

APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE MÉTODO ANALÍTICO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE EM SUCO DE FRUTA

Érico Casare Nizoli¹⁹ e Mary Leiva de Faria²⁰

Resumo: a determinação da concentração de carboidratos, incluindo a glicose, é uma das análises químicas mais comuns realizada nas indústrias de alimentos e bebidas. Porém, métodos analíticos tradicionais baseados na redução do íon Cu^{2+} a Cu^{+} possuem como desvantagem a ausência de seletividade para glicose e métodos cromatográficos são custosos e demandam mão de obra altamente especializada. Com o objetivo de avaliar a aplicação e o desempenho de um método analítico enzimático de baixo custo e simples operação para a determinação de glicose em sucos de frutas como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), os parâmetros analíticos: faixa de trabalho, linearidade, seletividade, repetibilidade e exatidão foram obtidos e avaliados para amostras de solução aquosa de glicose e sucos de frutas industrializados de diversos sabores. Os resultados indicaram que o método analítico enzimático é apropriado para a determinação da concentração de glicose em sucos de frutas, apresentando boa performance analítica em todos os parâmetros (faixa de trabalho, linearidade, seletividade, repetibilidade e exatidão), podendo ser utilizado como uma alternativa de baixo custo e simples operação à cromatografia líquida de alta eficiência.

Palavras-chave: Método analítico; glicose; enzimático; suco de frutas.

Abstract: the determination of the concentration of carbohydrates, including glucose, is one of the most frequent chemical analysis made in the food and beverage industries. However, traditional analytical methods based on the reduction of Cu^{2+} ions to Cu^{+} has the disadvantage of lack of selectivity for glucose and chromatographic methods are costly and require highly specialized labor. With the objective of evaluate the implementation and performance of an enzymatic analytical method for low cost and simple operation for the determination of glucose in fruit juices as an alternative to high performance liquid chromatography (HPLC), the parameters analytical working range, linearity, selectivity, repeatability and accuracy were obtained and evaluated for samples of aqueous glucose and industrialized fruit juices of various flavours. The results indicated that the enzymatic analytical method is suitable for determining the concentration of glucose in fruit juice, with good analytical performance in all parameters (working range, linearity, selectivity, repeatability and accuracy), can be used as an alternative low cost and simple operation with high performance liquid chromatography.

Keywords: Analytical method; glucose; enzymatic; fruit juice.

Introdução

A glicose é um carboidrato simples (monossacarídeo) composto por 6 carbonos (hexose), sendo classificada também como um açúcar redutor por possuir um grupo hemiacetal. Encontrada em tecidos vegetais, frutas, hortaliças e formada pela hidrólise do amido, a glicose é essência para a nutrição humana pois é o produto mais importante da digestão dos carboidratos no intestino, ingressado diretamente no metabolismo energético

¹⁹ Departamento de Edafologia e Química Agrícola, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

²⁰ Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Fundação Educacional do Município de Assis, Brasil.

(SOLOMOS, 1996; COLTATE, 1996; ARAUJO, 1999). Este açúcar pode ser encontrado em diversos alimentos, sendo as frutas uma importante fonte, pois possuem naturalmente maiores concentrações de carboidratos em geral.

É de grande relevância econômica que produtos industrializados mantenham durante a sua produção, comercialização e consumo, conformidade em relação às suas principais características. Por esse motivo, é crescente o interesse de indústrias e consumidores no controle de qualidade de alimentos e bebidas (MELLO & KUBOTA, 2001). A determinação da concentração de carboidratos (incluindo a glicose) é a análise química mais comum realizada nas indústrias de alimentos e bebidas. Para estas indústrias é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos de baixo custo, facilidade de operação e instrumentação portátil (ESTEVINHO *et al.*, 2013; ESTEVINHO *et al.*, 2009).

