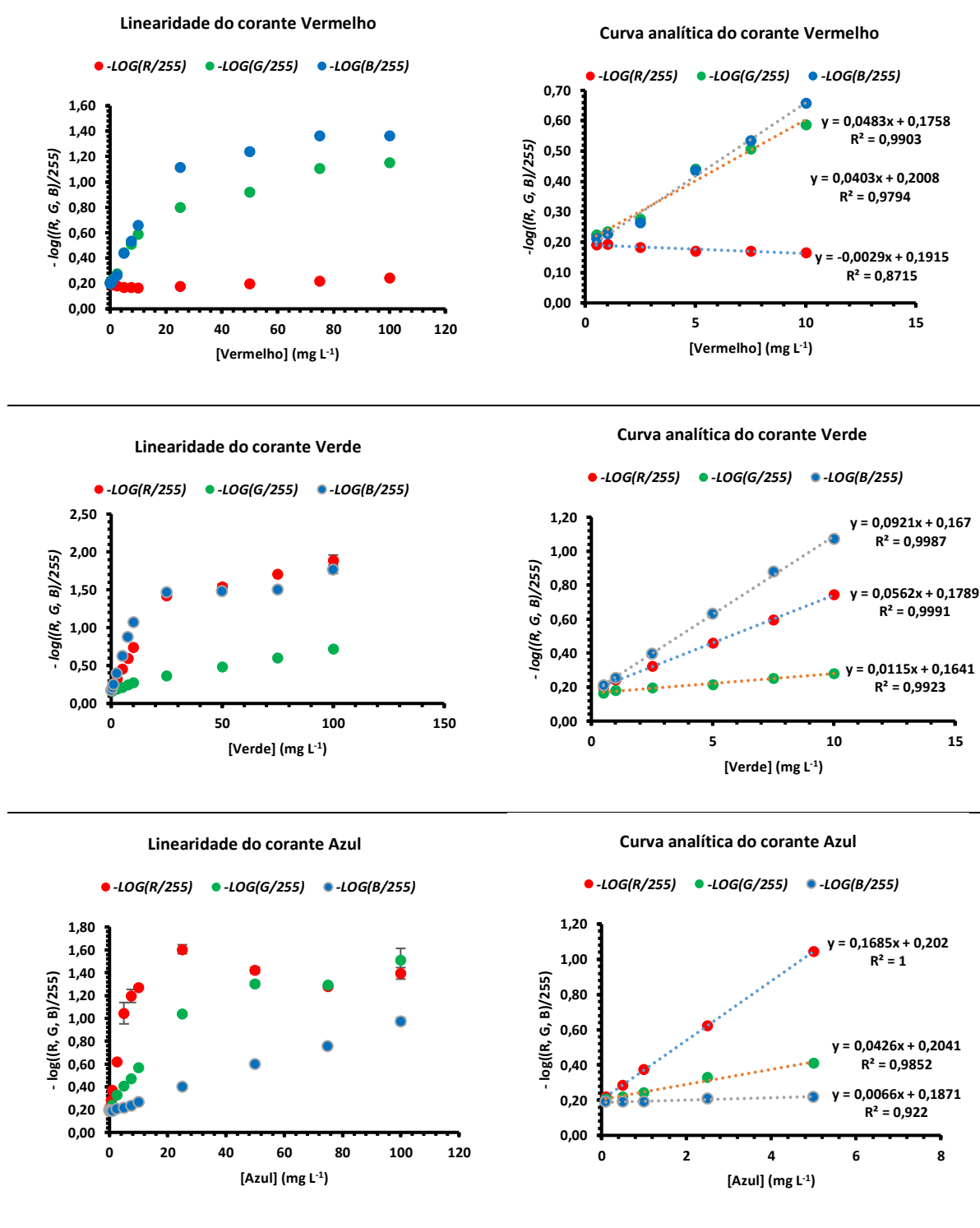


Curva analítica do corante Amarelo

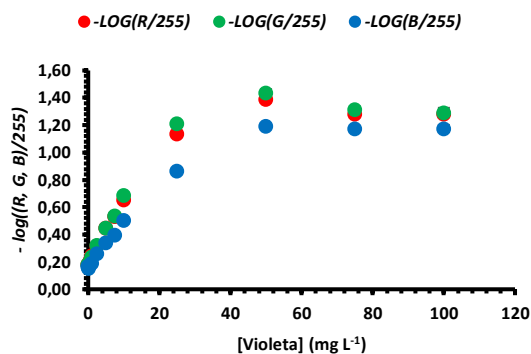


2.3. LINEARIDADE, FAIXA DE TRABALHO E CURVAS ANALÍTICAS EMPREGANDO O SISTEMA II

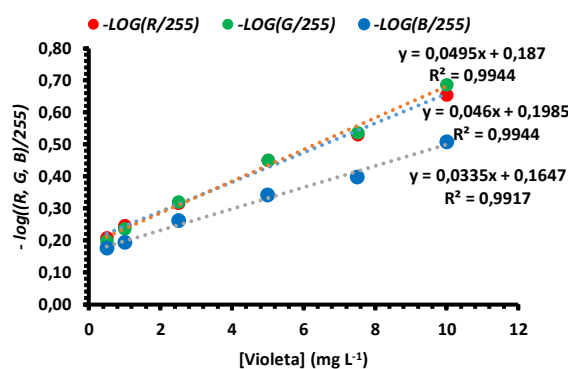
Figura A3 - Linearidade e curvas analíticas utilizadas na calibração do Sistema II



