PAULO ROBERTO APARECIDO BUENO DE TOLEDO

Desenvolvimento de metodologia analítica ambientalmente mais amigável para a determinação de ureia em matrizes diversas

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza
Co-orientadora: Profª Drª Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2014

DADOS CURRICULARES

1. Formação Acadêmica
1.1. Graduação Licenciatura em Química: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP Instituto de Química – Araraquara Período: 2003 a 2007

1.2. Pós-Graduação Mestrado em Química: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP Instituto de Química – Araraquara Período: 2012 a 2014.

2. Trabalhos apresentados em Congressos
2.1. TOLEDO, P.R.A.B; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Desenvolvimento de metodologia analítica ambientalmente mais amigável para a determinação de ureia em cremes hidratantes. In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica – Belo Horizonte/MG, 2013.

2.2. TOLEDO, P.R.A.B. ; LISBOA, Helen Cristina Fávero ; Araújo, A.R. ; Trevisan, H.C. . Prospecção de atividade antimicrobiana e biocatalítica em fungos endofíticos. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Águas de Lindoia/SP, 2006.

2.3. TOLEDO, P.R.A.B. ; LISBOA, Helen Cristina Fávero ; Araújo, A.R. ; Trevisan, H.C. . Prospecção de atividade antimicrobiana e biocatalítica em fungos endofíticos. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Ilha Solteira/SP, 2005.

2.4. TOLEDO, P.R.A.B. ; LISBOA, Helen Cristina Fávero ; Araújo, A.R. ; Trevisan, H.C. . Prospecção de atividade antimicrobiana e biocatalítica em fungos endofíticos. In: XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Ilha Solteira/SP, 2004.

3. Atuação Profissional
3.1. Professor de química da rede municipal de ensino na cidade de Matão/SP (2009-2012) Enquadramento Funcional: Professor PEBII

PAULO ROBERTO APARECIDO BUENO DE TOLEDO

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

Araraquara, 16 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. LEONARDO PEZZA (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

Profª. Drª. EDILENE CRISTINA FERREIRA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

Prof. Dr. MATTHIEU TUBINO
Instituto de Química / UNICAMP / Campinas

DEDICATÓRIA

Primeiramente agradeço imensamente o apoio da minha família que sempre me deu forças, incentivo e estrutura para continuar minha caminhada, agradeço em especial minha esposa Lívia que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida, sempre me ajudando me dando conselhos com seu carinho e amor incondicionais.

Minha mãe Maria que sempre me incentivou, apoio e me estruturou para eu pudesse conquistar tudo o que eu conquistei até hoje.

Minha filha Luisa que é a minha alegria, minha luz e sempre fez com que quando nos momentos mais difíceis eu olhasse para o seu sorriso e todas as dificuldades e problemas desapareciam.

A Deus, por me guiar em toda a minha vida, sempre me abençoando colocando personagens incríveis na minha historia de vida e me dando forças para contornar os obstáculos e conquistar tudo que eu sempre sonhei.

Minha irmã Natalia, meu cunhado Ricardo e meu padrasto Sebastião pela dedicação, apoio e por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

Sem o apoio da minha família esse momento não seria completo.

A minha querida avó Irene (in memorian) que durante minha infância esteve presente sempre com seu carinho, amor e pureza, pois sei que mesmo em outro plano espiritual ela olha por mim está feliz vendo mais uma vitoria conquistada na minha vida. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

À CNPq pela bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza pela orientação e conselhos durante todo o período do mestrado, agradeço também a amizade e confiança em mim depositada.

À Profª Drª Helena Redigolo Pezza pela coorientação, pelos conselhos e toda colaboração que me foi concedida.

Aos membros da banca examinadora pela atenção e importante colaboração que só fazem enriquecer ainda mais o trabalho desenvolvido.

Aos amigos do Grupo Fritz Feigl: Lucas, Aline, Karine, Ângela, Vitor Hugo, Tiago, Maisa, João, Dayana e Natalia obrigada colaboração de todos, pelo companheirismo, amizade e apoio. Amigos são essencial para o nosso crescimento pessoal e profissional, espero que nossa amizade perdure por um longo tempo.

.

Um abraço especial para Natalia e Marina Paganini que sempre me ajudaram e me fizeram dar boas risadas. A todos os meus amigos 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.