Devido à ausência de cromóforos importantes na molécula, a concentração de açúcares não pode ser determinada com a leitura direta em equipamentos com detectores de radiação ultravioleta (SCHILLER *et al.*, 2002). Por este motivo, os métodos mais empregados para determinação de carboidratos em geral são baseados na oxidação do açúcar redutor e redução do íon Cu^{2+} a Cu^+ . Tais métodos, porém, apresentam como inconveniente a falta de seletividade para a determinação de glicose, pois identifica e quantifica todos os açúcares redutores presentes nas amostras sem distingui-los (FENNEMA, 1996).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é outra técnica analítica bastante empregada atualmente para determinação da concentração de glicose em amostras diversas (ESTEVINHO *et al.*, 2009). Utilizando detectores como índice de refração e detector de espalhamento de luz evaporativo (*Evaporative Light Scattering Detector* – ELSD), essa técnica oferece como vantagens a sensibilidade (capacidade de detectar pequenas concentrações do analito) e alta seletividade, sendo possível separar, identificar e quantificar isoladamente os diferentes açúcares presentes nas amostras. Porém, os custos de aquisição, manutenção e operação do equipamento, bem como a necessidade de estrutura física e pessoal capacitado são as maiores desvantagens da referida técnica para análise de carboidratos, incluindo a glicose.

Métodos analíticos enzimáticos são tradicionalmente utilizados para determinação de glicose em amostras biológicas como sangue e urina (*cf.* BEACH & TURNER, 1958; BARHAN & TRINDER 1972), porém são pouco utilizados para análise de alimentos. Embora algumas pesquisas tenham tido êxito na utilização de métodos enzimáticos para a quantificação desse açúcar em alimentos (*cf.* DEMIATE *et al.*, 2001; DAUDT & SIMON, 2001), ainda há pouco estudo sobre o tema na literatura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de um método analítico enzimático de baixo custo e simples operação para a determinação de glicose em sucos de frutas como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência.

O método foi avaliado e os principais parâmetros analíticos, como faixa de trabalho, linearidade, seletividade, repetibilidade e exatidão foram obtidos.

Materiais e método

Método analítico enzimático

O método analítico proposto neste trabalho para a determinação de glicose em sucos de frutas é um método enzimático colorimétrico baseado em métodos clássicos (e.g. BEACH & TURNER, 1958; BARHAN & TRINDER, 1972) onde a glicose oxidase catalisa a reação da D-glicose a ácido D-Glicônico com a formação de peróxido de hidrogênio, sendo este utilizado pela peroxidase para oxidar a 4-aminofenazona e o fenol, resultando na formação de uma quinonaimina, composto com absorção em comprimento de onda de 505 nm.

O procedimento analítico é de simples operação e consistiu em pipetar em um tubo de ensaio uma alíquota de 20 µL de amostra (diluída para adequação à curva de calibração se necessário) e adicionar 2 mL do reagente enzimático-colorimétrico. A solução foi homogeneizada e incubada por 10 minutos em banho-maria a 37 ± 2 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 505 nm, zerado com uma amostra em branco. A curva de calibração e amostra em branco foram realizadas utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente, pipetando 20 µL de padrão analítico de glicose (em concentração adequada) e 20 µL de água deionizada, respectivamente.

O reagente enzimático-colorimétrico é uma mistura de soluções previamente preparadas, contendo 5% de solução de 4-aminofenazona ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$) e tampão TRIS (hidroximetil-aminometano) ($0,92 \text{ mol L}^{-1}$), 5% de solução de fenol ($0,055 \text{ mol L}^{-1}$), 0,3% de solução de enzimas (glicose oxidase $\geq 1 \text{ KU mL}^{-1}$ e peroxidase $\geq 0,15 \text{ KU mL}^{-1}$) e 89,7% de água purificada. Esta solução é estável por 30 dias se armazenada refrigerada a 4 °C e abrigada da luz (LABORLAB, 2000).

