

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de método limpo para a
determinação de ureia**

Andréa Cristina Gigante

Dissertação de Mestrado

2011

ANDRÉA CRISTINA GIGANTE

Desenvolvimento de método limpo para a determinação de ureia

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Araraquara
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

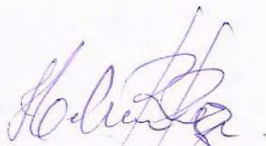
G459d	Gigante, Andréa Cristina Desenvolvimento de método limpo para a determinação de ureia / Andréa Cristina Gigante. – Araraquara : [s.n], 2011 60 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Helena Redigolo Pezza Coorientador: Leonardo Pezza 1. Química analítica. 2. Espectroscopia de reflectância difusa. 3. Spot test. 4. Fertilizantes. I. Título.
-------	---

ANDRÉA CRISTINA GIGANTE

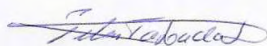
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 31 de janeiro de 2011.

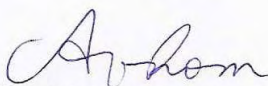
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Helena Redigolo Pezza (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Adriana Vitorino Rossi
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

DADOS CURRICULARES

1. Formação Acadêmica

1.1. Graduação

Licenciatura em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Instituto de Química – Araraquara

Período: 1999 a 2003

1.2. Pós-Graduação

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Instituto de Química – Araraquara

Período: 2009 a 2011

2. Artigos publicados

2.1. GOTARDO, M. A.; GIGANTE, A. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 361-365, Oct. 2004.

2.2. GIGANTE, A. C.; GOTARDO, M. A.; TOGNOLLI, J. O.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Spectrophotometric determination of formaldehyde with chromotropic acid in phosphoric acid medium assisted by microwave oven. **Microchemical Journal**, v. 77, n. 1, p. 47-51, May 2004.

2.3. GIGANTE, A. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação Espectrofotométrica de Ácido Glicólico com Ácido Cromotrópico Assistida por Forno de Microondas. **Eclética Química**, v. 27, p. 223-230, 2002.

3. Trabalhos apresentados em Congressos

3.1. ALBERTINI, L.B.; GIGANTE, A.C.; HONÓRIO, D.H.; CADAN, F.M.; GONÇALVES, G.S.R.; FERREIRA, R.G.S.; TIBIRIÇÁ, T.D.N. Gestão e Gerenciamento de Resíduos Químicos na Universidade de São Paulo – Campus de São Carlos. In: I Workshop em Gestão de Resíduos na UNESP – Araraquara/SP, 2010.

3.2. GIGANTE, A.C.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação de Ureia em Fertilizantes por Reflectância Difusa. In: 17º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional - Interior Paulista Waldemar Saffiotti – Araraquara/SP, 2009.

3.3. OLIVEIRA, J. K.; FURLAN, E. G. M.; GIGANTE, A.C.; L. Q. U. - I. - ; LACO, P. E. L. F. M. E. V. Estágio Supervisionado Presencial e Atividades de Formação de Professores: Do Rascunho À Arte Final. In: VI Jornada de Educação – Assis/SP, 2003.

3.4. GIGANTE, A.C.; PEZZA, H.R. Determinação Espectrofotométrica de Glicose em Soluções Parenterais. In: XI Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – São Carlos/SP, 2003.

3.5. GIGANTE, A.C.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação Espectrofotométrica de Formaldeído com Ácido Cromotrópico Assistida por Forno de Microondas. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas/MG, 2003.

3.6. GIGANTE, A.C.; PEZZA, H.R. Desenvolvimento de Método Espectrofotométrico para Análise de Glicose em Medicamentos. In: XV Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Marília/SP, 2003.

3.7. GIGANTE, A.C.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação de Ácido Glicólico com Ácido Cromotrópico Usando Forno de Microondas. In: X Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – São Carlos/SP, 2002.

3.8. GIGANTE, A.C.; PEZZA, H.R. Desenvolvimento de Método Espectrofotométrico para Análise de Formaldeído Usando Forno de Microondas Doméstico. In: XIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Presidente Prudente/SP, 2002.

3.9. GIGANTE, A.C.; PEZZA, H.R. Desenvolvimento de Método Espectrofotométrico para Análise de Formaldeído Usando Forno de Microondas Doméstico. In: XXXII Semana da Química – Araraquara/SP, 2002.

3.10. GIGANTE, A.C.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação de Ácido Glicólico com Ácido Cromotrópico Usando Forno de Microondas. In: 11º Encontro Nacional de Química Analítica – Campinas/SP, 2001.

3.11. GIGANTE, A.C.; PEZZA, H.R. Desenvolvimento de Método Espectrofotométrico para Determinação de Ácido Glicólico com Ácido Cromotrópico usando Forno de Microondas. In: XIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Bauru/SP, 2001.

4. Produção Técnica

Processos ou Técnicas com Patente

PEZZA, H.R.; PEZZA, L.; GIGANTE, A.C. Spectrophotometric determination, e.g. of ethanol in gasoline involves reaction with ammonium molybdate medium to generate molybdenum blue through controlled reduction. **Derwent Primary Accession Number:** 2005-102361 [12], 2004.

5. Atuação Profissional

5.1. Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares Nestlé, NESTLÉ Brasil LTDA – Fábrica de Araraquara

Vínculo institucional: Colaboradora (2004-2008)

Enquadramento Funcional: Auxiliar Qualificado da Garantia da Qualidade

Jornada: 44 horas semanais

5.2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional: Funcionário (2010-atual)

Enquadramento Funcional: Técnico de Laboratório - Classe I - Nível A

Jornada: 40 horas semanais

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por me guiar em toda a minha vida, sempre me dando forças para contornar os obstáculos e seguir o meu caminho.

Aos meus queridos pais Olimpio e Odilia,

Obrigada por toda a educação que me deram e por sempre me conduzirem pelo caminho do bem e do amor. Por todo o seu esforço, apoio, dedicação, amor e carinho dados incondicionalmente a mim para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha querida irmã Patrícia,

Obrigada pelo incentivo, dedicação, amor e carinho incondicionais e por sempre se fazer presente em todos os momentos de minha vida. Você é o meu grande exemplo e orgulho. Sem você esse momento não seria completo.

Aos meus queridos avós José Giganti e Maria Lopes Scaraciulla (in memorian) e Amâncio Alvaredo e Julia Fontes (in memorian) e à minha querida tia e madrinha Antonia Maria Gigante Tayama (in memorian)

Quando vocês chegaram a este mundo, Deus confiou a vocês a competência para criarem seus filhos. Suas atitudes foram verdadeiros exemplos para todos aqueles que tiveram o privilégio de compartilhar sua presença. Obrigada por todo gesto de bondade com que iluminaram nossas vidas. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado.

À Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza pela oportunidade de voltar para o seu grupo de pesquisa, pela orientação, paciência, confiança e sincera amizade.

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza pela coorientação.

Aos membros da banca examinadora pela atenção e importante colaboração na avaliação crítica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Massao Ionashiro pelos valiosos ensinamentos, conselhos, incentivo e sincera amizade.

Ao Prof. Dr. João Olímpio Tognolli pela amizade e pela colaboração na parte estatística deste trabalho e no meu exame geral de qualificação.

À Sandrinha por todo o auxílio no laboratório durante o desenvolvimento deste trabalho e também pelo carinho.

Ao Ricardo Moutinho pela atenção e auxílio com as análises pelo Método Oficial.

Aos amigos do Grupo Fritz Feigl: Aline, Ângela, Vitor Hugo, Laize, Marcela, Mayara, Flávio Bedatty e Flávio Salomão, obrigada pelo companheirismo e amizade. Sempre me lembrarei de vocês com muito carinho.

Aos amigos do Grupo LATIG: Liliane, Cláudio, Flávio, Patrícia e Beatriz, obrigada pela amizade e convivência.

E a todos os meus amigos e familiares, muito obrigada por acreditar em mim e me incentivar ao longo de toda a caminhada. A todos os funcionários do Instituto de Química pela atenção, agilidade e competência no atendimento a mim dispensado, meus agradecimentos sinceros.

*“Nada é impossível; há caminhos que conduzem a
todas as coisas.”*

(La Rochefoucauld)

"Cada um é o artesão do seu destino."

(Appius Claudius Caecus)

RESUMO

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um método limpo para determinação de ureia em amostras comerciais de fertilizantes utilizando a Espectroscopia de Reflectância Difusa combinada com *spot test*. O método desenvolvido é baseado na reação entre a ureia e o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) em meio de ácido clorídrico diluído, que resulta em um produto de coloração rósea cujo valor máximo de reflectância ocorre no comprimento de onda de 535 nm. Os parâmetros experimentais foram otimizados através dos planejamentos fatorial e composto central para a obtenção da superfície de resposta, os quais indicaram uma maior sensibilidade para o método quando se utiliza o reagente *p*-DAC na concentração de 0,196% (m/v) em meio de ácido clorídrico de concentração 0,0549 mol L⁻¹, empregando etanol como solvente para as soluções. O suporte sólido para a reação é um papel de filtro qualitativo onde são colocados 20,0µL de solução de ureia seguidos de secagem com ar frio de um secador de cabelos e 20,0µL de solução de reagente *p*-DAC 0,196% (m/v) em meio de HCl 0,0549 mol L⁻¹ e secagem ao ar livre, submetendo-se então o *spot* à leitura reflectométrica em $\lambda_{\text{máx.}} = 535 \text{ nm}$. Uma relação linear ($R = 0,996$) foi estabelecida na faixa de concentração de ureia compreendida entre 50,0 – 300 mg L⁻¹. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados em 5,13 mg L⁻¹ e 17,10 mg L⁻¹, respectivamente. O método limpo desenvolvido foi aplicado na determinação de ureia em amostras comerciais de fertilizantes onde demonstrou apresentar ótima precisão e exatidão, evidenciadas pela boa recuperação (94,2 – 107,4%), além de oferecer vantagens como simplicidade de execução e baixo consumo de reagentes, geração de mínima quantidade de resíduos, rapidez e segurança, gerando resultados confiáveis. Pelo exposto, o método se configura como ambientalmente amigável para determinação de ureia, uma vez que está de acordo com os Princípios da Química Verde.

Palavras-chave: espectroscopia de reflectância difusa; *spot test*; ureia; fertilizantes.

ABSTRACT

This work proposes the development of a clean method for determination of urea in commercial samples of fertilizers using the Diffuse Reflectance Spectroscopy combined with *spot test*. The method is based on the reaction between urea and the chromogenic reagent *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC) in diluted hydrochloric acid medium, which results in a pink colored product whose maximum value of reflectance occurs at a wavelength of 535 nm. The experimental parameters were optimized through a factorial and a central composite experimental design to obtain the response surface, which indicated a higher sensitivity for the method when using the reagent *p*-DAC in the concentration of 0.196% (w/v) in a hydrochloric acid 0.0549 mol L⁻¹ medium, using ethanol as a solvent for the solutions. The solid support for the reaction is a qualitative filter paper where they are placed 20.0μL of urea solution followed by drying with cold air from a hair dryer and 20.0μL of reagent solution *p*-DAC 0.196% (w/v) in the HCl 0.0549 mol L⁻¹ medium and drying in the air, then submitting the *spot* to the reflectometric reading at $\lambda_{\max} = 535$ nm. A linear relationship ($R = 0.996$) was established in the range of urea concentration between 50.0 to 300 mg L⁻¹. The limits of detection and quantification were determined at 5.13 mg L⁻¹ and 17.10 mg L⁻¹, respectively. The method was applied to the clean determination of urea in commercial samples of fertilizers, which has shown to present great precision and accuracy as evidenced by the good recovery (94.2 to 107.4%) and also offers advantages such as simplicity of implementation and low consumption of reagents, generation of minimum quantity of wastes, rapidity and security, producing reliable results. As shown, the method is designed as environmentally friendly for determination of urea, as it is consistent with the Principles advocated by the Green Chemistry.