"Viver com propósitos é a única maneira de se viver de verdade. Todo o resto é apenas existir."

Rick Warren

"Tenho em mim todos os sonhos do mundo."

Fernando Pessoa

RESUMO

Os princípios da Química Verde têm norteado o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos que visam reduzir a utilização de substâncias tóxicas e a produção de resíduos que necessitam de tratamento de custo elevado e profissional treinado[13]. Com base nesses princípios, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia ambientalmente mais amigável que possa ser aplicada à análise de ureia em leite e cosméticos.·.

A ureia é usada em inúmeros setores industriais para vários usos funcionais como adesivos, pastas, vedadores, resinas, colas, enchimentos, catalisadores, umectantes e agentes desidratantes. Também é usada em suplementos alimentares de animais, fertilizantes e reagentes analíticos. Em produtos de consumo a ureia é encontrada em extensa variedade de amostras comerciais, tais como cosméticos, cremes hidratantes, xampus, condicionadores de cabelo, tinturas de cabelo e removedores de tintura, sabonetes líquidos, detergentes e outros produtos de limpeza, além de ser extensivamente usada em tratamentos para pele ressecada.

Em produtos alimentícios como o leite bovino a ureia está presente na concentração media de 160 $mg.L^{-1}$, porem a adição fraudulenta de ureia no leite para aumento de lucros altera a qualidade do leite em todos os componentes, principalmente os teores de proteína. Esta adulteração influencia diretamente o pagamento do leite por sua qualidade.

A metodologia desenvolvida envolve a combinação *spot test* - espectroscopia de reflectância difusa utilizando dois reagentes cromogênicos diferentes (p-DAB e p-DAC) que reagem com a ureia resultando em um produto colorido. Posteriormente a metodologia foi aplicada para determinação de ureia em formulações dermatologias e leite bovino demonstrando ótimos resultados de precisão e exatidão, evidenciados pela boa recuperação, além de oferecer vantagens como simplicidade de execução e baixo consumo de reagentes, geração de mínima quantidade de resíduos, rapidez e segurança, portabilidade e gerando resultados confiáveis.

Palavras-chave: reflectância difusa; spot test; ureia; leite; cosméticos.

ABSTRACT

Green Chemistry principles have guided the development of new analytical procedures aimed at reducing the use of toxic substances and waste production that do not require costly treatment and trained professional[13]. Based on these principles, this paper proposes the development of a more environmentally friendly method that can be applied to the analysis of urea in milk and cosmetics.

Urea is used in numerous industrial sectors for various functional uses as adhesives, binders, sealants, resins, fillers, catalysts, humectants and dehydrating agents. It is also used in supplements for animals, fertilizers and analytical reagents. In consumable products, urea is found in a wide variety of commercial samples such as cosmetics, moisturizers, shampoos, hair conditioners, hair dyes and dye removers, liquid soaps, detergents and other cleaning products, besides being extensively used in treatments for dry skin.

In food products, such as cow milk, urea is present in the medium concentration of 160 $mg.L^{-1}$, but the fraudulent addition of urea in milk to increase profits alters the quality of the milk on all components, especially the milk protein. This tampering directly influences milk payment for their quality.

The clean method developed involves combining spot test - diffuse reflectance spectroscopy using two different chromogenic reagents (p-DAB and p-DAC), and was applied for determination of urea in dermatologic formulations and bovine milk, demonstrating great precision and accuracy results, evidenced by good recovery, plus offering advantages such as simplicity of implementation and low reagent consumption, generating minimal amount of waste, speed and security, portability and generating reliable results.