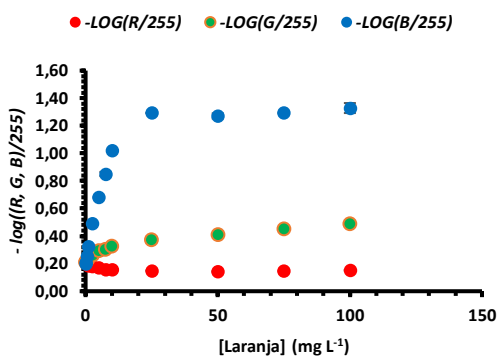
Linearidade do corante Violeta



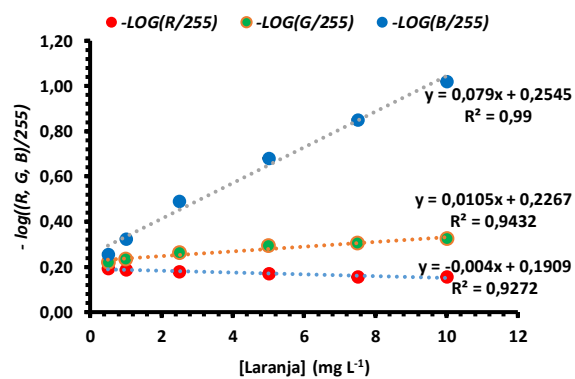
Curva analítica do corante Violeta



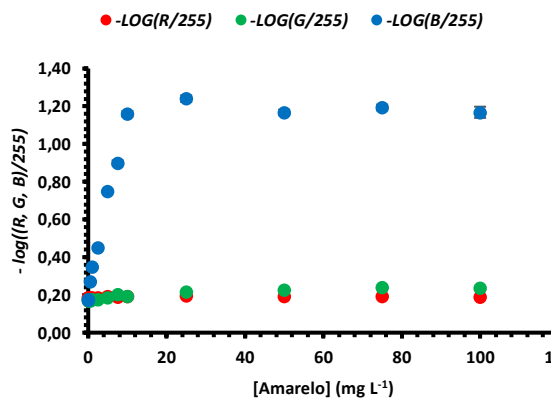
Linearidade do corante Laranja



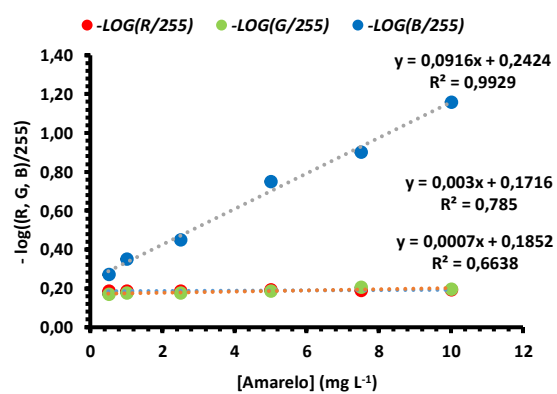
Curva analítica do corante Laranja



Linearidade do corante Amarelo

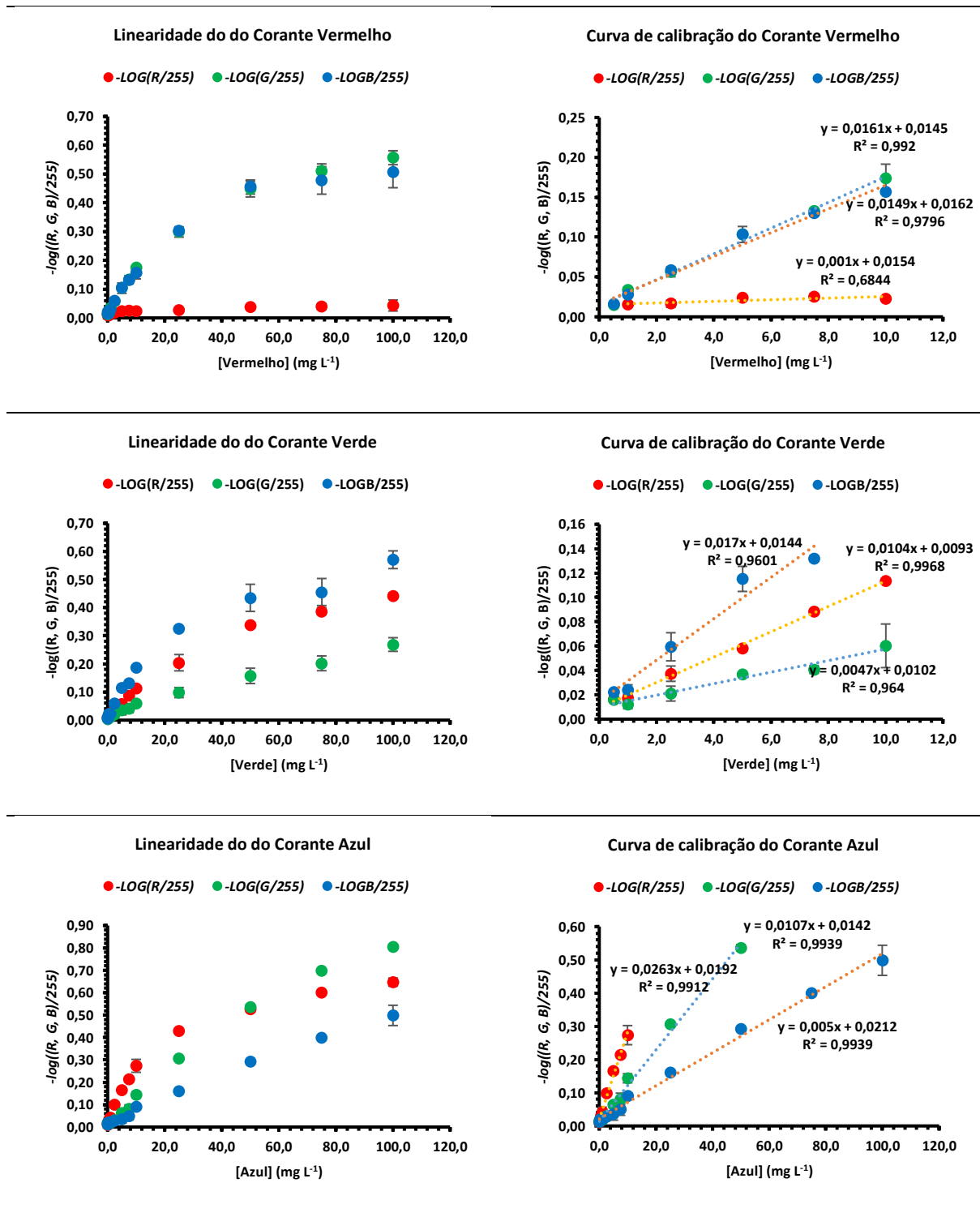


Curva analítica do corante Amarelo

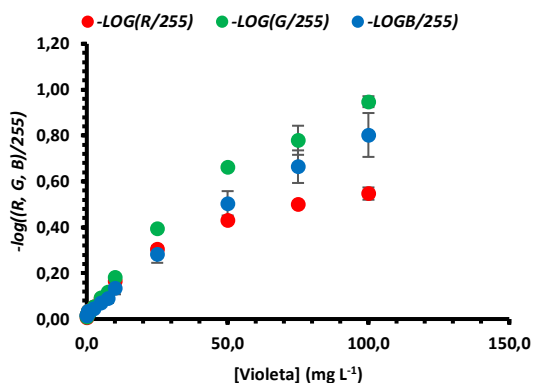


2.4. LINEARIDADE, FAIXA DE TRABALHO E CURVAS ANALÍTICAS EMPREGANDO O SISTEMA III

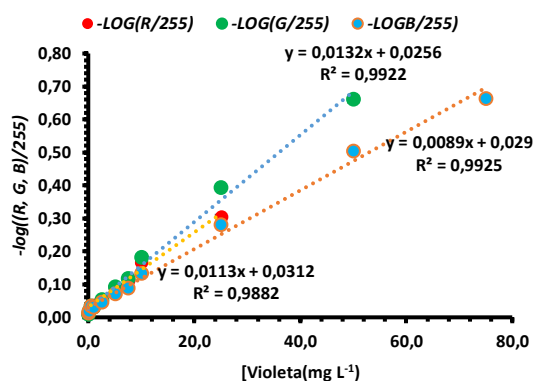
Figura A3 - Linearidade e curvas analíticas utilizadas na calibração do Sistema III