Keywords: diffuse reflectance spectroscopy; *spot test*; urea; fertilizers.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Fórmula estrutural da ureia	20
Figura 2. Suporte utilizado na realização dos <i>spot tests</i>	32
Figura 3. Fórmula estrutural do <i>p</i> -dimetilaminocinamaldeído	34
Figura 4. Espectro de reflectância do produto de reação entre ureia e <i>p</i> -DAC em papel de filtro qualitativo WHATMAN 1 como suporte sólido. Valores de A_R obtidos após a secagem do analito com secador e secagem do reagente ao ar livre. Valor máximo de A_R em 535 nm. Concentração de ureia: 250 mg L ⁻¹	36
Figura 5. Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de reflectância obtido	39
Figura 6. Gráfico da superfície de resposta otimizada para medidas de reflectância em 535 nm em função das variáveis: concentrações de HCl (mol L ⁻¹) e de <i>p</i> -DAC (% (m/v)). Foi utilizada solução de ureia 4000 mg L ⁻¹ e etanol como solvente para todas as soluções. Equação da superfície: $Z = 0,698 + 1,81 x - 4,51 x^2 + 2,64 y - 84,4 y^2 + 21,5 xy$	42
Figura 7. Gráfico da curva de nível referente à superfície de resposta da Figura 6	43
Figura 8. Estabilidade do produto de reação entre ureia (4000 mg L ⁻¹) e <i>p</i> -DAC (0,335% (m/v) em HCl (0,0549 mol L ⁻¹)).....	44
Figura 9. Gráfico da reflectância em função da concentração de ureia. Aplicação de regressão linear aos dados da Tabela 11. Concentração de ureia: 50,0 – 300 mg L ⁻¹ . Equação da reta: $A_R = 0,06693 + 0,0010966 C$. Coeficiente de correlação: 0,996	47
Figura 10. Estabilidade do produto de reação entre ureia (200 mg L ⁻¹) e <i>p</i> -DAC (0,196% (m/v) em HCl (0,0549 mol L ⁻¹)).....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Métodos utilizados para a determinação de ureia.....	22
Tabela 2. Volumes tomados da solução estoque de ureia e as respectivas concentrações das soluções de trabalho	30
Tabela 3. Valores de reflectância (535 nm) relativos aos <i>spot tests</i> com 20,0 µL de solução de ureia 4000 mg L ⁻¹ em meio de H ₂ O desionizada e 20,0 µL de solução de <i>p</i> -DAC em meio de HCl e etanol, com concentrações variadas. Número de replicatas: 3.	37
Tabela 4. Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento fatorial 2 ² . Solvente: etanol, para todos os reagentes	38
Tabela 5. Valores de reflectância (535 nm) e seus respectivos coeficientes de variação obtidos para o planejamento fatorial 2 ² . 20,0 µL de solução de ureia 4000 mg L ⁻¹ e 20,0 µL de solução de <i>p</i> -DAC em meio de HCl. Solvente: etanol. Número de replicatas: 3	38
Tabela 6. Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento de composto central	40
Tabela 7. Matriz de ensaios utilizados no planejamento de composto central	40
Tabela 8. Valores de reflectância (535 nm) e seus respectivos coeficientes de variação obtidos para o planejamento de composto central. 20,0 µL solução de ureia 4000 mg L ⁻¹ e 20,0 µL de solução de <i>p</i> -DAC em meio de HCl. Solvente: etanol. Número de replicatas: 3	41
Tabela 9. Concentrações das variáveis em condições experimentais ótimas e seus respectivos valores de reflectância (535 nm).	43

Tabela 10. Valores de reflectância (535 nm) obtidos no estudo para a obtenção de novo valor crítico para [p-DAC]. 20,0µL solução de ureia 200,00 mg L⁻¹ e 20,0 µL de solução de p-DAC em meio de HCl 0,0549 mol L⁻¹. Número de replicatas: 3.....45

Tabela 11. Valores de reflectância (535 nm) relativos às amostras com adição de 20,0 µL de ureia (com concentrações variáveis) e secagem com ar frio do secador; adição de 20,0 µL de p-DAC 0,196% (m/v) em HCl em 0,0549 mol L⁻¹ e posterior secagem a temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos). Número de replicatas: 3.....46

Tabela 12: Verificação das repetibilidades intra e inter-dia para a curva analítica construída para determinação de ureia. Número de replicatas: 10 47

Tabela 13. Parâmetros experimentais e Figuras de Mérito para o método desenvolvido 49

Tabela 14. Determinação de ureia em amostras comerciais de fertilizantes pelo método proposto 50

Tabela 15. Resultados de recuperação de ureia adicionada em amostras de fertilizantes 52

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>)
T_R	Radiação difusa refletida
R	Poder de reflexão ou reflectância
I	Intensidade da energia radiante refletida
I_0	Intensidade da energia radiante incidente
A_R	Densidade óptica para medidas de reflectância
p -DAC	p -dimetilaminocinamaldeído
HCl	Ácido clorídrico
[p -DAC]	Concentração de p -dimetilaminocinamaldeído
[HCl]	Concentração de ácido clorídrico
C	Concentração
R	Coeficiente de correlação
C V	Coeficiente de variação
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda onde a reflectância de um composto é máxima
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
SD	Desvio-padrão
P	Probabilidade
t	Valor de t (Teste t de Student para análise estatística de dados)
μ	Média dos valores obtidos na recuperação de ureia em amostra de fertilizante
RSD	Desvio padrão relativo

SUMÁRIO

Capítulo I. Introdução	19
I.1. Considerações Gerais sobre a Ureia.....	20
I.2. Importância da Ureia.....	20
I.3. Métodos para Determinação de Ureia	21
I.4. Espectroscopia de Reflectância Difusa associada a <i>spot test</i>	23
I.5. Química Verde	24
 Capítulo II – Justificativa e Objetivos.....	26
 Capítulo III – Parte Experimental.....	28
III.1. Equipamentos, Reagentes e Preparo de Soluções	29
III.1.1. Equipamentos	29
III.1.2. Reagentes	29
III.1.3. Preparo de soluções utilizadas no presente estudo	30
III.1.3.1. Solução de ureia.....	30
III.1.3.2. Soluções de p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) em HCl utilizadas para o desenvolvimento do presente método	30
III.1.3.3. Soluções de Ácido Clorídrico.....	31
III.1.3.4. Soluções de Amostras Comerciais de Ureia	32
III.2. <i>Spot Test</i>	32
 Capítulo IV – Metodologia, resultados e discussão	33
IV.1. Utilização do p-DAC como reagente cromogênico	34
IV.2. Preparo dos <i>spot tests</i>	36
IV.3. Planejamento Experimental	37
IV.3.1. Planejamento Fatorial 2 ²	37
IV.3.2. Planejamento de Composto Central para obtenção da Superfície de Resposta	39
IV.4. Estudo da Estabilidade do Produto de Reação	44
IV.5. Avaliação da Superfície de Resposta para obtenção de um novo valor crítico para a concentração de p-DAC	45

IV.6. Construção da Curva Analítica para Determinação de Ureia por Espectroscopia de Reflectância Difusa.....	46
IV.7. Estudo da Estabilidade do Produto de Reação.....	48
IV.8. Cálculo do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ) para o Método Proposto.....	48
IV.9. Determinação das Principais Figuras de Mérito para o Método Desenvolvido	49
IV.10. Aplicações Analíticas e Validação do Método Analítico Desenvolvido ...	49
IV.10.1. Análise de amostras comerciais de fertilizantes.....	49
IV.10.2. Estudos de adição e recuperação nas amostras comerciais de fertilizantes	51
 Capítulo V. Conclusões.....	 53
 Referências.....	 55

Capítulo I. Introdução

I.1. Considerações Gerais sobre a Ureia

A ureia é um composto orgânico cuja molécula é formada por duas aminas (-NH₂) ligadas por um grupo funcional carbonila (-CO-) (**Figura 1**). É composta por nitrogênio e caracterizada como excelente doadora de par de elétrons livres.

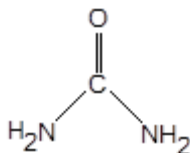


Figura 1. Fórmula estrutural da ureia.

Também chamada de carbamida, a ureia apresenta ponto de fusão 132,7°C e é solúvel em água, álcool etílico e ácido clorídrico concentrado, sendo insolúvel em clorofórmio e éter. Soluções aquosas de ureia se decompõem vagarosamente em amônia e dióxido de carbono com eventual formação de carbonato de amônio.

Sintetizada no fígado como produto final do catabolismo proteico, a ureia é um regulador fisiológico da excreção do nitrogênio em mamíferos, sendo excretada através da urina¹. É o primeiro composto orgânico a ser sintetizado artificialmente a partir de um sal inorgânico.

I.2. Importância da Ureia

Sendo produzida em escala de milhões de toneladas por ano, a ureia apresenta várias aplicações destacando-se entre elas a produção de plásticos, fertilizantes e herbicidas agrícolas, alimentos para ruminantes, estabilização de explosivos de nitrocelulose, aumento de solubilidade de corantes na indústria têxtil, dentre outros. É também encontrada em ampla variedade de produtos de consumo tais como desodorantes, xampus, loções, condicionadores de cabelo, tinturas de cabelo e removedores de tintura, sabonetes líquidos, detergentes e outros produtos de limpeza.

A ureia não se destaca apenas no âmbito industrial, ela tem uma importância crescente também na área da medicina e dos cosméticos. Por exemplo, a ureia tem sido excessivamente incorporada como ingrediente ativo em formulações dermatológicas e cosméticas indicadas para tratamento de pele ressecada² pelo fato de apresentar propriedades queratolíticas e umectantes³. A concentração máxima

de ureia nesses produtos está comumente entre 1 – 10%². Na medicina, uma ampla variedade de doenças renais é associada a um aumento de sua concentração no plasma^{4,5}. No corpo humano a avaliação desse aumento é um importante parâmetro para a estimativa do funcionamento do rim para fins de tratamentos de hemodiálise^{6,7}, e nos animais é tanto indicativo da condição nutricional dos mesmos como também de seu funcionamento renal⁸.

A detecção da ureia em bebida é importante, pois a mesma atua como adulterante em amostras de leite e em bebidas alcoólicas, sendo um subproduto indesejável da fermentação microbiana por ser precursora de etilcarbamatos, conhecidos como carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos⁹. Esta reação é promovida através de aquecimento sob circunstâncias ácidas, destilação e armazenamento por longo tempo¹⁰.