Keywords: diffuse reflectance; spot test, urea, milk, cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da ureia 18
Figura 2: Procedimento e suporte para a realização da reação de spot test[15]. 37
Figura 3-Exemplo de spot test realizado em papel de filtro, onde ocorre reação analito/reagente cromogênico e mudança de cor, mensurável através de um acessório de reflectância acoplado ao espectrofotômetro. 38
Figura 4- Esquematização dos equipamentos utilizados para as metodologias de reflectância difusa 38
Figura 5- Espectrômetro portátil, esfera de reflectância e fibra óptica utilizada. ... 39
Figura 6: Esquematização da reação entre a ureia e o p-DAC 41
Figura 7. Espectro de A_R da reação de spot test no papel de filtro entre ureia e p-DAC em meio ácido. O valor máximo de A_R foi em 530 nm. [ureia] = 200 mg. L^{-1}.42
Figura 8: Esquematização da reação a reação entre a ureia e o p-DAB 42
Figura 9. Espectro de A_R da reação de spot test no papel de filtro entre ureia e p-DAB em meio ácido. O valor máximo de A_R foi em 440 nm. [ureia] = 500 mg. L^{-1}.43
Figura 10-Curva Analítica - Solvente: etanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAC 44
Figura 11- Curva Analítica - Solvente: metanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAC 45
Figura 12-Curva analítica - Solvente: etanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAB 46
Figura 13-Curva analítica - Solvente: metanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAB 46
Figura 14- Estabilidade óptica do produto da reação p-DAB/ureia..... 49
Figura 15-Estabilidade óptica do produto da reação p-DAC/ureia 50
Figura 16- Gráfico de pareto p-DAB 51
Figura 17-Gráfico dos efeitos principais p-DAB..... 52
Figura 18 - Superfície de resposta obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e concentração de p-DAB (8,3985% (m/v)). 54

Figura 19 -Curva de nível obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e p-DAB. [ureia] =200 mg.L^- 55
Figura 20-Gráfico de pareto p-DAC..... 56
Figura 21-Gráfico dos efeitos principais -p-DAC 57
Figura 22-Superfície de resposta obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e concentração de p-DAC (3,2581% (m/v))..... 59
Figura 23- Curva de nível obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e p-DAC. [ureia] =200 mg.L^{-1} 60
Figura 24-Gráfico da reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAB. Aplicação de regressão linear aos dados da Tabela 13. Concentração de ureia: 25 – 750 mg.L^{-1}. 62
Figura 25- Gráfico da reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAC. 63
Figura 26-Esquematização do método oficial (Método de Kjedahl) para cremes hidratante[26]..... 72
Figura 27- Esquematização do processo de clean up e leitura de amostras 75
Figura 28- Representação da conversão da matéria orgânica nitrogenada em sulfato de amônio, da reação que ocorre de liberação de amônio em meio alcalino e do recebimento do amônio destilado em ácido bórico no método de Kjeldahl[3,64] 86
Figura 29- Spot tests com leite fortificado (1.000 mg.L^{-1} ureia)..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Métodos utilizados para a determinação de ureia. 21
Tabela 2- Participação percentual dos principais compostos de NNP do leite[53]. .. 26
Tabela 3- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **etanol**/ p-DAC* 44
Tabela 4- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **metanol**/ p-DAC* . 44
Tabela 5- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **etanol**/ p-DAB*..... 45
Tabela 6- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **metanol**/ p-DAB*.. 46
Tabela 7 -Solvente: metanol - p-DAB e p-DAC (0,4% (m/v) 0,12 mol/L de HCl- p-DAB:Leitura em 440 nm / p-DAC:Leitura em 530 nm 48
Tabela 8- Solvente: metanol - p-DAB e p-DAC (0,4% (m/v) 0,12 mol/L de HCl- p-DAB:Leitura em 440 nm / p-DAC:Leitura em 530 nm 48
Tabela 9-Dados de absorbância x conc. de ureia/ Planejamento Fatorial p-DAB. 51
Tabela 10-Matriz e resultados obtidos no planejamento composto central 53
Tabela 11-Dados de absorbância x conc. de ureia/ Planejamento Fatorial p-DAC56
Tabela 12-Matriz e resultados obtidos no planejamento composto central- p-DAC 58
Tabela 13-Dados de reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAB. (Leitura em 440nm)..... 61
Tabela 14-Dados de reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAC. (Leitura em 530nm)..... 63
Tabela 15-: Verificação das repetibilidades intra e inter-dia –p-DAB 64
Tabela 16-Verificação das repetibilidades intra e inter-dia - p-DAC..... 64
Tabela 17**.** Reflectância média e desvio para os brancos 64
Tabela 18**.** Limites de Detecção e Quantificação para a ureia. 65
Tabela 19- Resumos das figuras de mérito para cada um dos reagentes cromogênicos estudados 66
Tabela 20-Valores de massa de creme para soluções preparadas. Solvente: metanol 67
Tabela 21-Determinação de ureia em cremes para a pele pelo método proposto utilizando p-DAB (n =3). 68