Amostras e desempenho do método

Para a avaliação do desempenho do método foi utilizado dois tipos de amostras, sem e com matriz. A matriz é formada por todos os constituintes da amostra exceto o analito. O primeiro tipo de amostra (sem matriz) foram soluções de glicose (reagente P.A.) em água purificada (destilada e deionizada) em diversas concentrações. Com estas amostras foram realizados os testes de faixa de trabalho, linearidade, seletividade, repetibilidade e exatidão. O segundo tipo de amostras (com matriz) foram sucos industrializados de diversas frutas disponíveis comercialmente. Com estas amostras foram realizados os testes de repetibilidade e exatidão do método. Também se preparou soluções aquosas de frutose, sacarose, lactose, maltose e amido

solúvel (todos reagentes P.A.) em diversas concentrações para a determinação da seletividade do método.

Para a determinação da faixa de trabalho foram preparadas diversas concentrações de amostras sem matriz. A concentração inicial foi de 1 mgL^{-1} com incrementos de 5 mgL^{-1} até a concentração de 50 mgL^{-1} . A partir de 100 mg L^{-1} o incremento foi de 500 mgL^{-1} até a concentração máxima de 5000 mg L^{-1} . Após a definição da faixa de trabalho, a linearidade do método foi determinada utilizando soluções aquosa de glicose nas concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 mg L^{-1} em 3 replicatas independentes. Para repetibilidade e exatidão, sete soluções aquosas de glicose foram preparadas com concentração teórica de 352 mg mL^{-1} e analisadas pelo método proposto no trabalho.

Para avaliar a interferência da matriz no desempenho do método, a repetibilidade foi avaliada com a determinação analítica da concentração de glicose, em triplicatas independentes, das amostras de sucos de laranja, tomate, abacaxi, goiaba, caju, pêssego, manga e maracujá. Já para a exatidão, com a impossibilidade de se saber a concentração real de glicose nos sucos de frutas, foi realizado a comparação dos resultados obtidos com o método proposto com os resultados encontrados utilizando como método de referência a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A cromatografia foi realizada utilizando um equipamento HPLC equipado com bomba isocrática e detector de índice de refração. Foi empregado uma coluna cromatográfica com grupo amina (NH_2), com dimensões de $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ e $5 \text{ }\mu\text{m}$ de tamanho de partícula. Solução de acetonitrila grau UV/HPLC 75% foi utilizada como fase móvel com fluxo de 2 mLminuto^{-1} . A análise foi realizada com a temperatura de forno de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Devido ao alto teor de glicose nos sucos de frutas, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 de amostra em água purificada antes das análises, tanto no método aqui proposto, quanto para a cromatografia líquida de alta eficiência. Para a exatidão, a comparação foi feita somente com os sabores abacaxi, goiaba, caju e maracujá.

Estatística

Para se mensurar o desempenho do método analítico, diversos cálculos foram empregados, dentre eles correlação de Pearson, coeficiente de determinação (r^2), análise de variância (Anova), teste de falta de ajuste, teste de *Bonferroni* para *outliers*, teste de *Shapiro-Wilk* e *Ryan-Joiner* para normalidade dos resíduos, teste de *Breusch-Pagan* para homoscedasticidade dos resíduos, teste de *Durbin-Watson* para independência dos resíduos, coeficiente de variação, recuperação e equação de *Horwitz*. Todos os testes estatísticos tiveram significância maior que 95% ($p < 0,05$). Para os cálculos demonstrados no trabalho foram utilizados os softwares Excel[®] 2013 (Microsoft), Statistica[®] versão 6 (StatSoft Inc.) e Action[®] versão 2.7.28.350.480 (Estatcamp).

Resultados e discussão

Faixa de trabalho

Métodos analíticos quantitativos possuem como característica a presença da faixa de trabalho, que possui como limite inferior o valor do limite de quantificação e o limite superior é determinado pelos fatores limitantes da resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2010).