O nitrogênio é um dos principais nutrientes encontrados em fertilizantes, pode estar na forma de um sal inorgânico de nitrato, amônia ou ureia. O controle da quantidade dos componentes químicos presentes em fertilizantes é extremamente importante, pois a mesma é regulada por normas governamentais, e por isso é necessário que se obtenham medidas confiáveis dos seus componentes¹¹.

Diante da diversidade de uso nos mais variados setores, a ureia é considerada uma substância primordial, fazendo-se necessário o desenvolvimento de metodologias para a sua determinação e quantificação em sistemas onde a mesma é encontrada.

I.3. Métodos para Determinação de Ureia

Devido a sua ampla utilização nas mais variadas áreas, a determinação de ureia em matrizes diversas tem sido extensivamente pesquisada. Levantamento bibliográfico foi feito nas principais bases de dados e vários métodos descritos para a determinação de ureia foram encontrados em todas as áreas presentes na química. Na Tabela 1 são destacados os mais representativos.

Diferentes métodos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), potenciométricos, colorimétricos, fluorimétricos, enzimáticos, amperométricos, espectrofotométricos, luminescência e procedimentos em fluxo foram propostos para a determinação de ureia e nenhuma das técnicas é dominante em todas as áreas por causa da diversidade de aplicações¹².

Tabela 1. Métodos utilizados para a determinação de ureia.

Métodos para Determinação de Ureia	Faixa de Linearidade	Limite de Detecção	Aplicação (Tipo de amostra)	Referências
Espectrofotometria	6 – 90 mg L ⁻¹	0,34×10 ⁻³ mg L ⁻¹	Cosméticos e formulações dermatológicas	2
	0,5 – 15,0 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	Destilados de Cana de Açúcar	10
	até 25 mg L ⁻¹	–	Fertilizantes	13
Espectrofotométrico seguido por CCD	–	–	Plasma	14
Espectrofotométrico baseado em microplacas ou metodologias de FIA	2 – 54 mg L ⁻¹	–	Extratos de solo	15
	–	0,02 mg L ⁻¹		
Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica	120 -720 mg L ⁻¹	–	Plasma sanguíneo de animal - Vegetais como fonte de urease	5
FIA / Coluna de urease	0,96 – 60 mg L ⁻¹	–	Bebidas alcoólicas (Vinhos)	16
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	6×10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,003 mg L ⁻¹	Urina animal e humana, Vinho	17
	60 – 140 mg L ⁻¹	7,5 mg L ⁻¹		18 19
Técnicas Cromatográficas	0,1 – 100 mg L ⁻¹	7×10 ⁻⁵ – 13×10 ⁻⁵ mg g ⁻¹	Solos	20
Ultramicroensaio fluorimétrico	–	7,2×10 ⁻⁷ mg	Fluido tubular do rim	21
Cromatografia Líquida	50 – 400 mg L ⁻¹	–	Fertilizantes	22
Cromatografia Iônica com detecção condutométrica	–	–	Fertilizantes	11
Sistema de Sensores de dois eletrodos combinado com célula de dois compartimentos	–	–	Urina	23
Ensaio baseado em Luminescência	–	–	Plasma humano	24
FIA com Detecção Potenciométrica	0,036 – 9,0 mg L ⁻¹	–	Leite	25
Termogravimetria / Espectrometria de Massas com Eletrodo modificado com Urease e detecção Potenciométrica	0,03×10 ³ – 3×10 ³ mg L ⁻¹	–	Matriz de sílica-gel - Enzima urease	26
Colorimétrico e Enzimático	0 - 20×10 ⁻³ mg L ⁻¹	–	Leite	27
Método de Kjeldahl	–	–	Fertilizantes	28

Alguns desses métodos, apesar de apresentarem boa detectabilidade para determinação de ureia, apresentam desvantagens tais como procedimento laborioso, alto custo de análise (por utilizarem equipamentos e materiais sofisticados), alto de tempo de execução e o consumo de grandes quantidades de solventes e reagentes, contrariando os Princípios da Química Verde^{29,30}.

I.4. Espectroscopia de Reflectância Difusa associada a *spot test*

As reações de *spot tests* têm sido largamente utilizadas nas últimas décadas devido a sua simplicidade, rapidez e economia de tempo. A composição de um *spot test* é muito simples e consiste na utilização de um volume relativamente pequeno de cada solução reagente para ocorrência da reação e obtenção de um produto colorido caracterizado por uma mancha, cuja uniformidade e coloração dependem da concentração, ordem de adição e volume dos reagentes, assim como da qualidade do suporte sólido³¹. A observação desses detalhes é importante para a boa elaboração do *spot test* e consequente obtenção de medidas precisas e resultados confiáveis³².

O desenvolvimento de dispositivos ópticos, como fibras ópticas, esferas de reflectância e reflectômetros, associados ao uso do *spot test* tem dado a Espectroscopia de Reflectância Difusa uma grande importância em química quantitativa³³. A radiação refletida é composta por um componente especular e um componente difuso³⁴, sendo este último caracterizado pela quantidade de radiação difusa refletida (T_R), cuja medida se baseia a técnica de Espectroscopia de Reflectância Difusa.

O componente especular ocorre a partir de superfícies lisas enquanto o componente difuso resulta da penetração da radiação incidente no interior do suporte sólido e irregular. Parte da radiação incidente retorna à superfície da amostra após ter sofrido absorção e reflexão múltiplas de cada uma das partículas que a compõem. Desta maneira, a radiação é dispersa em uma faixa de vários ângulos.

O sinal de reflectância registrado pelo reflectômetro e também chamado de poder de reflexão (R) está diretamente relacionado à concentração de analito no suporte sólido e é definido pela relação mostrada na Equação 1:

$$R = \frac{I}{I_0} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde I_0 é a intensidade da energia radiante incidente e I é a intensidade da energia que é refletida para o meio. Portanto, o valor de R está sempre entre os limites $0 < R < 1$. A intensidade óptica em medidas de reflectância é dada por

$$A_R = -\log R^{33}.$$

A Espectroscopia de Reflectância Difusa associada ao *spot test* é uma metodologia extremamente simples, rápida, econômica e menos poluente que promove baixo ou nenhum risco ao operador e ao meio ambiente. Dessa forma, ela é considerada uma metodologia limpa ou verde ou - ainda - ambientalmente benigna²⁹, tornando-se atrativa e promissora em análise quantitativa³⁴ por estar em total consonância com os Princípios da Química Verde^{29,30}.

1.5. Química Verde

A Química exerce um papel importante na fabricação de inúmeros produtos fundamentais à sociedade. No âmbito industrial, a química analítica é empregada no controle de qualidade e desenvolvimento dos mesmos, sendo ferramenta indispensável na gestão de qualidade como também em gestão ambiental.

Devido à utilização de grandes quantidades de substâncias tóxicas e à geração de resíduos perigosos, dentro de um processo analítico várias metodologias contribuem para o impacto no meio ambiente. Tais inconvenientes têm relacionado a atividade química a desastres ambientais, contudo, sabe-se que diferentes atividades humanas contribuem para o processo de degradação ambiental²⁹.

A preocupação mundial com esses inconvenientes ao meio ambiente é visivelmente notada nos dias atuais. Redução de emissões industriais e preservação de reservas ambientais são assuntos de discussão entre diversos governos. Intensificam-se as ações de grupos ambientalistas contra a poluição de águas e do ar, reivindicando o cumprimento de medidas que solucionem esses problemas de forma a minimizar consequências desastrosas para o meio ambiente.

A pressão sobre as indústrias químicas tanto por parte da sociedade como de autoridades governamentais cresce continuamente no sentido de aperfeiçoar o desenvolvimento de processos para que estes se tornem ambientalmente amigáveis³⁵. Por esta razão, a elaboração de procedimentos mais limpos na área de Química Analítica, tanto no setor industrial como no campo da pesquisa, é imprescindível³⁰.

Nesse contexto surge a Química Verde (também chamada de Química Limpa ou Química Ambientalmente Benigna ou Química Autossustentável²⁹), uma linha de pensamento que tem se difundido continuamente com a finalidade de aliar a Química ao meio ambiente. O seu grande desafio é o desenvolvimento contínuo e a manutenção e melhora da qualidade de vida das pessoas³⁵, sem prejuízo ambiental, ou seja, buscando a autossustentabilidade.

A Química Verde é regida por 12 Princípios que preconizam a redução dos resíduos na fonte; a incorporação dos átomos dos reagentes nos produtos finais desejados; sínteses com compostos de menor toxicidade; diminuição de solventes e auxiliares ou utilização de substâncias inócuas nos processos; condução de sínteses à pressão e temperatura ambientes diminuindo assim o gasto com energia no processo químico e, conseqüentemente, o impacto econômico e ambiental; utilização de fontes renováveis de matéria-prima; redução na geração de derivados, que geram subprodutos indesejáveis; utilização de catalisadores para aumentar a velocidade e rendimento de reações, possibilitando a reciclagem e reutilização do mesmo; desenvolvimento de produtos para degradação inócua e que não persistem no meio ambiente; desenvolvimento de metodologias para análise em tempo real e controle da poluição; química segura para a prevenção de acidentes, onde as substâncias e sua utilização são escolhidas de forma a se prevenir acidentes em potencial como explosões, incêndios e vazamentos^{29, 35}.

A aplicação dos conceitos da Química Verde é fundamental para o desenvolvimento de metodologias analíticas que visem à autossustentabilidade. Cientistas têm se dedicado ao seu estudo e muitos trabalhos envolvendo tecnologias mais limpas tem sido desenvolvidos. Uma preocupação mundial em reduzir emissões industriais tem se tornado frequente levando à implantação de políticas que englobem o incentivo às tecnologias verdes. Pelo exposto, a utilização da Química Ambientalmente Amigável está procurando ser alcançada.

Capítulo II. Justificativa e Objetivos

Por sua importância, a ureia vem sendo empregada na manufatura de muitos produtos com diversas aplicabilidades. Por apresentar essa variedade de utilização, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias mais limpas e ambientalmente amigáveis para a determinação e quantificação desta substância em sistemas onde a mesma é encontrada.

Diante das considerações apresentadas, os objetivos desse trabalho são:

- O desenvolvimento de um método analítico limpo, simples, rápido e sensível para a determinação quantitativa de ureia utilizando a técnica de Espectroscopia de Reflectância Difusa;
- A aplicação do método proposto na determinação quantitativa de ureia em amostras comerciais de fertilizantes adquiridas no comércio local;
- A validação do método proposto.

Capítulo III. Parte Experimental

III.1. Equipamentos, Reagentes e Preparo de Soluções

III.1.1. Equipamentos

Para o desenvolvimento do método por Espectroscopia de Reflectância Difusa utilizou-se um reflectômetro portátil da Ocean Optics Inc. composto de uma esfera integradora e acoplado a um espectrofotômetro USB2000 com um software OOIBase32. O mesmo foi calibrado com um *spot test* com ensaio em branco, ou seja, o *spot test* contendo o reagente, porém etanol no lugar do analito. O suporte sólido utilizado foi um papel de filtro da marca WHATMAN 1.