Tabela 22-Determinação de ureia em cremes para a pele pelo método proposto utilizando p-DAC (n =3). 69
Tabela 23. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB..... 70
Tabela 24. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC. 70
Tabela 25 Valores de massa e volume das soluções preparadas para o método de Kjeldahl 71
Tabela 26. Quantificação de ureia pelo método oficial Kjeldahl 73
Tabela 27. Comparativo - Método oficial x Métodos Propostos (p-DAB e p-DAC) 73
Tabela 28 - Comparativo Método Oficial e Método proposto (p-DAB) 74
Tabela 29 - Comparativo Método Oficial e Método proposto (p-DAC) 74
Tabela 30. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando QUECHERS 76
Tabela 31. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando QUECHERS 76
Tabela 32. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB – Método de QUECHERS variando volume da amostra 77
Tabela 33. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC -– Método de QUECHERS variando volume da amostra ... 78
Tabela 34. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB variando a concentração de NaCl..... 79
Tabela 35. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC variando a concentração de NaCl 79
Tabela 36. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando TCA 80
Tabela 37. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando TCA 81
Tabela 38. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol..... 82

Tabela 39. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol 82
Tabela 40. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol 82
Tabela 41. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol 83
Tabela 42. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol 83
Tabela 43. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol 83
Tabela 44. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol 84
Tabela 45. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol 84
Tabela 46- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite desnatado através do método oficial 87
Tabela 47- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite integral através do método oficial 87
Tabela 48- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite semi desnatado através do método oficial 88
Tabela 49- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite em pó através do método oficial 88
Tabela 50- Comparativo entre Método proposto (p-DAB) e método oficial 89
Tabela 51- Comparativo entre Método proposto (p-DAC) e método oficial 89

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

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 (%(m/v))
[HCl]	Concentração de ácido clorídrico ($mol.L^{-1}$)
[p-DAB]	Concentração de p-dimetilaminobenzaldeído (%(m/v))
NNP	Nitrogênio não proteico
C	Concentração
R	Coeficiente de correlação
CV	Coeficiente de variação
$\lambda_{máx}$	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)
RSD	Desvio padrão relativo
A	absorbância
ε	absortividade molar da substância
b	caminho óptico (cm)
QUECHERS	quick, easy, cheap, effetive, rugged and save
TCA	Ácido Tricloroacético
DTAB	Brometo de dodecil-trimetilamônio
SDS	Dodecil-sulfato de sódio

Sumário

Capítulo 1 . Introdução **17**
1.1. Ureia aspectos químicos **18**
1.2. Ureia aspectos gerais e importância **19**
1.3. Métodos para Determinação de Ureia **20**
1.4. Ureia em Cosméticos **22**
1.5. Agronegócio Brasileiro - Leite bovino **24**
1.6. Fração nitrogenada do leite bovino **24**
1.7. Leite adulterado no Rio Grande de Sul **27**
1.8. Aspectos da espectrometria no UV/VIS: Lei de Beer e espectroscopia de reflectância difusa[60,61]. **28**
1.9. Spot test [60,61] **30**
1.10. Química Verde: Conceitos básicos[13,14,66] **30**
Capítulo 2. Justificativa e Objetivos **32**
Capítulo 3. Parte Experimental **34**
3.1. Equipamentos, Reagentes e Preparo de Soluções. **35**
3.1.1. Equipamentos 35
3.1.2. Reagentes 35
3.1.3. Preparo de soluções utilizadas no presente estudo 36
3. 2. Spot Test combinado com reflectância difusa **37**
Capítulo 4. Metodologia, Resultados e Discussão **40**
4.1 Testes Qualitativos Preliminares **41**
4.1.2. Utilização do p-DAC como reagente cromogênico 41
4.1.3. Utilização do p-DAB como reagente cromogênico 42
4.1.4. Escolha do solvente 43
4.2. Meio micelar **47**
4.3. Estabilidade Óptica **49**
4.4. Triagem das Variáveis e Planejamento Fatorial[67,68] **50**
4.4.1. Resultados do Planejamento Fatorial para o reagente cromogênico p-DAB 51
4.4.2. Planejamento Composto Central (SUPERFICIE DE RESPOSTA) 53
p- DAB[67,68] 53
4.4.3 Resultados do Planejamento Fatorial para o reagente cromogênico p-DAC 56