Na Figura 1 são apresentados os resultados obtidos na determinação da faixa de trabalho. Observa-se que até 50 mg L^{-1} não existe uma relação linear muito ajustada entre a resposta do equipamento (absorbância) e a concentração de glicose. Foi possível observar uma mesma resposta do equipamento para valores de concentração diferentes o que indica que nesta faixa de concentração o método está abaixo do limite de quantificação, ou seja, o método é capaz de identificar o analito, porém não é confiável para quantificá-lo. De 100 mg L^{-1} até o maior valor estudado (5000 mg L^{-1}) observa-se uma boa relação linear ($r^2 = 0,994$) indicando esta ser uma faixa de trabalho aceitável. Nota-se, porém um pequeno desvio linear entre as amostras 2500 e 3000 mg L^{-1} de concentração de glicose (Figura 1). Reduzindo então a faixa de trabalho para o intervalo de concentração de 100 até 2500 mg L^{-1} foi possível conseguir um melhor resultado de coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9996$) indicando esta faixa como a melhor escolha para a faixa de trabalho.

Linearidade

Entende-se como a linearidade de um método analítico a capacidade em se demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra, dentro de um intervalo específico contido na faixa de trabalho (ANVISA, 2003). Para o teste da linearidade adotou-se a faixa de concentração compreendida entre 100 e 900 mg L^{-1} que está inserida na faixa de trabalho. Na figura 2 é mostrado os resultados obtidos nas 3 replicatas realizadas.

O método proposto neste trabalho mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de $0,997$ ($p < 0,05$) e $r^2 = 0,994$. Os testes estatísticos indicam que o método analítico se enquadra em um modelo estatístico de regressão linear simples (Tabela 1), ou seja, possui relação matemática linear entre $X=Y$ e os resíduos possuem variância constante (são homoscedástico), independentes (não correlacionados) e possuem distribuição normal. Os resíduos ainda apresentaram distribuição aleatória (Figura 3), um dos requisitos para o modelo de regressão linear.

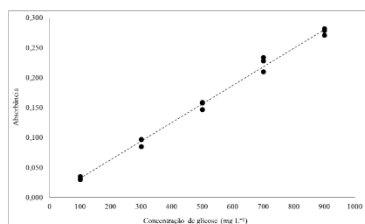


Figura 2: Relação linear entre os valores de concentração de glicose e os valores de resposta do equipamento (absorbância).

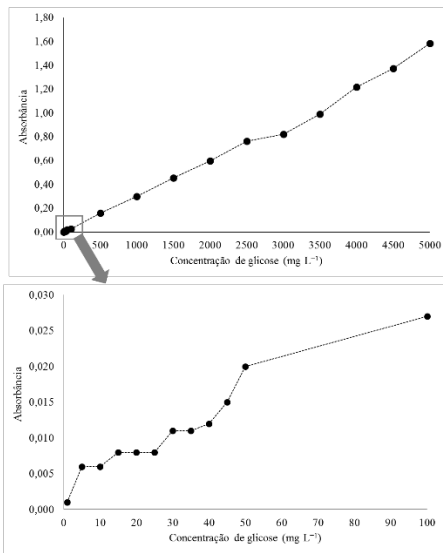


Figura 1: Resultados obtidos na determinação da faixa de trabalho. Acima todos os valores testados (de 1 a 5000 mg L⁻¹). Abaixo detalhe do intervalo entre 1 e 100 mg L⁻¹.

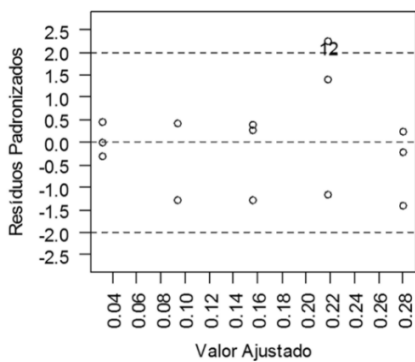


Figura 3: Distribuição dos resíduos padronizados vs valor ajustado

Requisito	Teste estatístico	<i>p</i> -valor	Critério de aceitação
Significância do modelo	ANOVA	$8,8 \times 10^{-16}$	$p < 0,05$
Falta de ajuste	Teste de falta de ajuste	0,524	$p > 0,05$
Outliers	Bonferroni	0,277	$p > 0,05$
Distribuição normal dos resíduos	Shapiro-Wilk	0,128	$p > 0,05$
	Ryan-Joiner	0,122	$p > 0,05$
Homoscedasticidade dos resíduos	Breusch-Pagan	0,200	$p > 0,05$
Independência dos resíduos	Durbin-Watson	0,748	$p > 0,05$

Tabela 1: Resultados obtidos nos testes estatísticos para o modelo de regressão linear simples.