Todas as soluções destinadas à investigação reflectométrica foram preparadas com etanol. Nas medidas volumétricas foram empregadas buretas classe A, vidraria de classe A e micropipetas GILSON U1000 (200 - 1000 μ L) e Eppendorf (10,0 – 100,0 μ L). As pesagens foram feitas em balança analítica modelo AG204 da METTLER TOLEDO.

Para a solubilização das soluções acima mencionadas foi utilizado um banho de ultrassom da marca THORNTON. Um secador de cabelos da marca Tany foi empregado na secagem das amostras assim que as mesmas foram colocadas no suporte sólido.

Para o tratamento dos dados obtidos foram utilizados microcomputadores com programas computacionais de cunho científico (Minitab 15 e Statistica 6).

III.1.2. Reagentes

Os reagentes de grau analítico utilizados para o desenvolvimento da metodologia analítica por Espectroscopia de Reflectância Difusa foram:

- a) Ureia (H_2NCONH_2) 99,9%, (Sigma[®]);
- b) *p*-dimetilaminocinamaldeído ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}$) (*p*-DAC, 98%), (Aldrich[®]);
- c) Ácido clorídrico 37% (m/m) MERCK;
- d) Papel de filtro qualitativo da marca WHATMAN 1;
- e) Amostras comerciais de fertilizantes;
- f) Etanol p.a., utilizado como solvente no preparo de todas as soluções.

III.1.3. Preparo de soluções utilizadas no presente estudo

III.1.3.1. Solução de ureia

- **Solução estoque de ureia 4000 mg L⁻¹ (6,660.10⁻² mol L⁻¹)**

Pesou-se 0,1000 g de ureia, solubilizou-se em etanol e a mesma foi submetida a 5 minutos de sonificação em ultrassom. Em seguida, transferiu-se quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 25,00 mL, completando-se o volume com etanol.

- **Soluções de trabalho de ureia**

Para a construção da curva analítica para a determinação de ureia por Espectroscopia de Reflectância Difusa, as soluções de trabalho utilizadas foram preparadas mediante diluições adequadas da solução estoque de 4000 mg L⁻¹ (6,660.10⁻² mol L⁻¹) para um balão volumétrico de 2,00 mL. Os volumes das alíquotas e as concentrações das soluções de trabalho estão relacionados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Volumes tomados da solução estoque de ureia e as respectivas concentrações das soluções de trabalho.

V _{solução estoque} (mL)	Ureia (mg L ⁻¹)	Ureia (mol L ⁻¹)
0,0250	50,0	8,33×10 ⁻⁴
0,0500	100	1,67×10 ⁻³
0,0750	150	2,50×10 ⁻³
0,1000	200	3,33×10 ⁻³
0,1250	250	4,16×10 ⁻³
0,1500	300	5,00×10 ⁻³

Em todos os experimentos, as soluções preparadas foram imediatamente utilizadas.

III.1.3.2. Soluções de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) em HCl utilizadas para o desenvolvimento do presente método

As soluções de *p*-DAC utilizadas para o desenvolvimento do presente método foram preparadas conforme se segue.

Soluções utilizadas no estudo qualitativo preliminar

- **Solução 1,960% (m/v) de *p*-DAC em HCl 1,208 mol L⁻¹:** pesou-se 0,2000 g de *p*-DAC e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,00 mL, adicionando-se etanol e em seguida 1,00 mL de HCl 37% (m/m). Após a completa dissolução da massa de *p*-DAC em banho de ultrassom, completou-se o volume com etanol.
- **Solução 0,0406% (m/v) de *p*-DAC em HCl 0,0250 mol L⁻¹:** 207 µL foram tomados da solução 1,960% de *p*-DAC em HCl 1,208 mol L⁻¹ e transferidos para um balão volumétrico de 10,00 mL, completando-se o volume com etanol.
- **Solução 0,0980% (m/v) de *p*-DAC em HCl 0,0470 mol L⁻¹:** pesou-se 0,0100 g de *p*-DAC e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,00 mL. Adicionou-se etanol e, em seguida, 0,505 mL de HCl 0,931 mol L⁻¹. Após a completa dissolução da massa de *p*-DAC em banho de ultrassom, completou-se o volume com etanol.

Soluções utilizadas na construção da curva analítica para determinação de ureia

- **Soluções 0,335% e 0,196% (m/v) de *p*-DAC em HCl 0,0549 mol L⁻¹:** pesou-se 0,0171 g e 0,0100 g de *p*-DAC, respectivamente, e transferiu-se para balão volumétrico de 5,00 mL, adicionando-se etanol e 295 µL de HCl 0,931 mol L⁻¹. Após a completa dissolução da massa de *p*-DAC em banho de ultrassom, completou-se o volume com etanol. Tais soluções foram utilizadas para a construção da curva analítica após serem obtidas no estudo da otimização dos parâmetros experimentais do método em desenvolvimento.

III.1.3.3. Soluções de Ácido Clorídrico

- **Solução 0,931 mol L⁻¹ de HCl:** preparada por diluição adequada a partir da solução concentrada 37% (m/m) (MERCK) e padronizada por titulometria de neutralização³⁶;
- **Solução 0,0549 mol L⁻¹ de HCl:** preparada por diluição adequada a partir da solução 0,931 mol L⁻¹ de HCl que foi convenientemente padronizada.

III.1.3.4. Soluções de Amostras Comerciais de Ureia

· Amostras sólidas de Fertilizantes

As soluções estoques de amostras de fertilizantes foram preparadas pesando-se 0,4000 g do sólido. Tal massa foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100,00 mL adicionando-se etanol e, em seguida, mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após a completa dissolução da massa do fertilizante completou-se o volume com etanol.

As soluções de trabalho das amostras de fertilizantes (200 mg L^{-1} / $3,33 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas por diluição adequada da solução estoque com etanol.

III.2. Spot Test

O *spot test* é uma reação em papel cuja formação do produto de reação se dá com a observação de uma mancha colorida. Para a sua realização, um papel de filtro qualitativo da marca WHATMAN 1 - cortado em formato 3 cm × 3 cm e contendo uma haste de aproximadamente 3 cm para a sua manipulação - foi colocado na parte inferior de um suporte conforme pode ser visto na **Figura 2**, de acordo com o procedimento descrito na literatura⁴⁰. Em seguida, as soluções foram colocadas no centro do papel de filtro qualitativo com o auxílio de uma micropipeta Eppendorf fixa no suporte. A ordem de adição foi analito seguido de secagem com ar frio de um secador de cabelos e adição de reagente com posterior secagem a temperatura ambiente.

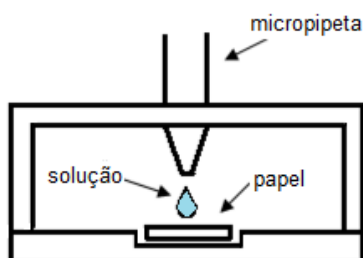


Figura 2. Suporte utilizado na realização dos *spot tests*. Adaptado da referência 40.

Capítulo IV. Metodologia, resultados e discussão

IV.1. Utilização do *p*-DAC como reagente cromogênico

Estudos qualitativos preliminares foram realizados com o reagente cromogênico *p*-DAC a fim de se definir uma reação adequada para a aplicação da Espectroscopia de Reflectância Difusa na determinação de ureia; sendo esta um método limpo e ainda não haver registros de sua aplicação para ureia na literatura. Observou-se a formação de um produto de coloração rósea praticamente estável na reação entre *p*-DAC e a ureia.

O *p*-DAC em meio ácido é bastante aplicado na determinação de aminas³⁷, a reação envolve a condensação do grupo amino protonado do analito com o grupo carbonila presente em sua estrutura formando um sal imínio^{38,39}. Ele é um composto de coloração amarela, cuja fórmula estrutural está apresentada na **Figura 3**.

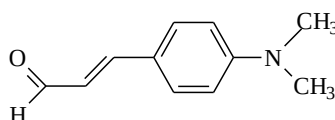
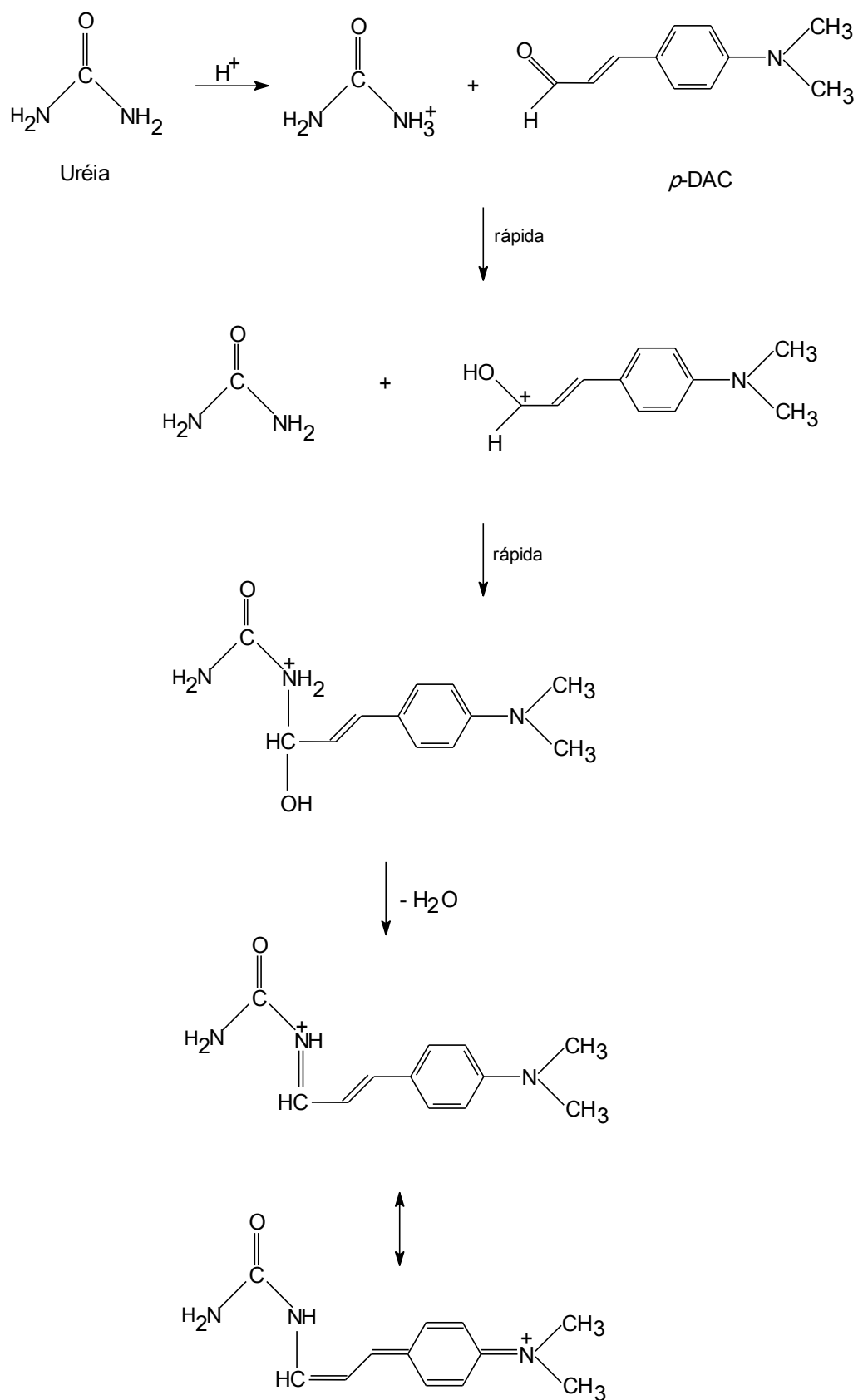


Figura 3. Fórmula estrutural do *p*-dimetilaminocinamaldeído.