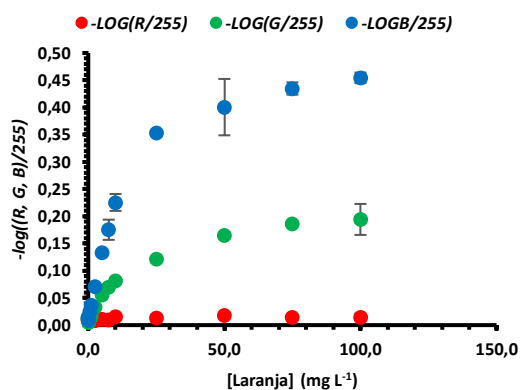
Linearidade do Corante Violeta



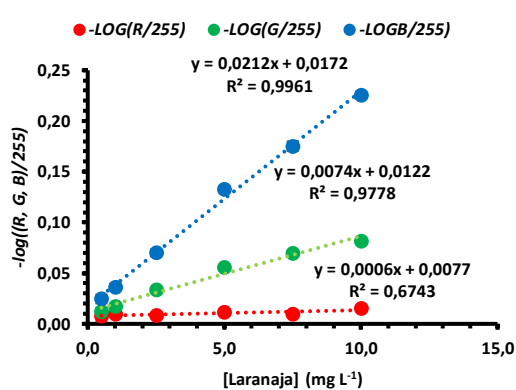
Curva de calibração do Corante Violeta



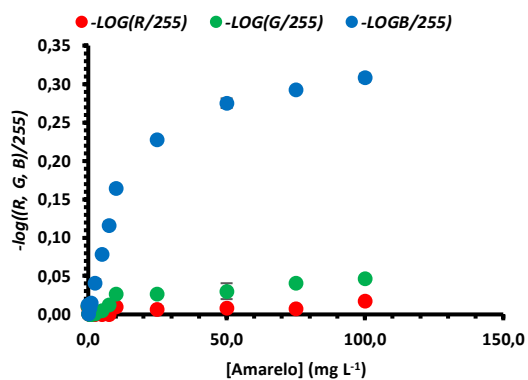
Linearidade do Corante Laranja



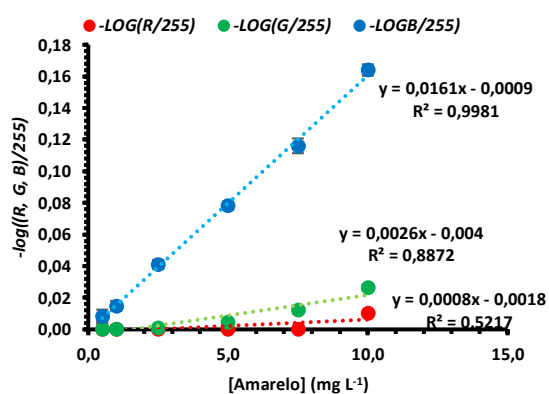
Curva de calibração do Corante Laranja



Linearidade do Corante Amarelo



Curva de calibração do Corante Amarelo



ANEXO II – PRODUÇÃO CIÊNTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

ARTIGOS PUBLICADOS:

1. FERNANDES, MARIA THEREZA CARLOS; GUERGOLETTI, KARLA BIGETTI ; **WATANABE, LYCIO SHINJI ; NIXDORF, SUZANA LUCY** ; OLIVEIRA, ADMILTON GONÇALVES DE ; GARCIA, Sandra . Milk with Juçara (*Euterpe edulis Martius*) Pulp: Fermentation by *L. reuteri* LR92 and Reuterin Production in Situ. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY (ONLINE), v. 63, p. e20190286, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190286>

ISSN 1678-4324- QUALIS B4 Química

2. ALMEIDA, M. B. ; MADEIRA, T. B. ; **WATANABE, L. S.** ; MELETTI, P. C. ; **NIXDORF, S. L.** . Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target Method Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 1, p. 1-10, 2019. **ISSN 0103-5053 QUALIS A2 Química**

3. GONZAGA, NATALIA; **WATANABE, LYCIO SHINJI**; MAREZE, JULIANA; MADEIRA, TIAGO BERVELIERI; TAMANINI, RONALDO; RIOS, EDSON ANTONIO; **NIXDORF, SUZANA LUCY**; BELOTI, VANERLI. Green method using water for lactose and lactulose extraction and determination in milk by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 1, p. 108288-108307, 2019. **ISSN 0023-6438 – FI 4,006 - QUALIS B1 Química**

4. CARLOS COLOMBO, RONAN ; RUFFO ROBERTO, SERGIO ; **LUCY NIXDORF, SUZANA** ; PÉREZ-NAVARRO, JOSÉ ; GÓMEZ-ALONSO, SERGIO ; MENA-MORALES, ADELA ; GARCÍA-ROMERO, ESTEBAN ; SIMÕES AZEREDO GONÇALVES, LEANDRO ; APARECIDA DA CRUZ, MARIA ; ULIAN DE CARVALHO, DEIVED ; BERVELIERI MADEIRA, TIAGO ; **SHINJI WATANABE, LYCIO** ; TEODORO DE SOUZA, REGINALDO ; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, ISIDRO. Analysis of the phenolic composition and yield of -BRS Vitoria? seedless table grape under different bunch densities using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, v. 130, p. 108955-108970, 2019. **ISSN 0963-9969 – QUALIS A2 Química**

5. **WATANABE, L. S.** ; BOVOLENTA, Y. R. ; ACQUARO JUNIOR, V. R. ; BARBIN, D. F. ; MADEIRA, T. B. ; **NIXDORF, S. L.** . Investigation NIR spectra pre-processing methods combined with multivariate regression for industrial in process determination of powdered egg moisture. ACTA SCIENTIARUM-TECHNOLOGY, v. 40, p. 1-8, 2018. **ISSN 1806-2563 QUALIS B4 Química**

6. PINHEIRO, K. H.; **WATANABE, L. S.**; **NIXDORF, S. L.**; BARÃO, C. E.; PIMENTEL, T. C.; MATIOLI, G. ; DE MORAES, F. F. Cassava bagasse as a substrate to produce cyclodextrins. STARCH-STARKE, v. 70, p. 1-9, 2018. **ISSN 0038-9056 QUALIS B2 Química**

7. MADEIRA, T. B. ; SILVA, G. L. ; **WATANABE, L. S.** ; LOPES, C. T. ; MAZALLI, A.V.G. ; ALMEIDA, M. B. ; **NIXDORF, S. L.** . Método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD aplicado a café torrado e

moído. SCIENTIA CHROMATOGRAPHICA, v. 9, p. 160-170, 2017. **QUALIS C Química**

PEDIDO DE PATENTE NO INPI

BELOTI, V.; MAREZE, J.; **WATANABE, L. S.**; GONZAGA, N.; TAMANINI, R. ; **NIXDORF, S. L. Processo e kit para detecção rápida de formaldeído em leite utilizando um reagente. 2016**, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: **BR10201601886**, título: "Processo e kit para detecção rápida de formaldeído em leite utilizando um reagente" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 16/08/2016Instituição(ões) financiadora(s): LONDRILAB COMÉRCIO DE PRODUTOS MICROBIOLÓGICOS LTDA - EPP.