Seletividade do método analítico

A seletividade de um método analítico é a capacidade deste medir o analito de interesse sem a interferência de outros componentes presentes na matriz/amostra (USP, 2008).

Os resultados para a seletividade do método são apresentados na Tabela 2. Observou-se que não houve detecção em nenhuma das concentrações testadas para frutose, sacarose e lactose. Para amido e maltose, respectivamente polímero e dissacarídeo formado por glicose, verificou-se a presença de pequeno sinal analítico em altas concentrações destes compostos (5000 e 10000 g L⁻¹). A não detecção destas duas moléculas em concentrações menores e a detecção em altas concentrações indicam a presença de pequenos níveis de glicose livre nestes reagentes. Amido e maltose são moléculas susceptíveis a sofrerem hidrólise na presença de água em meio ácido. Possivelmente neste caso, uma pequena parte dos reagentes sofreu hidrólise ocasionada pela umidade do ar, que possui características ácidas devido a formação de ácido carbônico pela dissolução do CO₂ atmosférico, liberando a glicose que foi detectada pelo método analítico. Assim, o método demonstrou-se não sofrer interferência de outros sacarídeos, demonstrando ser seletivo para glicose.

Concentração (g L ⁻¹)	Sinal do equipamento (absorbância em $\lambda = 505$)				
	Frutose	Sacarose	Amido	Maltose	Lactose
100	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
500	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
1000	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
5000	< 0,001	< 0,001	0,005	0,008	< 0,001
10000	< 0,001	< 0,001	0,020	0,017	< 0,001

Tabela 2: Concentrações de interferentes e respectivo sinal analítico para a determinação da seletividade do método.

Repetibilidade do método analítico

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições de medição, onde se avalia a dispersão de resultados entre os ensaios (INMETRO, 2003). Como critério de aceitação adotou-se a utilização da equação de *Horwitz* (INMETRO, 2010). A equação de *Horwitz* determina o valor máximo de coeficiente de variação (CV) aceitável em relação a uma concentração específica do analito. Esta equação, porém, não deve ser utilizada para estabelecer um parâmetro de CV para concentrações muito pequenas, inferiores a 100 µg kg⁻¹, pois apresentará resultados superestimados. Neste caso, deve-se adotar um coeficiente de variação tão baixo quanto possível (COMMISSION DECISION, 2002; PASCHOAL *et al.*, 2008) ou adotar os valores tabelado pela AOAC International (AOAC, 1998).

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da concentração média de glicose, desvio padrão, coeficiente de variação (CV) e critério de aceitação para a repetibilidade do método nas amostras sem matriz (solução aquosa de glicose) e com matriz (sucos de diversas frutas). Em geral, observou-se uma

variação do valor de CV entre as amostras, sendo o maior valor para o suco de goiaba (CV = 3,40%) e o menor para o suco de pêssego (CV = 1,35%), seguido pela amostra sem matriz (solução aquosa de glicose - CV = 1,66%). O desvio padrão relativo entre os valores de CV foi de 31,18%, de mostrando que a diferença entre os componentes das matrizes das amostras exerce influência na repetibilidade do método. Porém, mesmo com os diferentes valores apresentados, todos se encontram abaixo do critério de aceitação estabelecido pela equação de *Horwitz*, demonstrando que o método analítico proposto neste trabalho possui repetibilidade na determinação de glicose em sucos de frutas.