No **Esquema 1** é apresentado o provável mecanismo para a reação entre a ureia e o *p*-DAC.



Esquema 1. Provável mecanismo da reação entre a ureia e o *p*-DAC, em meio ácido.

IV.2. Preparo dos *spot tests*

Os *spot tests* foram realizados de acordo com a seguinte ordem de adição dos reagentes: 20,0 μL da solução-estoque de ureia 4000 mg L^{-1} ($6,660 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), secagem com ar frio do secador e em seguida 20,0 μL da solução do reagente *p*-DAC em HCl para a obtenção de uma mancha com maior uniformidade e com diâmetro de aproximadamente 2 cm.

Após a adição do reagente e secagem a temperatura ambiente, submeteu-se o *spot test* à leitura da reflectância em reflectômetro portátil da Ocean Optics Inc. acoplado a um espectrofotômetro USB2000 e já calibrado com um ensaio em branco. O máximo de A_R ocorreu no comprimento de onda de 535 nm. O espectro de reflectância do produto de reação com valor máximo de A_R (densidade óptica para medida de reflectância) no referido comprimento de onda se encontra representado na **Figura 4**.

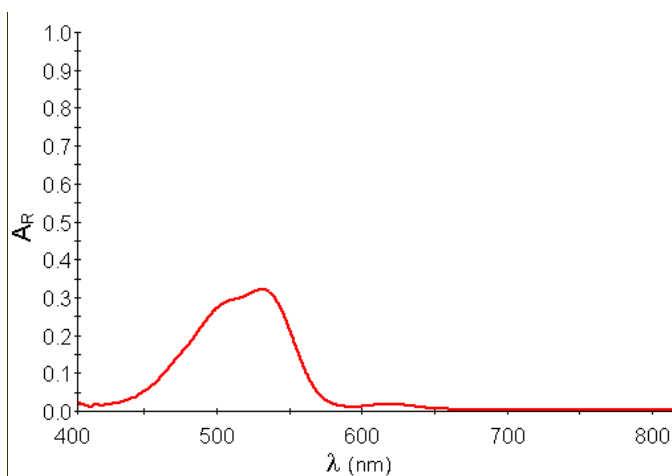


Figura 4: Espectro de reflectância do produto de reação entre ureia e *p*-DAC em papel de filtro qualitativo WHATMAN 1 como suporte sólido. Valores de A_R obtidos após a secagem do analito com secador e secagem do reagente ao ar livre. Valor máximo de A_R em 535 nm. Concentração de ureia: 250 mg L^{-1} .

Os resultados obtidos para os ensaios qualitativos preliminares estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Valores de reflectância (535 nm) relativos aos *spot tests* com 20,0 μL de solução de ureia 4000 mg L^{-1} em meio de H_2O desionizada e 20,0 μL de solução de *p*-DAC em meio de HCl e etanol, com concentrações variadas. Número de replicatas: 3.

Concentração de ureia (mg L^{-1})	A_r (535nm)	
	<i>p</i> -DAC 0,0406% (m/v) em HCl 0,0250 mol L^{-1}	<i>p</i> -DAC 0,0980% (m/v) em HCl 0,0470 mol L^{-1}
4000	0,4246	0,5534

Dentre os resultados dos ensaios qualitativos apresentados na tabela, aquele que se apresentou satisfatório para a aplicação da Espectroscopia de Reflectância Difusa na determinação de ureia na região visível do espectro eletromagnético foi o que utilizou a solução de *p*-DAC 0,0980% em HCl 0,0470 mol L^{-1} (maior sinal de reflectância obtido e com superfície homogênea). Nesta etapa, água desionizada estava sendo utilizada para a solubilização da ureia, enquanto que o reagente *p*-DAC em HCl já se encontrava em etanol.

Após a constatação da uniformidade da mancha obtida, que não foi muito satisfatória, optou-se por iniciar a otimização das condições experimentais através do planejamento fatorial 2^2 para essas duas concentrações de cada um dos reagentes, utilizando-se também etanol como solvente para ureia.

IV.3. Planejamento Experimental

A otimização das condições experimentais para o método proposto foi feita por meio dos planejamentos fatorial e composto central para a obtenção da superfície de resposta.

IV.3.1. Planejamento Fatorial 2^2

Iniciou-se a otimização pelo planejamento fatorial 2^2 , que nada mais é do que uma triagem para se avaliar os efeitos principais de cada uma das variáveis. As variáveis estudadas foram as concentrações de *p*-DAC e de HCl, codificadas em níveis conforme apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento fatorial 2². Solvente: etanol, para todos os reagentes.

Ensaio	Níveis		C _(p-DAC) (%)	C _(HCl) (mol L ⁻¹)
	p-DAC	HCl		
1	+	+	0,0980	0,0470
2	-	+	0,0406	0,0470
3	+	-	0,0980	0,0250
4	-	-	0,0406	0,0250

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Valores de reflectância (535 nm) e seus respectivos coeficientes de variação obtidos para o planejamento fatorial 2². 20,0 µL de solução de ureia 4000 mg L⁻¹ e 20,0 µL de solução de p-DAC em meio de HCl. Solvente: etanol. Número de replicatas: 3.

Ensaio	C _(p-DAC) (%)	C _(HCl) (mol.L ⁻¹)	A _r (535nm)	C V (%)
1	0,0980	0,0470	0,7729	1,42
2	0,0406	0,0470	0,4555	4,78
3	0,0980	0,0250	0,6952	1,41
4	0,0406	0,0250	0,5317	1,21

Pelos resultados obtidos verificou-se que a utilização do etanol como solvente também para ureia promove uma maior uniformidade à mancha obtida para o produto de reação, aumentando desta forma a sensibilidade da reação (evidência de maior sinal para as mesmas concentrações de p-DAC e HCl já estudadas nos ensaios preliminares).

A variável que causa maior efeito na reação é a concentração de p-DAC e a concentração de HCl não é tão significativa para a promoção da reação. Por exemplo, quando se tem a reação com p-DAC 0,0980%, a variação do sinal de A_R quando o mesmo está em HCl 0,0250 ou em 0,0470 mol L⁻¹ (0,6952 e 0,7729, respectivamente) não é tão grande, enquanto que o mesmo não ocorre quando se tem a concentração de HCl fixa em 0,0470 mol L⁻¹ e se varia a concentração de p-DAC em 0,0406 e 0,0980% (0,4555 e 0,7729, respectivamente).

Isso pode ser evidenciado na **Figura 5**, obtida utilizando-se o programa Minitab 15, onde se vê a obtenção de maior sinal de reflectância quando a concentração de *p*-DAC está no nível +1, enquanto que para a concentração de HCl - esteja ela no nível -1 ou +1 do planejamento - o sinal de reflectância obtido é praticamente o mesmo.

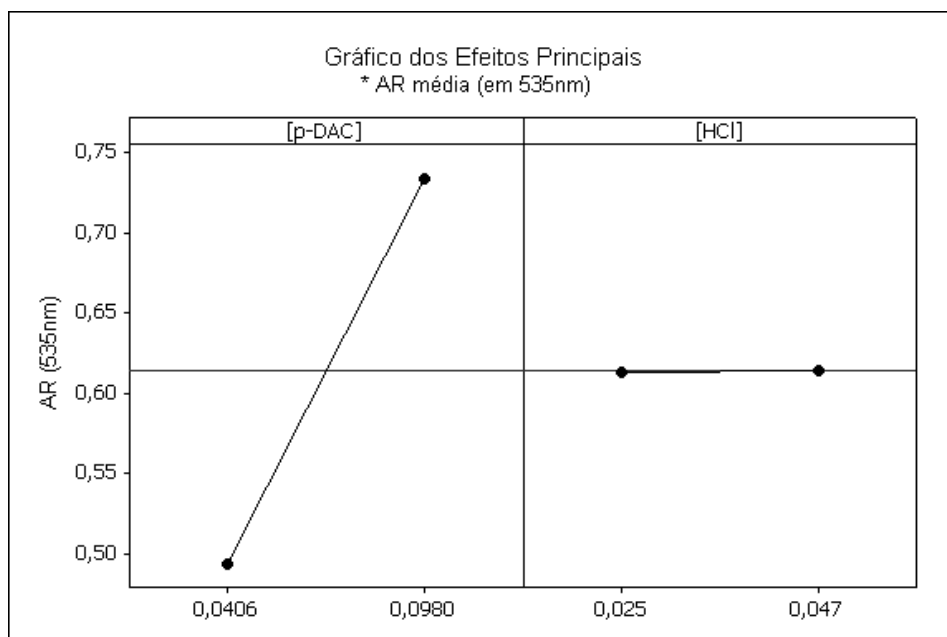


Figura 5. Gráfico dos efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de reflectância obtido.

A partir destes resultados, selecionou-se a faixa de concentração das variáveis experimentais para o estudo em questão (*p*-DAC: 0,0606 - 0,455% (m/v) e HCl 0,010 - 0,102 mol L⁻¹) e iniciou-se o estudo do seu efeito pelo planejamento de composto central para a obtenção da superfície de resposta. Verificou-se que o intervalo de concentração de estudo selecionado para as variáveis é maior para o *p*-DAC por ele ser mais significativo para a promoção da reação do que o HCl.

IV.3.2. Planejamento Composto Central para obtenção da Superfície de Resposta

Após a triagem por meio do planejamento fatorial 2² e seleção das faixas de concentração das variáveis para o estudo, deu-se sequência à otimização das condições experimentais aplicando-se o planejamento composto central para a obtenção da superfície de resposta. As variáveis estudadas (concentrações de *p*-DAC e de HCl) estão codificadas em níveis e apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6. Variáveis estudadas e níveis estabelecidos no planejamento composto central.

Reagentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
[HCl] (mol L ⁻¹)	0,0102	0,0237	0,0563	0,0889	0,102
[p-DAC] (%)	0,0606	0,119	0,258	0,396	0,455

Para a realização deste planejamento foram feitas combinações dos diferentes níveis de cada uma das variáveis, totalizando-se treze ensaios apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Matriz de ensaios utilizados no planejamento composto central.

Ensaio	Nível [HCl]	Nível [pDAC]
1	- 1	- 1
2	- 1	+ 1
3	+ 1	- 1
4	+ 1	+ 1
5	0	- 1,41
6	0	+ 1,41
7	- 1,41	0
8	+ 1,41	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

A **Tabela 8** mostra os resultados obtidos para os ensaios estabelecidos pela matriz da **Tabela 7** assim como os valores de reflectância e seus respectivos coeficientes de variação.