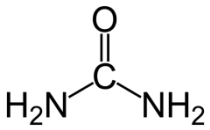
4.4.4. Planejamento Composto Central (SUPERFICIE DE RESPOSTA) p-DAC 58
4.5. Testes de Linearidade, Repetibilidade e Curva Analítica **60**
4.5.1 Curva analítica concentrações otimizadas p-DAB 61
4.5.2. Curva analítica concentrações otimizadas p-DAC 62
4.6. Limites de Detecção e Quantificação **64**
4.7. Aplicação do Método Proposto para Amostras de Cosméticos e Cremes para pele contendo ureia 67
4.7.1. Adição de Padrão e Recuperação em amostras de creme comerciais 70
4.7.2. Validação do método proposto para cremes hidratantes através de comparação com o método oficial (Kjeldahl) 70
4.8. Aplicação do Método Proposto em amostras de leite bovino 75
4.8.1. Método de QUECHERS[3] 75
4.8.2. Método de QUECHERS[3] variando volume da amostra 77
4.8.3. Método de QUECHERS variando volume da amostra concentração dos sais ($MgSO_4$ e NaCl) 78
4.8.4. Método utilizando TCA[2] 80
4.8.5. Método de *clean up* utilizando metanol e sais 81
4.8.6. Validação do método proposto para amostras de leite bovino através de comparação com o método oficial (Kjeldahl)[3] 84
4.8.7. Considerações finais das metodologias para cada matriz 90
4.8.8. Testes rápidos em amostra de leite bovino fortificado (Fraude Rio Grande do Sul) 92
Capítulo 5. Conclusões 93
Referências Bibliográficas 95

Capítulo 1 . Introdução

1.1. Ureia aspectos químicos

A ureia é um composto orgânico cuja molécula é formada por duas aminas (-NH_2) 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 132,7ºC e é solúvel em água, etanol, metanol 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 urina[1]. Em 1828 a ureia foi o primeiro composto orgânico a ser sintetizado artificialmente a partir de um sal inorgânico pelo químico alemão Friedrich Wöhler que tentava sintetizar uma substância inorgânica, o cianato de amônio, a partir de duas outras substâncias inorgânicas: o cianato de potássio e o sulfato de amônio. Para isso, aqueceu os dois sais juntos, esperando encontrar o cianato de amônio. No entanto, ocorreu a formação de cristais brancos cuja análise revelou ser ureia, substância presente na urina dos mamíferos. Acidentalmente, Wöhler sintetizou uma substância orgânica a partir de substâncias inorgânicas. Com isso, os químicos passaram a analisar as substâncias orgânicas e a fazer uso da teoria atômica para atribuir-lhes fórmulas, com procedimentos semelhantes aos utilizados para os compostos inorgânicos[1].

1.2. Ureia aspectos gerais e importância

A ureia (H_2NCONH_2, Figura 1) é um produto químico composto de nitrogênio que é produzido em escala de milhões de toneladas por ano no mundo, sendo empregada em inúmeros setores industriais para vários usos funcionais como adesivos, pastas e cremes hidratantes. A ureia também é usada em suplementos alimentares de animais e em fertilizantes. Em produtos de consumo a ureia é encontrada em extensa variedade de amostras comerciais, tais como desodorantes, cremes hidratantes, xampus, condicionadores de cabelo, tinturas de cabelo, removedores de tintura, sabonetes líquidos, detergentes e outros produtos de limpeza. A concentração máxima de ureia comumente encontrada nesses produtos, situa-se entre 1 – 10 % (m/v) [4].

A ureia possui grande importância na escala industrial como: fabricação de fertilizantes, herbicidas derivados da ureia (derivados de N-dimetil, N-dimetóxi-N-metílicos e fenilureia), na indústria de celulose para a fabricação de papel[3].

Em alimentos, sua detecção é importante como adulterante em amostras de leite e em bebidas alcoólicas resultante de fermentação microbiana onde é um dos subprodutos indesejáveis por ser considerada um precursor de etilcarbamatos. O etilcarbamato é conhecido por ser carcinogênico, teratogênico e mutagênico. Esta reação é promovida aquecendo-se sob circunstâncias ácidas, destilação e armazenamento por longo tempo[5].