Transferência de tecnologia – FORMOL FREE – Contrato de Licenciamento com Royalties

BELOTI, V. ; GONZAGA, N.; MAREZE, J.; TAMANINI, R.; **WATANABE, L. S.** ; **NIXDORF, S. L.** . Formol Free. 2017.

PROGRAMAS DE COMPUTADOR COM REGISTRO CONCEDIDOS PELO INPI POR 50 ANOS

1. CAMARA, C. A. P. da ; MADEIRA, T. B. ; ALMEIDA, M. B. ; **NIXDORF, S. L.** ; **WATANABE, L. S.** ; RUIZ, R. M. . **Integra. 2018.**

Patente: Programa de Computador. Número do registro: **BR512018051675-0**, data de registro: 25/09/2018, título: "Integra", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

2. CAMARA, C. A. P. da; **NIXDORF, S. L.**; OLIVEIRA, L. L. G.; CORREA, A. C. ; **WATANABE, L. S.** ; RUIZ, R. M. . **QuantColour. 2018.**

Patente: Programa de Computador. Número do registro: **BR512018051796-0**, data de registro: 28/09/2018, título: "QuantColour", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

3. CAMARA, C. A. P. da; **NIXDORF, S. L.** ; CORREA, A. C. ; ALVES, J. C.; **WATANABE, L. S.** ; RUIZ, R. M. . **IonSelMeter. 2018.**

Patente: Programa de Computador. Número do registro: **BR512018051797-8**, data de registro: 28/09/2018, título: "IonSelMeter", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Artigo 1

Vol.63: e20190286, 2020
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190286>
 ISSN 1678-4324 Online Edition



Article - Agriculture, Agribusiness and Biotechnology

Milk with Juçara (*Euterpe edulis* Martius) Pulp: Fermentation by *L. reuteri* LR92 and Reuterin Production *in Situ*

Maria Thereza Carlos Fernandes^{1*}
<https://orcid.org/0000-0003-3285-2526>

Suzana Lucy Nixdorf²
<https://orcid.org/0000-0002-6016-8329>

Karla Bigetti Guergoletto¹
<https://orcid.org/0000-0002-8285-2711>

Admilton Gonçalves de Oliveira³
<https://orcid.org/0000-0003-1556-5146>

Lycio Shinji Watanabe²
<https://orcid.org/0000-0002-7049-9228>

Sandra Garcia¹
<https://orcid.org/0000-0003-3704-9222>

¹State University of Londrina, Department of Food Science and Technology, Londrina, Brazil; ²State University of Londrina, Department of Chemistry, Londrina, Brazil; ³State University of Londrina Department of Microbiology, Londrina, Brazil.

Received: 2019.05.06; Accepted: 2020.03.27.

*Correspondence: thereza.fernandes@hotmail.com; Tel.: ++55 43 3371-5962 (M.T.C.F.)

HIGHLIGHTS

- Production of 0.43 ± 0.01 mmol L⁻¹ of reuterin was detected in the product.
- *L. reuteri* presented viability of 6.2 log CFU/mL after 30 days of storage.
- After gastrointestinal simulation, the product presented 2.47 log CFU / mL of cells.
- Fermented milk with juçara pulp presented good sensory acceptance.

Abstract: This study aimed to develop and evaluate fermented milk by *Lactobacillus reuteri* LR92 with addition of juçara pulp (FMJ) and reuterin production *in situ*. The fermentation process was analyzed for 24 hours and the storage of FMJ for 30 days at 4 °C. During the fermentation, there was consumption of 25% (w / v) of lactose and increase of 0.01 to 0.85% (w / v) of lactic acid. The FMJ presented 0.43 ± 0.01 mM of reuterin, inhibiting *Staphylococcus aureus* strains under *in vitro* test. For the carbohydrates, the percentages (g.100g⁻¹) found were 7.31 ± 1.07 ; 9.19 ± 0.82 ; 1.60 ± 0.50 and 0.08 ± 0.00 for sucrose, lactose, galactose and fructose respectively. The survival of *L. reuteri*, present in FMJ, was 2.47 log CFU / mL after 6 hours of gastrointestinal simulation. In sensory analysis FMJ received a grade 7 for global acceptance indicating good acceptance of the product.

Keywords: functional food; lactic acid bacteria; gastrointestinal simulation; *Euterpe edulis*; antimicrobial; fermentative process.

INTRODUCTION

Fermentation is a traditional technique used for food production and preservation which provides foods with improvements in its safety, sensory, nutritional and functional attributes. Dairy products can be fermented by a diverse microbiota, and the use of probiotic cultures, such as *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri*, makes its functionality possible [1].

Artigo 2



<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190066>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-10, 2019
Printed in Brazil - ©2019 Sociedade Brasileira de Química

Article

Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target Method Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Mariana B. Almeida,^a Tiago B. Madeira,^a Lycio S. Watanabe,^a
Paulo Cesar Meletti^b and Suzana Lucy Nixdorf^{*a}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Rod. Celso Garcia Cid/Pr, 445, km 380, Campus Universitário, 86057-970 Londrina-PR, Brazil

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Rod. Celso Garcia Cid/Pr, 445, km 380, Campus Universitário, 86057-970 Londrina-PR, Brazil

The rises of toxic effects caused by pesticides are of concern. However, Brazilian legislation still needs scientific subsidies to improve the water quality requirements. This can be attributed in part to the few existing studies showing the occurrence and levels of multi-residue pesticides. Therefore, the objective of this study was to investigate the presence and the residue-levels of pesticides in surface, ground and drinking water of Tibagi River micro-basin in Paraná State, Brazil. Data obtained over a year for the physical-chemical parameters, screening and quantification, made by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), confirmed the contamination by several pesticides. Alarming concentrations of diuron and imazethapyr in a permanent preservation area and in groundwater were observed. The absence of legislation for most pesticides under study makes difficult the prohibition of their use and the control of their residue-levels on the environment. The results draw attention to further discussion and engagement around the pesticide regulations.