Tabela 8. Valores de reflectância (535 nm) e seus respectivos coeficientes de variação obtidos para o planejamento de composto central. 20,0 µL solução de ureia 4000 mg L⁻¹ e 20,0 µL de solução de *p*-DAC em meio de HCl. Solvente: etanol. Número de replicatas: 3.

Ensaio	[HCl] (mol L ⁻¹)	[<i>p</i> -DAC] (%)	A _r (535nm)	C V (%)
1	0,0237	0,119	1,003	1,56
2	0,0237	0,396	0,9444	0,75
3	0,0889	0,119	0,6064	4,15
4	0,0889	0,396	0,9630	3,39
5	0,0563	0,0606	0,6495	2,96
6	0,0563	0,455	1,073	0,61
7	0,0102	0,258	0,8987	4,91
8	0,102	0,258	0,7537	6,06
9	0,0563	0,258	1,056	2,58
10	0,0563	0,258	1,045	3,80
11	0,0563	0,258	1,097	1,45
12	0,0563	0,258	1,051	5,17
13	0,0563	0,258	1,004	1,78

As ferramentas matemáticas e estatísticas existentes podem ser aplicadas à exploração de informações para obtenção de dados analíticos importantes. O planejamento composto central, por ser um modelo matemático quadrático, conforme descrito na Equação 2, permite avaliar criticamente a condição ótima para a realização dos experimentos por meio do gráfico de superfície de resposta apresentado na **Figura 6**.

$$Z = 0,698 + 1,81 x - 4,51 x^2 + 2,64 y - 84,4 y^2 + 21,5 xy \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde **Z** é o valor de reflectância em 535 nm, **x** é a concentração de *p*-DAC (% m/v) e **y** é a concentração de HCl (mol L⁻¹).

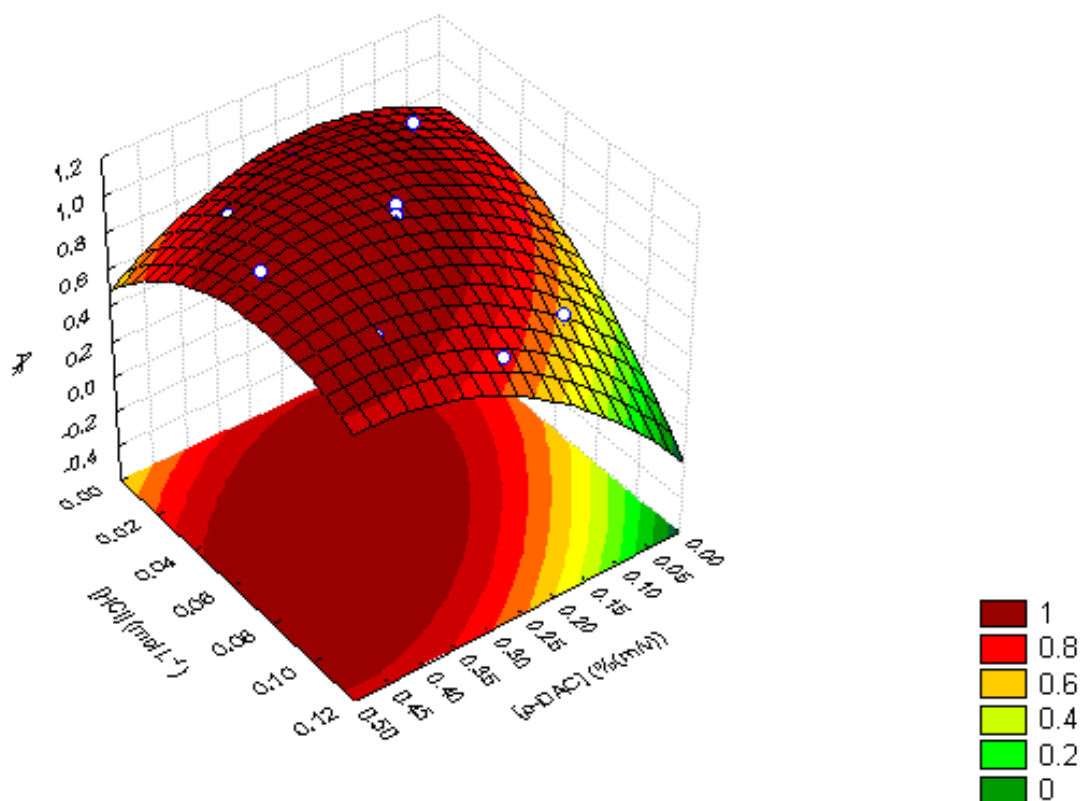


Figura 6. Gráfico da superfície de resposta otimizada para medidas de reflectância em 535 nm em função das variáveis: concentrações de HCl (mol L^{-1}) e de *p*-DAC (% (m/v)). Foi utilizada solução de ureia 4000 mg L^{-1} e etanol como solvente para todas as soluções.
Equação da superfície: $Z = 0,698 + 1,81 x - 4,51 x^2 + 2,64 y - 84,4 y^2 + 21,5 xy$.

O gráfico da superfície de resposta (**Figura 6**) referente aos dados da **Tabela 8** mostra que a sua região central (cor vermelho-escuro) apresenta o sinal analítico de melhor resposta, ou seja, o valor máximo de reflectância encontrado para as condições em que as variáveis foram estudadas, sendo desta forma a condição ótima para o experimento em questão.

Este mesmo resultado também pode ser visualizado pelo gráfico da curva de nível referente à superfície de resposta, apresentado na **Figura 7**.

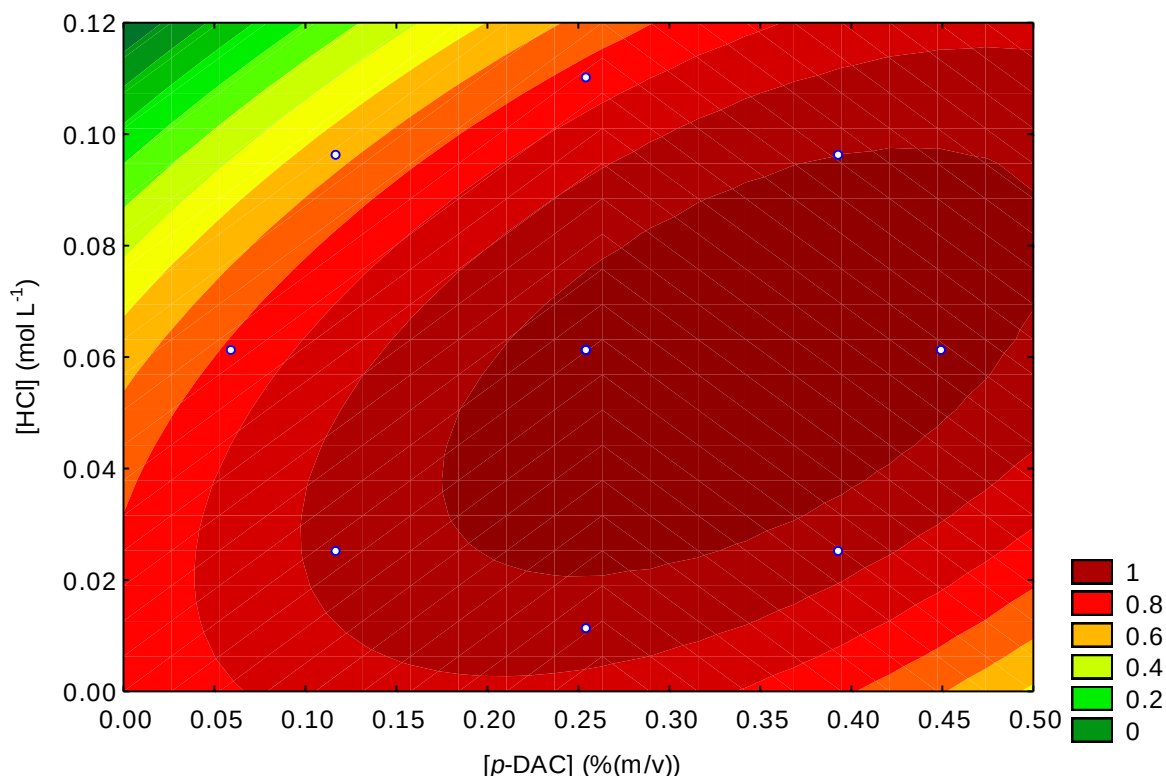


Figura 7. Gráfico da curva de nível referente à superfície de resposta da **Figura 6**.

O software empregado (Statistica 6) para obtenção da superfície de resposta forneceu os valores críticos de concentrações de *p*-DAC e HCl a serem utilizadas para obtenção do melhor sinal analítico e o valor de reflectância esperado. Esses valores foram calculados pelo software através da **Equação 2** e, em seguida, foram medidos experimentalmente para comparação entre os mesmos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Concentrações das variáveis em condições experimentais ótimas e seus respectivos valores de reflectância (535 nm).

Variáveis	Valores Críticos	A_R calculada	A_R medida*	C V (%)
[HCl] (mol L ⁻¹)	0,0549	1,087	1,076 ± 0,032	2,96
[<i>p</i> -DAC] (%)	0,335			

* Número de replicatas: 5.

Os resultados de A_R calculado e medido foram comparados e concluiu-se que os mesmos foram repetitivos e estão concordantes entre si, apresentando um coeficiente de variação de 2,96%.

IV.4. Estudo da Estabilidade do Produto de Reação

A avaliação da estabilidade do produto colorido obtido pela reação entre ureia e *p*-DAC em meio de HCl foi realizada com monitoramento do valor de reflectância em 535 nm a cada 5 minutos, durante o período de 75 minutos. Os resultados obtidos são apresentados no gráfico da **Figura 8**.

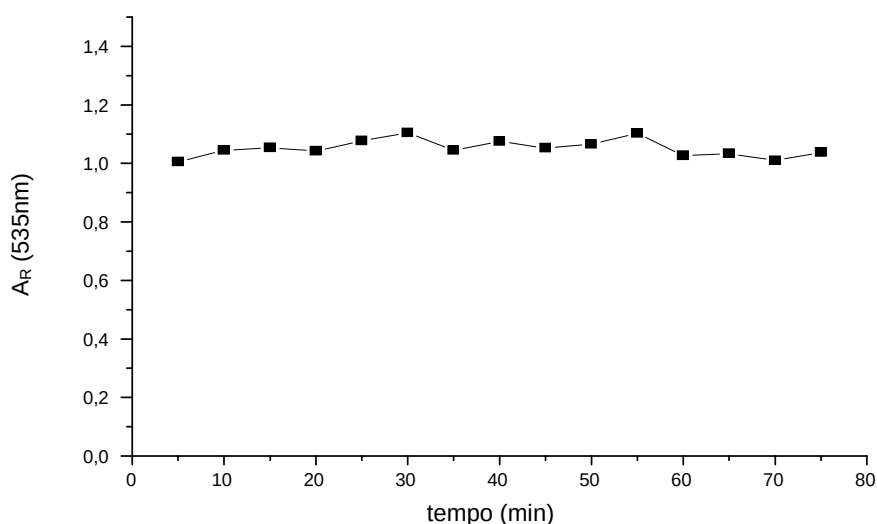


Figura 8. Estabilidade do produto de reação entre ureia (4000 mg L^{-1}) e *p*-DAC (0,335% (m/v) em HCl ($0,0549 \text{ mol L}^{-1}$)).