As concentrações de ureia no leite são variáveis de rebanho para rebanho e de animal para animal dentro de um mesmo rebanho. A concentração média considerada normal para leite bovino, é de 160 $mg.L^{-1}$ e varia em uma faixa de 60 $mg.L^{-1}$ até 250 $mg.L^{-1}$. Esta variação encontrada mostra que existe uma variedade bastante grande entre os rebanhos no que se refere ao consumo de proteína, energia e água entre os animais[6]. A fraude por adição de ureia pecuária para aumento de lucros altera a qualidade do leite em todos os componentes, principalmente os teores de proteína. Esta adulteração influencia diretamente o pagamento do leite por sua qualidade, pois o volume de leite é aumentado através da adição de água e posterior adição de ureia pecuária para mascarar a diluição.

A ureia é o principal produto metabólico nitrogenado do catabolismo proteico nos seres humanos, responsável por mais de 75% do nitrogênio não-protéico excretado. A determinação de ureia em fluidos biológicos é um importante

parâmetro para diagnósticos clínicos do funcionamento renal, além de ser um dos indicativos da condição nutricional dos animais. Uma ampla variedade de doenças renais, com diferentes permutações de lesão glomerular, tubular ou vascular, pode causar um aumento na concentração de ureia no plasma [7, 8].

1.3. Métodos para Determinação de Ureia

Na literatura encontram-se muitos métodos para a determinação de ureia, com maior destaque para as técnicas cromatográficas as quais na sua grande maioria são onerosas, envolvem procedimentos laboriosos e/ou consomem muito tempo de execução. Além disso, muito dos procedimentos cromatográficos requerem uso de grandes quantidades de solventes, contrariando os preceitos da Química Verde[13]. 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 aplicações[11,12].

Através de um levantamento bibliográfico realizado nas principais bases de dados foram encontrados 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.

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 $mg.L^{-1}$ 0,5 – 15,0 $mg.L^{-1}$ até 25 $mg.L^{-1}$	$0,34\times10^{-3}$ $mg.L^{-1}$ 0,1 $mg.L^{-1}$ –	Cosméticos e formulações dermatológicas Destilados de Cana de Açúcar Fertilizantes	4 20
Espectrofotométrico seguido por CCD	–	–	Plasma	21
Espectrofotométrico baseado em microplacas ou metodologias de FIA	2 – 54 $mg.L^{-1}$ –	– 0,02 $mg.L^{-1}$	Extratos de solo	22
Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica	120 -720 $mg.L^{-1}$	–	Plasma sanguíneo de animal - Vegetais como fonte de urease	8
FIA / Coluna de urease	0,96 – 60 $mg.L^{-1}$	–	Bebidas alcoólicas (Vinhos)	23
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	6×10-3 $mg.L^{-1}$ 60 – 140 $mg.L^{-1}$	0,003 $mg.L^{-1}$ 7,5 $mg.L^{-1}$	Urina animal e humana, Vinho Cosméticos	10 25,26
Técnicas Cromatográficas	0,1 – 100 $mg.L^{-1}$	7×10^{-5} – 13×10^{-5} $mg.L^{-1}$	Solos	11
Ultramicroensaio fluorimétrico	–	$7,2\times10^{-7}$ mg	Fluido tubular do rim	24
Cromatografia Líquida	50 – 400 $mg.L^{-1}$	–	Fertilizantes	27
Cromatografia Iônica com detecção condutométrica	–	–	Fertilizantes	28
Sistema de Sensores de dois eletrodos combinado com célula de dois compartimentos	–	–	Urina	29
Ensaios baseados em Luminescência	–	–	Plasma humano	30
FIA com Detecção Potenciométrica	0,036 – 9,0 $mg.L^{-1}$	–	Leite	31
Colorimétrico e Enzimático	0 - 20×10-3 $mg.L^{-1}$	–	Leite	33
Método de Kjeldahl	–	–	Leite, Cosméticos e Fertilizantes	34

Alguns desses métodos, apesar de apresentarem bons limites de detecção 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[13, 14].