Keywords: residue level, environmental regulation, water quality requirements, diuron, imazethapyr

Introduction

Brazilian agriculture in the past few years has been growing and using an indiscriminate amount of pesticides to increase the crop yield becoming the main world's market.¹⁻⁵ During 2013, the most commercialized pesticides were glyphosate and atrazine, both herbicides. However, fungicides, insecticides, acaricides, nematocides, growth regulators, repellents, and biocides are also commonly used.⁶

It is recognized that the agronomic intensification associated with the use of pesticides increases the environmental impacts, usually observed through physico-chemical and microbiological parameters in water samples, for example. Consequently, the toxic effects on animals and humans, occupationally exposed, and to the environment also increase.^{4,7} Beyond the intensive use of different classes of pesticides, the lack of information and technical assistance in rural areas also contribute to soil and water contamination by the rural workers, as a result

of the incorrect discharge of residues during the clean-up of equipment and plastic containers on the environment.⁸

The pesticides disseminated throughout the environment have complex behavior, going through a variety of physics, chemistry and biological processes that generate metabolites and degradation products.⁹ Regardless of the concentrations, these products can present higher toxicity than the original compounds and may have a straight correlation with the increasing number of diseases, like cancer.¹⁰⁻¹⁴

Besides pesticides, the presence of other emerging contaminants in the environment, such as industrial compounds, pharmaceuticals, personal care products and disinfection by-products, results in negative effects in living organisms due to the non-target effect and contributes to increase surface and groundwater pollution.^{15,16} Recent studies have shown that the exposure of parents before a child's birth increases the risk of infant leukemia and Parkinson's disease to 70%.^{17,18}

At the South of Brazil, the Paraná State is known for the intensive production and commercialization of pesticides, occupying the third position according to the report made

*e-mail: snixdorf@uel.br

Artigo 3

LWT - Food Science and Technology 113 (2019) 108288



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Green method using water for lactose and lactulose extraction and determination in milk by high-performance liquid chromatography with refractive index detection



Natalia Gonzaga^a, Lycio Shinji Watanabe^b, Juliana Mareze^a, Tiago Bervelieri Madeira^b, Ronaldo Tamanini^a, Edson Antonio Rios^c, Suzana Lucy Nixdorf^{b,*}, Vanerli Beloti^a

^a Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária, Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina-PR, Brazil

^b Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química, Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina-PR, Brazil

^c National Institute of Science and Technology for the Dairy Production Chain (INCT-Leite), PO Box 10.011, Paraná, 86057-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Milk intolerance
Lactulose content
Lactose-free process
Fraud
Glucose

ABSTRACT

Lactose is the main carbohydrate found in milk. However, the ultra-high temperature (UHT) process might convert lactose to lactulose by isomerization. Lactulose can be prebiotic; nevertheless, at high concentrations, it can be fermented in the gastrointestinal tract because it is not hydrolyzed by enzymes. In view of the increase in lactose intolerant consumers, it becomes necessary to determine the presence and amounts these compounds in UHT milk. Hence, this study aims to propose and validate a method with simple sample preparation to measure lactose and lactulose contents in milk. Following green chemistry principles, the proposed method is distinguished by the use of only water in the extraction step, with an effective sample clean-up step performed via ultracentrifugation; likewise, water was also employed as the mobile phase for high-performance liquid chromatography with refractive index detection analysis. Moreover, the proposed method allows for the verification of the efficiency of the lactose-free milk process by monitoring lactose residual levels in addition to measuring the degradation contents of glucose and galactose. Further, the developed method even represents an alternative for detecting counterfeit milk made with added sucrose, ensuring the quality of milk for consumers.

1. Introduction

Lactose is the only carbohydrate found in milk. It is a disaccharide composed of glucose and galactose that is present at a concentration of approximately 40–50 g/L in cow's milk. The solubility of lactose is much less than that of other common sugars, presenting one tenth of the solubility of sucrose and one fifth of its sweetness (Brito & Giulietti, 2007). When lactose is ingested, the enzyme lactase, which is produced by the epithelial cells of the human intestine, hydrolyzes lactose into two monosaccharides (glucose and galactose), which can be absorbed. Approximately 75% of the world's population has intolerance to this sugar due to the total absence or deficiency of lactase, which results in an adverse reaction when the digestion of lactose is attempted (Mattar, Mazo, & Carrilho, 2012). If lactose is not hydrolyzed, it reaches the intestine and is fermented by microorganisms, causing abdominal

distension and a series of undesirable symptoms, such as nausea and abdominal pain (Deng, Misselwitz, Dai, & Fox, 2015; Vesa, Marteau, & Korpela, 2000; Zadow, 1984). Thus, the determination of lactose contents in lactose-free milk is helpful to indicate its absence or to show its total degradation into glucose and galactose.

However, heat treatments, such as ultra-high temperature (UHT) treatments, which reach temperatures between 130 and 150 °C, or even temperatures above 100 °C, induce several chemical reactions of milk components, such as the isomerization of lactose into lactulose (Parekh, Balakrishnan, Hati, & Aparnathi, 2016). Lactulose is a disaccharide consisting of galactose and fructose (Luzzana, Agnellini, Cremonesi, Caramenti, & De Vita, 2003) and was first synthesized by Montgomery and Hudson in 1930 (Tamura, Mizota, Kanagawa, & Tomita, 1993). Lactulose offers important benefits for human health, leading to its application as a pharmaceutical as well as a prebiotic food ingredient

* Corresponding author. P. O. Box: 10.011, Brazil

E-mail addresses: natalia_gonzaga@hotmail.com (N. Gonzaga), shinjiwatanabe2003@hotmail.com (L.S. Watanabe), juliana_mareze@hotmail.com (J. Mareze), madeiratb@gmail.com (T.B. Madeira), ronaldo.tamanini@gmail.com (R. Tamanini), edsonrios1@hotmail.com (E.A. Rios), snixdorf@uel.br, s.nixdorf@hotmail.com (S.L. Nixdorf), vanerlib@gmail.com (V. Beloti).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108288>

Received 19 February 2019; Received in revised form 7 June 2019; Accepted 18 June 2019

Available online 19 June 2019

0023-6438/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Exibir todos

Artigo 4

Food Research International 130 (2020) 108955



Analysis of the phenolic composition and yield of 'BRS Vitoria' seedless table grape under different bunch densities using HPLC–DAD–ESI–MS/MS

Ronan Carlos Colombo^a, Sergio Ruffo Roberto^{b,*}, Suzana Lucy Nixdorf^c, José Pérez-Navarro^d, Sergio Gómez-Alonso^d, Adela Mena-Morales^e, Esteban García-Romero^e, Leandro Simões Azeredo Gonçalves^b, Maria Aparecida da Cruz^b, Deived Uilian de Carvalho^b, Tiago Bervellieri Madeira^c, Lycio Shinji Watanabe^c, Reginaldo Teodoro de Souza^f, Isidro Hermosín-Gutiérrez^{d,1}

^a Agricultural Science Department, Federal Technological University of Paraná, 85601-970 Francisco Beltrão, PR, Brazil

^b Agricultural Research Center, Londrina State University, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

^c Development of Instrumentation and Analytical Automation Laboratory, Department of Chemistry, Londrina State University, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