Amostra	Concentração média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (CV)	Critério de Aceitação (<i>Horwitz</i>)
Solução aquosa de glicose	350,88 mg L ⁻¹	5,81	1,66 %	CV ≤ 6,62 %
Suco de laranja	1,66 %	0,03	1,75 %	CV ≤ 3,71 %
Suco de tomate	0,94 %	0,02	1,79 %	CV ≤ 4,04 %
Suco de abacaxi	1,45 %	0,03	2,32 %	CV ≤ 3,78 %
Suco de goiaba	1,49 %	0,05	3,40 %	CV ≤ 3,77 %
Suco de caju	3,68 %	0,08	2,29 %	CV ≤ 3,29 %
Suco de pêssego	1,27 %	0,02	1,35 %	CV ≤ 3,86 %
Suco de manga	1,62 %	0,03	2,07 %	CV ≤ 3,72 %
Suco de maracujá	3,55 %	0,11	3,11 %	CV ≤ 3,31 %

Tabela 3: Concentração de glicose, desvio padrão, coeficiente de variação (CV) e critério de aceitação para a repetibilidade do método.

Exatidão do método analítico

A exatidão de um método analítico pode ser definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). Para se determinar a exatidão da amostra sem matriz (solução aquosa de glicose), utilizou-se como valor de referência a concentração teórica obtida pelo preparo da solução teste. Já para as amostras com matriz (sucos de frutas), a exatidão foi determinada por comparação utilizando resultados obtidos nas mesmas amostras por um método analítico diferente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Na Tabela 4 e Figura 4 são apresentadas a comparação entre as concentrações obtidas e de referências de glicose nas amostras. Segundo a AOAC (1998) a faixa de recuperação pode ser um dos critérios balizadores para avaliação da exatidão, que é variável de acordo com a concentração do analito. Para concentrações em torno de 1%, espera-se recuperação na faixa de 97 a 103% como critério de aceitação para a exatidão e para concentrações por volta de 1000 mg L⁻¹, recuperação na faixa de 95 a 105% (AOAC, 1998). Em todas as amostras observou-se exatidão dentro do critério de aceitação,

com resultados de recuperação situados na faixa de 98,07% (suco de caju) a 101,79% (suco de goiaba). Os melhores valores de recuperação foram obtidos nas amostras de suco de maracujá (100,14%), solução de glicose (99,68%) e suco de abacaxi (101,52%). O desvio padrão relativo dos valores de recuperação foi de 1,50%. Isto indica que as diferentes matrizes das amostras analisadas exercem pouca interferência na exatidão do método.

Para comparações entre diferentes instrumentos e/ou diferentes laboratórios, também podemos utilizar o *z score* como avaliação da exatidão. A avaliação é feita de acordo com os seguintes critérios de decisão: $|z| \leq 2$ = resultado satisfatório; $2 < |z| < 3$ = resultado questionável; $|z| \geq 3$ = resultado insatisfatório (INMETRO,2010). Todas as amostras de suco de fruta analisadas para exatidão apresentaram *z score* satisfatórios, com índices abaixo de 2 (Tabela 5). Os valores de *z score* corroboram com os valores de recuperação obtidos, indicando que o método analítico em teste é exato para a determinação da concentração de glicose.

Amostra	Concentração obtida	Concentração de referência	Recuperação
Solução aquosa de glicose	350,88 mg L ⁻¹	352,00 mg L ⁻¹	99,68 %
Suco de abacaxi	1,45 %	1,43 %	101,52 %
Suco de goiaba	1,49 %	1,46 %	101,79 %
Suco de caju	3,68 %	3,76 %	98,07 %
Suco de maracujá	3,55 %	3,54 %	100,14 %

Tabela 4: Valores médios da concentração obtida, concentração de referência e recuperação no teste de exatidão do método analítico.