A **Figura 8**, que apresenta a estabilidade da reação entre o *p*-DAC (0,335% (m/v)) em HCl ($0,0549 \text{ mol L}^{-1}$) e ureia (4000 mg L^{-1}) de acordo com as condições ótimas obtidas pelo planejamento de composto central, indica que não há repetibilidade entre cada uma das medidas realizadas. A falta de repetibilidade e também oscilação entre as medidas foram constatadas para cada uma das concentrações de ureia utilizadas na construção da curva analítica.

Unindo as observações feitas durante essas duas etapas, concluiu-se que não seria possível realizar as medidas de reflectância quando se utiliza a concentração de 0,335% de *p*-DAC em HCl $0,0549 \text{ mol L}^{-1}$.

IV.5. Avaliação da Superfície de Resposta para obtenção de novo valor crítico para a concentração de *p*-DAC

Após a constatação de variabilidade entre as medidas no estudo de estabilidade do produto de reação e no começo de construção da curva analítica, a superfície de resposta já obtida (**Figura 6**) foi avaliada para a escolha de outro valor de concentração de *p*-DAC (maior responsável pela promoção da reação). A variabilidade de sinal apresentada se deve possivelmente à concentração de *p*-DAC. Supõe-se, portanto, que quando utilizado em altas concentrações, o *p*-DAC pode sofrer decomposição.

As concentrações de *p*-DAC que forneceram melhor sinal analítico evidenciado na superfície de resposta (região vermelha) foram novamente avaliadas, sem a variação na concentração de HCl (que permaneceu em 0,0549 mol L⁻¹). Avaliaram-se as concentrações de *p*-DAC: 0,0980%; 0,147%; 0,196%; 0,245% e 0,335% com uma concentração de ureia igual a 200 mg L⁻¹, pois a concentração de ureia utilizada anteriormente fornecia um sinal analítico mais alto do que aquele com o qual se costuma trabalhar.

Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de reflectância (535 nm) obtidos no estudo para a obtenção de novo valor crítico para [*p*-DAC]. 20,0μL solução de ureia 200,00 mg L⁻¹ e 20,0 μL de solução de *p*-DAC em meio de HCl 0,0549 mol L⁻¹. Número de replicatas: 3.

Ensaio	[<i>p</i> -DAC] (%)	A _r (535nm)
1	0,0980	0,1638
2	0,147	0,1972
3	0,196	0,2769
4	0,245	0,3195
5	0,335	0,3378

Pelos resultados obtidos verificou-se que a partir da concentração de 0,196% de *p*-DAC o sinal apresenta pouca variação. Optou-se, então, por trabalhar com esta concentração de *p*-DAC pelo fato dela ser menor do que a concentração com a qual se trabalhou anteriormente, fornecida pelo programa. Sendo menor, julgou-se que a mesma não ocasionaria oscilações e falta de repetibilidade no sinal analítico, como ocorrido com a concentração de 0,335% (m/v).

IV.6. Construção da Curva Analítica para Determinação de Ureia por Espectroscopia de Reflectância Difusa

Foram preparadas 6 soluções-padrão de ureia conforme descrito na **Tabela 2** do item III.1.3.1, com concentrações variando na faixa de 50,0 - 300 mg L⁻¹.

20,0 µL de cada uma das soluções foram colocadas no centro de um papel de filtro qualitativo WHATMAN 1 com o auxílio de uma micropipeta Eppendorf fixa em um suporte conforme procedimento descrito no item III.2. Em seguida o papel de filtro foi seco com o auxílio do ar frio de um secador e, posteriormente, adicionou-se o reagente *p*-DAC 0,196% (m/v) em HCl 0,0549 mol L⁻¹ e deixou-se o *spot* secar a temperatura ambiente. Após a secagem (aproximadamente 20 minutos), o mesmo foi submetido à leitura reflectométrica em 535 nm, calibrando-se anteriormente o equipamento com um ensaio em branco composto por etanol e *p*-DAC.

Na **Tabela 11** são apresentados os resultados obtidos. Na **Figura 9** está representada a curva analítica obtida através da aplicação de regressão linear aos dados da **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores de reflectância (535 nm) relativos às amostras com adição de 20,00 µL de ureia (com concentrações variáveis) e secagem com ar frio do secador; adição de 20,00 µL de *p*-DAC 0,196% (m/v) em HCl 0,0549 mol L⁻¹ e posterior secagem a temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos). Número de replicatas: 3.

C (mg L ⁻¹)	A _R (535 nm)
50,0	0,1090
100	0,1890
150	0,2340
200	0,2930
250	0,3340
300	0,3940

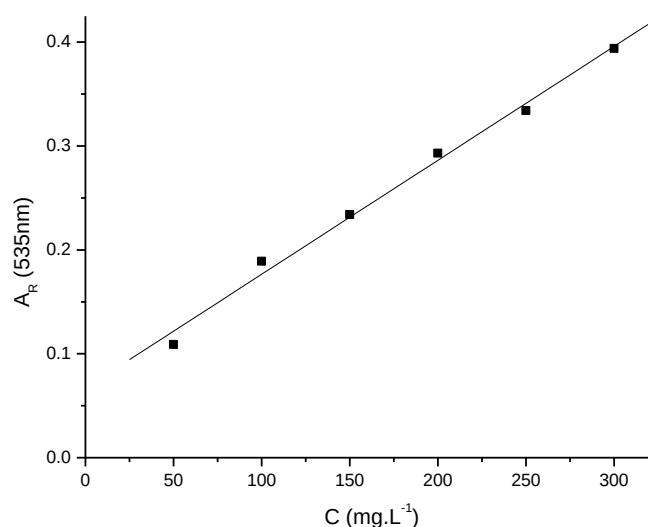


Figura 9. Gráfico da reflectância em função da concentração de ureia. Aplicação de regressão linear aos dados da **Tabela 11**. Concentração de ureia: 50,0 – 300 mg L⁻¹. Equação da reta: $A_R = 0,06693 + 0,0010966 C$. Coeficiente de correlação: 0,996.

Com a finalidade de verificar a repetibilidade da curva analítica, foram realizados outros experimentos no mesmo dia e em dias diferentes (repetibilidade intra-dia e inter-dia, respectivamente), apresentando resultados muito satisfatórios, constatando a boa repetibilidade do sistema. Estes experimentos foram realizados com a concentração de ureia 200 mg L⁻¹ e os resultados são apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Verificação das repetibilidades intra e inter-dia para a curva analítica construída para determinação de ureia. Número de replicatas: 10.

	Média de A_R (535nm)	C V (%)*
Repetibilidade Intra-dia	0,28 ± 0,014	4,94
Repetibilidade Inter-dia*	0,29 ± 0,013	4,46

* durante 3 dias.

A curva analítica para a determinação de ureia foi construída e apresentou um coeficiente de correlação linear de 0,996 com boa sensibilidade. Também foi verificada boa repetibilidade do sistema e estabeleceu-se uma faixa linear de concentração de ureia entre 50,0 e 300 mg L⁻¹.

IV.7. Estudo da Estabilidade do Produto de Reação

A avaliação da estabilidade do produto da reação entre ureia e *p*-DAC em meio de HCl foi realizada com monitoramento do valor de reflectância em 535 nm a cada 5 minutos, durante o período de 60 minutos. Os resultados obtidos são apresentados no gráfico da **Figura 10**.

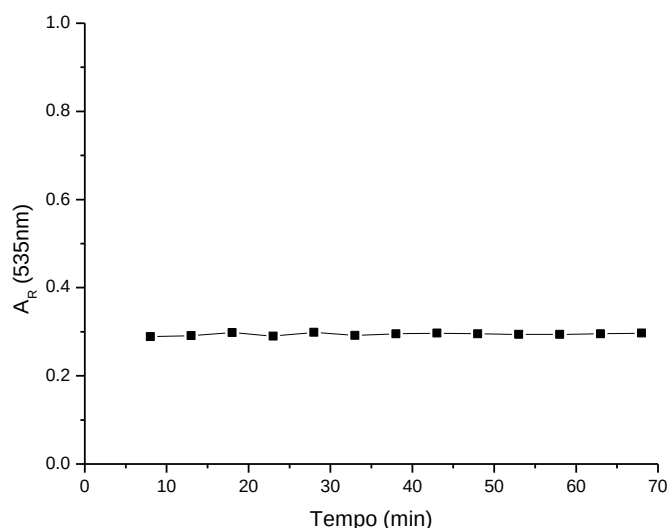


Figura 10. Estabilidade do produto de reação entre ureia (200 mg L^{-1}) e *p*-DAC ($0,196\%$ (m/v) em HCl ($0,0549 \text{ mol L}^{-1}$).

A **Figura 10** apresenta a estabilidade do produto da reação entre a ureia (200 mg L^{-1}) e o *p*-DAC ($0,196\%$ (m/v)) em HCl ($0,0549 \text{ mol L}^{-1}$) e sugere que as medidas podem ser realizadas no intervalo de 8 a 68 minutos, havendo pouca variabilidade de sinal.

IV.8. Cálculo do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ) para o Método Proposto

Os limites de detecção ($\text{LD} = 3 \text{ SD}_{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$) e de quantificação ($\text{LQ} = 10 \text{ SD}_{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$) para o método proposto foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC⁴¹ e apresentaram os valores de $5,13 \text{ mg L}^{-1}$ e $17,10 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, evidenciando a boa sensibilidade analítica do método desenvolvido.

IV.9. Determinação das Principais Figuras de Mérito para o Método Desenvolvido

As principais figuras de mérito e demais parâmetros experimentais para o método desenvolvido estão sumarizadas na **Tabela 13**.

Tabela 13. Parâmetros experimentais e Figuras de Mérito para o método desenvolvido.

Figuras de Mérito e demais parâmetros experimentais	
Linearidade da curva analítica	50,0 – 300 mg L ⁻¹
Equação da reta	$y = 0,066930 + 0,0010966.x$ (onde y: A _R e x: concentração de ureia)
Coeficiente de correlação (r)	0,996
Limite de detecção	5,13 mg L ⁻¹
Limite de quantificação	17,10 mg L ⁻¹
Comprimento de onda	535 nm
<i>p</i> -DAC	20,0 µL (0,196% (m/v))
HCl	20,0 µL (0,0549 mol L ⁻¹)
Ordem de adição	Analito seguido de <i>p</i> -DAC/HCl
Estabilidade do produto de reação	60 minutos

IV.10. Aplicações Analíticas e Validação do Método Analítico Desenvolvido

IV.10.1. Análise de amostras comerciais de fertilizantes

O método analítico desenvolvido foi aplicado na determinação de ureia em três amostras de fertilizantes adquiridas no comércio local e comparado com o método oficial²⁸ para determinação de ureia em fertilizantes. Os resultados estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Determinação de ureia em amostras comerciais de fertilizantes pelo método proposto.