^d Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Av. Camilo José Cela s/n, 13071 Ciudad Real, Spain

^e Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada y Forestal de Castilla-La Mancha (IRIAF), Ctra. Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Ciudad Real, Spain

^f Embrapa Grape and Wine, P.O. Box 130, ZIP 95700-00 Bento Gonçalves, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Vitis spp. Hybrid grapes
Cluster thinning
Crop management
Phenolic profile
Fruit quality

ABSTRACT

Grapes are considered to be a major source of phenolic compounds as compared with other fruits. To improve the quality of table grapes, some techniques like thinning can be used. In addition, grape cultivars with distinct characteristics are directly linked to its phenolic profile. This study aimed to identify and quantify the phenolic compound profile and yield of the hybrid 'BRS Vitoria' seedless table grape under different bunch densities, using a combination of solid-phase extraction (SPE) methodologies and analytical high-performance liquid chromatography–diode array detector with tandem mass spectrometry (HPLC–DAD–ESI–MS/MS). A trial was carried out in 2016, in a commercial vineyard at Marialva, state of Paraná (South Brazil). Three weeks after anthesis, the following bunch densities were evaluated: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, and 6 bunches per m² (corresponding to an estimation of 16, 18, 20, 22, and 24 tons ha⁻¹). The randomized block design was used as a statistical model with each treatment was replicated four times, with one vine per plot. Different characteristics were evaluated at harvest, e.g., soluble solids content (SS), total acidity (TA), maturation index (MI = SS/TA), bunch and berry masses, yield, as well hydroxycinnamic acid derivative (HCAD), anthocyanin, flavonol, and flavan-3-ol contents by HPLC–DAD–ESI–MS/MS analysts. The evaluated bunch densities did not interfere with the physicochemical characteristics of the berries, such as SS and MI. Under the density of 6.0 bunches per m², the highest yield of 25 tons ha⁻¹ was reached. Under all bunch densities, the phenolic profile presented the same compounds, but at different concentrations. Under a density of 5.0 bunches per m², the compounds belonging to the anthocyanin and flavonol families were present in high concentrations. In contrast, at the densities of 4.0 and 4.5 bunches per m², there was a reduction in the flavan-3-ol content. With respect to stilbenes, only the *trans-piceid* and its *cis*- isomer were detected. However, their concentrations had no significant influence on the evaluated bunch densities.

1. Introduction

Grapes are characterized by a wide variety of chemical compounds, and most of them have been related to therapeutic or health promoting properties (Georgiev, Ananga, & Tsoleva, 2014). Table grapes are one

of the most important sources of phenolic compounds, which neutralize free radicals (Orak, 2007; Rastija, Srećnik, & Saric, 2009). Phenolic compounds are secondary metabolites of plants playing a vital role in carrying out different physiological activities, and their concentration is subjected to genetic and environmental variations. In grapes, phenolic

* Corresponding author.

E-mail address: sroberto@uel.br (S.R. Roberto).

¹ In memoriam.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108955>

Received 4 September 2019; Received in revised form 20 December 2019; Accepted 22 December 2019

Available online 26 December 2019

0963-9969/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Artigo 5

Acta Scientiarum



http://periodicos.uem.br/ojs/acta
ISSN on-line: 1807-8864
Doi: 10.4025/actascitechnol.v40i1.30133

CHEMISTRY

Investigation of NIR spectra pre-processing methods combined with multivariate regression for determination of moisture in powdered industrial egg

Lycio Shinji Watanabe¹, Yuri Renan Bovolenta¹, Vinicius Ricardo Acquaro Junior¹, Douglas Fernandes Barbin², Tiago Bervelier Madeira¹ and Suzana Lucy Nixdorf^{1*}

¹Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, km 380, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil.

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. *Author for correspondence. E-mail: snixdorf@uel.br

ABSTRACT. High productivity and meantime perishability of *in natura* eggs, make powdered egg attractive for patisseries and pasta industries. Water reduction in 65%, extends shelf life from 1 to 12 months, preventing also *Salmonella*. Maximum powdered egg moisture allowed by Brazilian law is 6.0% (w w⁻¹). However, its determination by reference technique (oven at 105°C for 8 hour) is lengthy for processing industry. Therefore, the purpose of this study was to investigate the influence of several spectral pre-processing techniques in the application of near-infrared spectroscopy associated with chemometrics models for determination of moisture content in powdered egg, without the need of sample preparation and destruction, held at 0.5 min. Several pre-treatment techniques were evaluated to ensure spectral data reliability such as: standard normal variation; multiplicative scatter correction; smoothing and detrend. The principal component regression (PCR) and partial least squares (PLS) were evaluated with and without pre-treatment. The best results were observed in NIR/PLS model (49 samples), providing an adequate correlation (r) of 0.96, for cross-validation. Using 21 samples as prediction set, NIR/PLS showed relative error (RE) < 2.0%, compared to primary methods oven and thermobalance, indicating to be suitable for industrial quality control.

Keywords: chemometrics, near-infrared spectroscopy (NIRS), thermobalance, oven reference method, calibration model, PLS.

Investigação de métodos de pré-processamento em espectros NIR combinados com regressão multivariada para determinação de umidade em ovo em pó industrial

RESUMO. A alta produtividade e perecibilidade dos ovos *in natura* torna o ovo em pó atraente para o uso em confeitarias e indústrias de massas. A redução em 65% de água estende a vida de prateleira do produto de 1 para 12 meses, prevenindo a *Salmonella*. Pela legislação brasileira, a umidade máxima permitida para o ovo desidratado é de 6% (m m⁻¹). Entretanto, sua determinação por técnica de referência (estufa a 105°C por 8h) demanda um tempo muito longo para seu uso em processo. Portanto, este estudo teve como propósito avaliar a viabilidade da aplicação da espectroscopia do infravermelho próximo, associada a modelos quimiométricos na determinação da umidade do ovo em pó, feita em 0,5 min., sem a necessidade do preparo e nem destruição de amostra. Pré-tratamentos foram avaliados com intuito de aumentar a confiabilidade dos dados espectrais do modelo de calibração: variação de padrão normal; correção multiplicativa de sinal; e alisamentos. Regressões por componentes principais (PCR) e por mínimos quadrados parciais (PLS) foram avaliadas, juntamente com os pré-tratamentos. Os melhores resultados foram observados na modelagem PLS (49 espectros), apresentando um coeficiente de correlação (r) de 0,96 para a validação cruzada. O conjunto preditor (21 amostras) mostrou um erro relativo (ER) < 2,0% para o modelo NIR/PLS, comparado à estufa e à termobalança, mostrando-se adequado para o controle de qualidade industrial.

Palavras-chaves: quimiometria, espectroscopia no infravermelho-próximo (NIR), termobalança, estufa - método de referência, modelo de calibração, PLS.