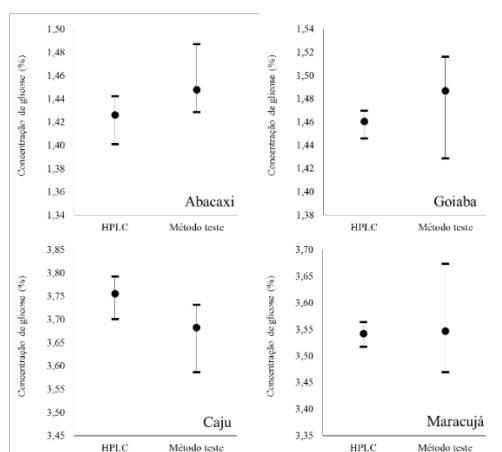


Figura 4: Comparação entre as concentrações médias, máximas e mínimas de glicose obtidas pelos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e enzimático estudado neste trabalho (método teste) para os diferentes sucos de frutas.

Amostra	z score
Suco de abacaxi	0,77
Suco de goiaba	0,73
Suco de caju	0,99
Suco de maracujá	0,07

Tabela 5: Valores de *z score* obtidos da comparação das concentrações de glicose obtidas nos dois diferentes métodos analíticos (enzimático e cromatográfico).

Conclusões

O método analítico enzimático demonstrou ser apropriado para a determinação da concentração de glicose em sucos de frutas, apresentando boa performance analítica nos testes de linearidade, seletividade, repetibilidade e exatidão. Sua alta seletividade se apresenta como diferencial de outros métodos analíticos clássicos para determinação de açúcares em alimento (e.g. métodos Somogyi – Nelson, Lane – Eynon, Munson – Walker, dentre outros). Observou-se que a diferença entre as matrizes possui uma maior influência na precisão (repetibilidade) e menor influência na exatidão do método analítico.

O desempenho analítico evidenciado pelos dados desta pesquisa demonstrou que o método analítico enzimático pode ser utilizado como uma alternativa de baixo custo e simples operação à cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da concentração de glicose em sucos de frutas.

Referências

- ANVISA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasil, 2003.
- AOAC. Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures. AOAC International, USA, 1998.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 3ª ed. Viçosa: UFV, 1999.
- BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, v. 97, 1972, p. 142-145.
- BEACH, E.F.; TURNER, J.J. An Enzymatic Method for Glucose Determination in Body Fluids. *Clinical Chemistry*, v. 04, 1958, p. 462-475.
- COLTATE, T. P. **Food. The Chemistry Components**. 3ª ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996.
- COMMISSION DECISION. 2002/657/EC, 17-08-2002. Official Journal of the European Union, L221, p. 8-36, 2002.
- DAUDT, C.E.; SIMON, J.A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v. 31, 2001, p. 697-701.
- DEMIATE, I.M.; KONKEL, F.E.; PEDROSO, R.A. Enzymatic determination of starch in doce de leite using dialysis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, 2001, p. 339-342.

- ESTEVINHO, B.N.; FERRAZ, A.; ROCHA, FF.; SANTOS, L.; ALVES, A. Uncertainty in the determination of glucose in aqueous solutions by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Separation Science**, v. 32, 2009, p. 3116-3125.
- ESTEVINHO, B.N.; FERRAZ, A.; ROCHA, FF.; SANTOS, L.; ALVES, A. Uncertainty in the determination of glucose and sucrose in solutions with chitosan by enzymatic methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, 2013, p. 931-938.
- FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, 1996
- INMETRO. **DOQ-CGCRE-08. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Brasil, 2003.
- INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-08. Revisão 03**. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Brasil, 2010.
- LABORLAB. **Instruções Técnicas para Análise. Kit para análise de glicose - método enzimático, revisão 02/2000**. Laborlab produtos para laboratórios Ltda., 2000.
- MELLO, L.D.; KUBOTA, L. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, 2002, p.237-256.
- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de método cromatográfico para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, 2008, p. 1190-1198.
- SCHILLER, H.; HEYDT, H.; MÄRZ, F.; SCHMIDT, P.C. Quantification of sugars and organic acids in hygroscopic pharmaceutical herbal dry extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 968, 2002, p. 101-111.
- SOLOMOS, T. W. G. **Química Orgânica 2**, 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996.
- USP. **USP 32 - NF 27**. The United States Pharmacopeial Convention, USA, 2008.