AMOSTRA	MÉTODO PROPOSTO ^b (%)	MÉTODO OFICIAL ^c (%)	t^d (2,447)
A ^a	38,8 ± 1,6	41,3 ± 1,3	2,268
B ^a	42,9 ± 2,1	41,9 ± 0,9	- 0,765
C ^a	40,7 ± 0,9	41,6 ± 0,7	1,429

a: amostras sólidas, cujo conteúdo nominal declarado pelo fabricante está em função da porcentagem de nitrogênio presente na amostra (45%).

b: valor médio ± desvio padrão de cinco determinações.

c: valor médio ± desvio padrão de três determinações.

d: Valores com $P = 0,05$ (nível de confiança 95% ($n - 2$) graus de liberdade); t_{tabelado} : 2,447.

O método oficial para determinação de ureia em fertilizantes é o método de Kjeldahl da AOAC²⁸ (Association of Official Analytical Chemists) baseado na quantificação do nitrogênio total. Este método fundamenta-se na destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador e por ação do calor, com posterior destilação e titulação da amônia proveniente da amostra. Essas etapas do método oficial envolvem a utilização de grandes quantidades de reagentes, riscos de manuseio durante a abertura de amostras e da realização das determinações, uma vez que o mesmo é conduzido sob aquecimento, além de ser um procedimento demorado.

Os valores médios encontrados pelo método proposto variaram de 38,8 a 42,9% (valor expresso em porcentagem de nitrogênio presente na amostra de acordo com o fabricante) e os desvios-padrão de 0,9 a 2,1% (Tabela 14). Os resultados obtidos pelo método oficial²⁸ e pelo proposto foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste t de Student, com nível de confiança 95%. Os valores de t calculados para os três fertilizantes analisados não excederam os valores teóricos, indicando que não houve diferença significativa com relação à precisão e exatidão entre os métodos.

IV.10.2. Estudos de adição e recuperação nas amostras comerciais de fertilizantes

Para validação do método desenvolvido foram realizados estudos de recuperação através do método de adição de padrão. Nestes estudos, quantidades conhecidas de ureia (padrão analítico) foram adicionadas às soluções das amostras pré-analisadas.

As quantidades de padrão adicionadas correspondem a 50, 100, 150 e 200% da concentração de ureia presente nas amostras ($50,0 \text{ mg L}^{-1}$ / $8,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e 100 mg L^{-1} / $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). A **Tabela 15** apresenta as concentrações adicionadas e as recuperações obtidas para cada amostra de fertilizante.

Tabela 15. Resultados de recuperação de ureia adicionada em amostras de fertilizantes.

Amostras	[Ureia] adicionada (mg L ⁻¹)	[Ureia] recuperada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
A ^a	0	56,6 ± 2,7	-
	50	109,2 ± 3,5	102,4
	75	134,7 ± 2,8	102,4
	100	160,3 ± 6,5	102,3
	125	176,5 ± 6,9	97,2
			$\mu^b = 101,1 \pm 2,6$
B ^a	0	108,6 ± 7,3	-
	50	167,9 ± 5,0	105,9
	100	208,0 ± 2,6	99,7
	150	243,5 ± 1,9	94,2
	200	296,4 ± 3,7	96,0
			$\mu^b = 99,0 \pm 5,2$
C ^a	0	136,2 ± 1,4	-
	50	193,4 ± 6,6	103,9
	100	253,6 ± 6,4	107,4
	150	304,6 ± 4,2	106,4
	200	349,9 ± 4,7	104,1
			$\mu^b = 105,5 \pm 1,7$

a: amostras sólidas;

b: média ± RSD para 4 determinações.

De acordo com os resultados obtidos apresentados na **Tabela 15** observa-se que as médias percentuais de recuperação de ureia encontram-se entre 94,2 a 107,4%, evidenciando a boa exatidão do método proposto, além de mostrar que não há interferência de matriz.

Capítulo V. Conclusões

O método analítico limpo desenvolvido neste trabalho para a determinação de ureia utiliza a Espectroscopia de Reflectância Difusa combinada com *spot test* e foi aplicado com sucesso na análise de amostras comerciais de fertilizantes, apresentando boa precisão e exatidão.

A combinação Espectroscopia de Reflectância Difusa - *spot test* utilizando como suporte sólido um papel de filtro qualitativo, quando comparada aos métodos existentes na literatura (Tabela 1) para a determinação de ureia, apresenta uma boa sensibilidade e faixa linear abrangente (Tabela 13) e, embora o seu limite de detecção seja maior do que aquele apresentado pelos métodos já existentes, o mesmo não é crítico porque a concentração do analito nas amostras de fertilizantes é elevada.

O método desenvolvido possui boa seletividade evidenciada pela ausência de interferência de matriz e, diante desse resultado, surge uma perspectiva de aplicação deste método para verificação da interferência de outras aminas e de produtos de degradação de ureia.

O método desenvolvido proporciona ainda simplicidade de execução, baixo custo de análise e rapidez (atribuídos ao fato de o equipamento ser portátil, não oneroso e de fácil manipulação⁴²), além de baixo consumo de reagentes e quantidade mínima de resíduos gerados. Devido às vantagens mencionadas, o mesmo se caracteriza como ambientalmente amigável para determinação de ureia em fertilizantes, estando de acordo com os princípios preconizados pela Química Verde.

Referências

Referências

- 1 BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13th ed. Whitehouse Station, 1996.
- 2 BOJIC, J.; RADOVANOVIC, B.; DIMITRIJEVIC, J. Spectrophotometric determination of urea in dermatologic formulations and cosmetics. **Analytical Sciences**, v. 24, n. 6, p. 769-774, June 2008.
- 3 CORREIA, D. P. A.; MAGALHÃES, J. M. C. S.; MACHADO, A. A. S. C. Array of potentiometric sensors for simultaneous analysis of urea and potassium. **Talanta**, v. 67, n. 4, p. 773-782, Oct. 2005.
- 4 BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentos de química clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 558 p.
- 5 LUCA, G. C.; REIS, B. F. Sistema em fluxo para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima urease. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 191-194, 2001. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2001/vol24n2/07.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2010.
- 6 GRABOWSKA, I. et al. Miniaturized module with biosensors for potentiometric determination of urea. **Microchimica Acta**, v. 164, n. 3-4, p. 299-305, 2009.
- 7 RADOMSKA, A.; GLAB, S.; KONCKI, R. Spectrophotometric bioanalytical flow-injection system for control of hemodialysis treatment. **The Analyst**, v. 126, p. 1564-1567, 2001.
- 8 TARSICHE, I.; KORMOS, F.; PANTEA, C. Enzymic determination of urea in whole blood and blood serum of animal origin. **Revista de Chimie**, v. 51, n. 1, p. 8-12, 2000.
- 9 FRANCIS, P. S. The determination of urea in wine – a review. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 12, n. 2, p. 97-106, July 2006.
- 10 LABANCA, R. A.; GLORIA, M. B. A. Spectrophotometric determination of urea in sugar cane distilled spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5211-5215, 2008.

11 MENCONI, D. E. Determination of urea in fertilizers using ion chromatography coupled with conductometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 1790-1792, 1985.

12 FRANCIS, P. S.; LEWIS, S. W.; LIM, K. F. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 389-400, 2002.

13 WILDING, M. H.; BLANTON, E. L. Spectrophotometric determination of urea in ammonium nitrate fertilizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 596-598, May 1982.

14 RINK, M.; GEHL, A. Quantitative determination of urea in serum. Spectrophotometric determination following thin layer chromatographic separation on cellulose layers. **Journal of Chromatography A**, v. 24, n. 1, p. 219-219, 1966.

15 LAMBERT, D. F.; SHERWOOD, J. E.; FRANCIS, P. S. The determination of urea in soil extracts and related samples-a review. **Australian Journal of Soil Research**, v. 42, n. 7, p. 709-717, May 2004.

16 IIDA, Y. et al. Novel determination system for urea in alcoholic beverages by using an FIA system with an acid urease column. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 173-176, Jan. 2006.

17 CLARK, S. et al. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthidol. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1-2, p. 207-213, 2007.

18 QUN, X. et al. **Determination of urea and allantoin in cosmetics**. 2008. Disponível em: <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/Articles/Determination-of-Urea-and-Allantoin-in-Cosmetics>>. Acesso em: 09 nov. 2010.

19 DALLEY, P. et al. Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 2, p. 447-452, June 2000.

20 BUSZEWSKI, B. et al. Isolation and determination of urea herbicides in soil by hyphenated chromatographic techniques. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 13, p. 1933-1949, 2006.

21 LENG, L. et al. Simple fluorometric ultramicroassay for urea in tubular fluid of the kidney. **European Journal of Physiology**, v. 406, n. 6, p. 648-50, June 1986.

22 HOJJATIE, M. M.; ABRAMS, D. E.; PARHAM, T. M. Jr. Liquid chromatographic determination of urea in water- soluble urea- formaldehyde fertilizer products and in aqueous urea solutions: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 2, p. 346-351, 2004.

23 MIZUTANI, F. et al. Determination of urea and creatinine in urine by a two-electrode sensor combined with a two-compartment cell. **Sensors and Materials**, v. 16, n. 8, p. 383-390, 2004.

24 TSAI, H-C. et al. Development of luminescence-based assays for one-step determination of urea, creatinine, glucose and uric acid in undiluted human plasma. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETING, 229th, 2005, San Diego. **Abstracts...** San Diego: American Chemical Society, 2005.

25 LIMA, J. L. F. C.; DELERUE-MATOS, C.; VAZ, M. C. V. F. Flow injection system with potentiometric detection for the determination of urea content in milks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1386-1389, 1998.

26 OGURA, K. et al. Thermogravimetry / mass spectrometry of urease-immobilized sol-gel silica and the application of such a urease-modified electrode to the potentiometric determination of urea. **Analytica Chimica Acta**, v. 384, n. 2, p. 219-225, Mar. 1999.

27 BHAVADASAN, M. K.; RAJPUT, Y. S.; GANGULI, N. C. A simple colorimetric method for the determination of urea in milk. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 35, n. 3, p. 263-266, 1982.

28 ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**: methods 978.02 (2.4.05). 18th ed. Washington, 2005. Cap. 2, p.14.

29 LENARDÃO, E. J. et al. "Green Chemistry" – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

30 ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, Sept. 1999.

31 GOTARDO, M. A. **Desenvolvimento de métodos para análise de medicamentos utilizando reflectância difusa e espectrofotometria**. 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

32 LEMOS, S. C. **Desenvolvimento de metodologia alternativa limpa para análise de nitrito**. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

33 GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 2, p. 385-392, Feb. 1999.

34 GHAUCH, A. et al. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, June 2000.

35 PRADO, A. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

36 MENDHAM, J. et al. **Vogel**: análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1988. p. 236- 238.

37 SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with p-dimethylaminocinnamaldehyde: application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, Dec. 1993.

38 GOTARDO, M. A. et al. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 361-365, Oct. 2004.

39 EL SHERIF, Z. A. et al. Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using p-dimethylaminocinnamaldehyde. **Analytical Letters**, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.

40 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe (III), Cr (VI) and Ni (II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.

41 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

42 MARTINEZ, A. W. et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318-1320, Feb. 2007.