Introduction

Egg is composed of countless nutrients. It is rich in proteins and has been for a long time subject of

nutritional studies involving amino acids (Tesedo, Barrado, Sanz, Tesedo, & De La Rose, 2006). However, water is the major component of chicken

Artigo 6

Research Article

Cassava bagasse as a substrate to produce cyclodextrins[†]

Keren Hapuque Pinheiro^{a,c}, Lycio Shinji Watanabe^b, Suzana Lucy Nixdorf^b, Carlos Eduardo Barão^c, Tatiana Colombo Pimentel^c, Graciete Matioli^c, Flavio Faria de Moraes^a

^aDepartment of Chemical Engineering, State University of Maringá (UEM), Maringá, Brazil. Tel.: +554430114770. E-mail: keren.pinheiro@ifpr.edu.br and ffariamoraes@gmail.com

^bDepartament of Chemistry, State University of Londrina (UEL), Brazil, Tel.: +554333714836. E-mails: shinjiwatanabe2003@hotmail.com and snixdorf@uel.br.

^cDepartment of Food Production, Federal Institute of Parana (IFPR) - Campus Paranavaí, Brazil. Tel.: +554434820109. E-mails:tatiana.pimentel@ifpr.edu.br and carlos.barao@ifpr.edu.br

^dDepartment of Pharmacy, State University of Maringá (UEM), Maringá, Brazil. Tel.: +554430114385. E-mail: gmatioli@uem.br

[†]This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/star.201800073].

This article is protected by copyright. All rights reserved.
Received: February 25, 2018 / Revised: April 28, 2018 / Accepted: May 4, 2018

Accepted Article

Artigo 7

Scientia Chromatographica 2017; 9(3):160-170
 Instituto Internacional de Cromatografia
<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2017.013>
 ISSN 1984-4433

HPLC

Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído

Development, validation and application of a rapid and sensitive method for determining trigonelline and caffeine by UHPLC-DAD present in roasted and ground coffee

Tiago Bervelieri Madeira, Giselle Lopes Silva, Lycio Shinji Watanabe, Caroline Teixeira Lopes, Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, Mariana Bortholazzi Almeida, Suzana Lucy Nixdorf*

Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica (DIA), Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia CID, Pr 445, Km 380 CEP 86.057-970-Londrina, PR, Brasil

*snixdorf@uel.br

Recebido: 04/09/2017

Aceito: 01/11/2017

Resumo

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas de grande importância biológica. Estão presentes em inúmeros alimentos e fármacos, atuando de diferentes maneiras, com ação estimulante, sendo precursores de compostos bioativos e, como pró-fármacos. Despertam crescente interesse na determinação de seus teores pela diversidade de aplicações, sendo utilizados, por exemplo, como marcadores na diferenciação entre café arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). Por este motivo, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método cromatográfico sensível para determinação rápida de trigonelina e cafeína em café por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD). O método desenvolvido foi validado segundo a RE 899/2003 da ANVISA e, aplicado na análise de cafés do tipo torrado e moído comerciais. O método mostrou-se adequado para todas as figuras de mérito, com faixa linear de trabalho de 0,20 a 2,00 % (m/m) para a trigonelina e de 0,60 a 6,00 % (m/m) para a cafeína, com limites de quantificação de 0,03 e 0,06 % (m/m) e de detecção de 0,01 e 0,02 % (m/m), respectivamente. Quanto à precisão apresentou repetitividade com desvio padrão relativo (DPR) de 0,12% para a trigonelina e 0,55% para a cafeína, e DPR para a precisão intermediária respectivamente de 0,52 e 1,14% (m/m), apresentando exatidão média de 99,80% em 3 níveis de concentração baixa, média e alta, para ambos os compostos. O método destina-se a auxiliar no controle de qualidade de cafés torrado e moído comerciais.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, blends de café, desenvolvimento de métodos, validação.

Abstract

Trigonelline and caffeine are alkaloids from the group of xanthines of great biological importance. They are found in numerous foods and drugs, acting in different ways, with stimulating action, being precursors of bioactive compounds and, as prodrugs. They arouse growing interest in their contents determination by the diversity of applications, being used, for example, as markers in the differentiation between arabica coffee (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*). For this reason, this study proposed the development of a sensitive chromatographic method for the rapid determination of trigonelline and caffeine in coffee by ultra high-performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD). The developed

Pedido de Patente

PROCESSO E KIT PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE
UTILIZANDO UM REAGENTE



16/08/2016

870160044161

14:40



00.000.2.2.16.0605881.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição
de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 018864 4

DADOS DO DEPOSITANTE (71)


Depositante 1 de 2


Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA


Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

Transferência de Tecnologia com Royalties

Contrato de Licenciamento (UEL e LONDRILAB) assinado (2).pdf 1 / 10

 **UNIVERSIDADE**
Estadual de Londrina





**CONTRATO DE LICENCIAMENTO PARA
EXPLORAÇÃO DE CRIAÇÃO CONSUBSTANCIADA
NO PEDIDO DE PATENTE QUE ENTRE SI
CELEBRAM UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA EA LONDRILAB COMÉRCIO DE
PRODUTOS MICROBIOLÓGICOS LTDA-EPP.**

Pelo presente instrumento particular de um lado Universidade Estadual de Londrina, pessoa jurídica de direito público inscrita no CNPJ sob o nº 78.640.489/0001-53; com sede no Campus Universitário, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, doravante denominada **UNIVERSIDADE**, neste ato representada por sua Reitora, Profª. Drª. Berenice Quinzani Jordão, brasileira, divorciada, portadora da cédula de identidade nº 60701116-x e inscrita no CPF/MF sob o nº 364.796.169-87, por intermédio da **AINTEC – Agência de Inovação Tecnológica da UEL**, Órgão de Apoio da UEL, com sede no mesmo endereço acima, neste ato representada pelo seu Diretor Prof. Dr. Edson Antonio Miura, portador do RG nº 76909580 – PR, delegado pela Portaria da UEL nº. 3039 de 10 de junho de 2014e de outro lado Londrilab Comércio de Produtos Microbiológicos Ltda - EPP, inscrita no CNPJ sob o nº19.946.793/0001-64, com sede na Av. Inglaterra, 385, Jardim Igapó, CEP 86046-000, neste ato representada por Clodoaldo Trainotti, sócio-gerente, residente e domiciliado à rua Maria de Lourdes Cardoso

Contrato de Licenc...pdf 12. Fluxo de Caixa...png Contrato de Licenc...pdf 1326.2020.00704.pdf 6447_2018007802...pdf Exibir todos X

16:46
27/02/2020

Software Registrado INPI – 1 - Integra



INPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512018051796-0**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 19/04/2018, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: QuantColour

Data de criação: 19/04/2018

Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Autor(es): CARLOS ALBERTO PAULINETTI DA CAMARA; SUZANA LUCY NIXDORF; LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA; ALAN CARLOS CORREA; LYCIO SHINJI WATANABE; RENAN MENDES RUIZ

Linguagem: VISUAL BASIC

Campo de aplicação: FQ-12; FQ-14; FQ-15

Tipo de programa: IT-04

Algoritmo hash: SHA-256

Resumo digital hash: 746AD23E57D23CCBEE8CF2DE764493AE07236865647AB7A2169D64DFC68E2241

Expedido em: 02/10/2018



Software Registrado INPI – 2 - QuantColour



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512018051797-8**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 15/06/2018, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: IonSelMeter

Data de criação: 15/06/2018

Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Autor(es): CARLOS ALBERTO PAULINETTI DA CAMARA; SUZANA LUCY NIXDORF; ALAN CARLOS CORREA; JOÃO CARLOS ALVES; LYCIO SHINJI WATANABE; RENAN MENDES RUIZ; VANESSA DE ALVARENGA

Linguagem: VISUAL BASIC

Campo de aplicação: FQ-14; FQ-15

Tipo de programa: IT-04

Algoritmo hash: SHA-256

Resumo digital hash: 357F8F8DD7FEE7516E66C19312BB042ABE7434728D8EFF20913CB426D5492BFE

Expedido em: 02/10/2018

15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889

Software Registrado INPI – 3 - IonSelMeter



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512018051797-8**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 15/06/2018, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: IonSelMeter

Data de criação: 15/06/2018

Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Autor(es): CARLOS ALBERTO PAULINETTI DA CAMARA; SUZANA LUCY NIXDORF; ALAN CARLOS CORREA; JOÃO CARLOS ALVES; LYCIO SHINJI WATANABE; RENAN MENDES RUIZ; VANESSA DE ALVARENGA

Linguagem: VISUAL BASIC

Campo de aplicação: FQ-14; FQ-15

Tipo de programa: IT-04

Algoritmo hash: SHA-256

Resumo digital hash: 357F8F8DD7FEE7516E66C19312BB042ABE7434728D8EFF20913CB426D5492BFE

Expedido em: 02/10/2018



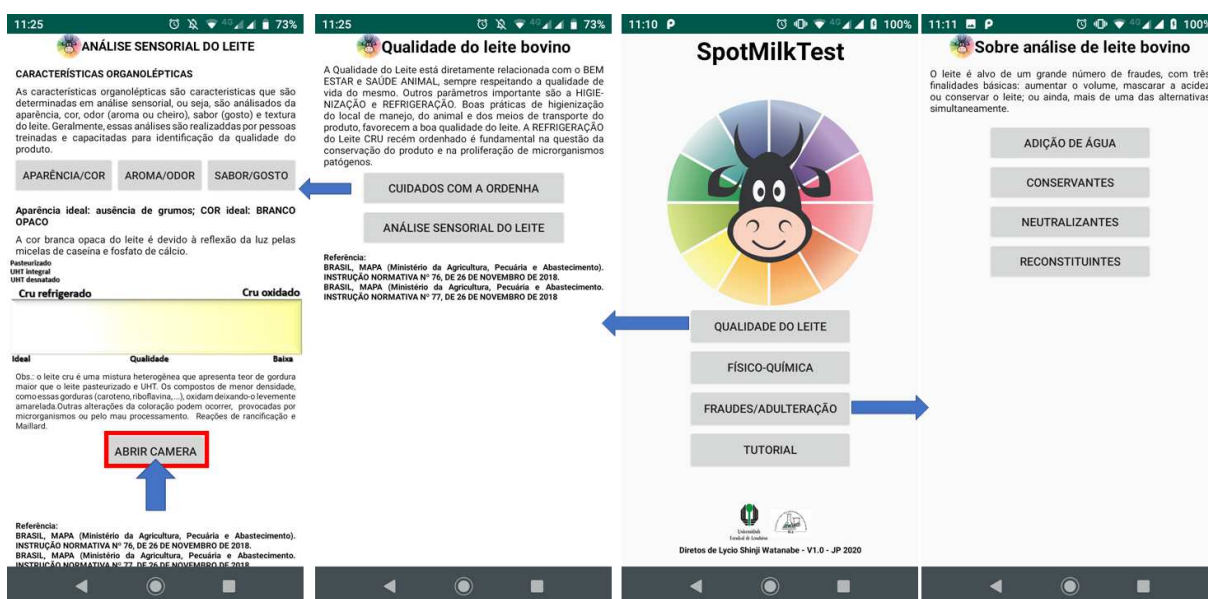
QUANTRGB – TRABALHO EM ANDAMENTO

SPOTMILKTEST

Esta aplicação foi desenvolvida por mim - Lycio Shinji Watanabe (UEL - Departamento de Química - Grupo DIA) na IDE do Android Studio baseada no InterliJ IDEA (Google), que pode ser operado em plataformas desde o Android 4.4 (API nível 19, *KITKAT*) até o Android 9 (API nível 28, *PIE*). O *app* (aplicativo) desenvolvido ainda não está disponível no *Play Store*, devido aos trâmites de direitos autorais.

O aplicativo *SpotMilkTest* foi desenvolvido com o objetivo de informar e auxiliar principalmente aos pequenos produtores, consumidores e fiscais sobre a qualidade do leite bovino. Esta aplicação utiliza a câmera do dispositivo móvel (*smartphone* ou *tablet*) para realizar os testes de qualidade do leite. Um teste disponível é a “cor” do leite, que indica se o produto está ou não com aspecto oxidado (amarelado). Após selecionar o “teste desejado”, o aplicativo abre a “câmera” do dispositivo móvel e realiza um teste sonoro (“*beep*”) ou “vibratório” caso o dispositivo estiver em modo “silencioso”. O teste apresenta um alerta de 1,0 s e indica na tela do dispositivo se o leite está adequado ou não.

Figura B2 - Layout do aplicativo *SpotMilkTest* desenvolvido neste trabalho



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2021).

Outros testes presentes no aplicativo estão relacionados com as fraudes por adulteração, como: reconstituintes (amido, cloretos, ureia, sacarose), neutralizantes (ácidos e bases) e, conservantes (ácido salicílico, hipocloritos, peróxido de hidrogênio, formaldeído). Estes testes são baseados em técnicas colorimétricas recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e outros métodos alternativos, que dependem do agente cromogênicos escolhido. O agente cromogênio reage seletivamente com o adulterante indicando a mudança ou não de coloração no leite. A aplicação entra com a funcionalidade de auxiliar a verificar a presença ou não do adulterante, reforçando assim o teste de triagem *in loco*. O resultado da análise e do teste de triagem podem ser reportados via *internet* para que o lote seja encaminhado para uma análise mais criteriosa na recepção ou liberação do produto.

Os limites de detecção foram baseados em um estudo das imagens de leite adulterado derivatizados com seus respectivos agentes cromogênicos para a calibração em cada umas das variáveis utilizadas (*R, G, B, H, S e V*) em um ambiente com iluminação controlada.