No melhor do nosso conhecimento, nenhum método analítico envolvendo a combinação spot test-reflectância difusa[15] para a determinação de ureia é descrito na literatura científica indexada. Nos últimos anos a combinação spot test espectroscopia de reflectância difusa vem ganhando destaque na literatura devido à rapidez e simplicidade das análises, grande redução no consumo de reagentes (utiliza-se, em média, 10-20 µL de cada solução de reagente cromogênico), boa sensibilidade, possibilidade de medidas "*in situ*", baixíssima geração de resíduos ao meio ambiente e baixo custo relativo dos equipamentos (mini-espectrofotômetros portáteis com acessórios para reflectância difusa, de baixo custo e de excelente performance estão atualmente disponíveis no mercado). O nosso grupo de pesquisa tem sido um dos pioneiros no desenvolvimento e na aplicação desta técnica para a determinação de diversos analitos em diferentes tipos de matrizes [15,17].

1.4. Ureia em Cosméticos

A ureia tem uma importância crescente em terapias dermatológicas, doenças tais como a dermatite atópica ou pele ressecada são marcadas por uma deficiência de ureia. As peles normais contêm aproximadamente um por cento de ureia. Além disso, a ureia tem propriedades queratolíticas e pode ser incorporada como um ingrediente ativo em cremes devido a suas propriedades umectantes[35].

A ureia é, com certeza, um dos hidratantes mais utilizados em cosméticos, tanto pela sua eficácia, quanto pelo seu baixo preço. O que muita gente não sabe, no entanto, é que a ureia é proibida para mulheres grávidas. O principal motivo desta proibição é que a ureia penetra profundamente na pele e tem até mesmo a capacidade de atravessar a placenta, podendo chegar até o feto em formação, causando intoxicação ao feto. A fim de controlar o uso de ureia nos cosméticos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina que todas as vezes que um produto tiver na sua composição a ureia em dosagens maiores que 3%, o mesmo deve conter no rótulo o seguinte alerta: "Não Utilizar Durante a Gravidez"[35]. A ANVISA ainda resolveu proibir a fabricação de cosméticos que contenham em sua composição mais de 10% de ureia. Considerando que a Resolução 79/00 define produtos cosméticos como "preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele,

sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado[38]. As substâncias naturais ou sintéticas adicionadas como ingredientes ativos em produtos cosméticos devem ser avaliadas em termos de riscos e não de dano, com aplicação exclusivamente cosmética e não terapêutica[36,37,38,39] visto que quando a ureia é adiciona em cremes hidratantes ela provoca um aumento da penetração cutânea de outras substâncias ativas[37]. A segurança do cosmético deve ser avaliada pelas condições de uso e área de contato, pois a absorção da ureia na pele humana normal e danificada é de 9,5 ± 2,3% e 67,9 ± 5,6% (m/v), respectivamente[37, 36].

A Câmara Técnica de Cosméticos recomenda e a Gerência-Geral de Cosméticos estabelece a concentração máxima de 3% de ureia para produtos com finalidade especificamente cosmética com Grau 1. Para concentrações acima de 3% e máxima de 10% de ureia, a gerencia geral classifica os produtos cosméticos como Grau 2, sendo portanto recomendado pela Autoridade Sanitária, para fins de registro, a realização de testes de segurança (irritabilidade primária, acumulada e sensibilização)[36,37,38]. Quando, na formulação, a ureia estiver associada com outros ativos deve ser avaliada a necessidade da realização de ensaios de absorção cutânea, na rotulagem dos produtos cosméticos com Grau 2, que contenham ureia nas concentrações acima de 3% e máxima de 10%, deverá constar obrigatoriamente: “Manter fora do alcance de crianças”, “Não usar se a pele estiver irritada ou lesionada” e “Não utilizar durante a gravidez”[35].

A ureia quando presente nas formulações de cremes para a pele age como um desnaturalizante proteico que provoca a hidratação da queratina e uma leve queratólise na pele seca e hiperqueratósica. Há décadas, a ureia vem sendo utilizada para o tratamento cosmético da pele seca. Contudo, possui importantes indicações clínicas devido às suas propriedades farmacológicas, como ação antimicrobiana e anti-inflamatória. Do ponto de vista da hidratação propriamente dita, as características particulares da ureia lhe conferem a capacidade de gerar um tipo de hidratação denominada ativa, mantendo a pele hidratada por um período mais prolongado[35,41]. Cremes hidratantes que contem ureia na sua formulação são indicados no tratamento de psoríases, ictioses, dermatites atópicas e outras

condições de pele seca, escamosa. A ureia também tem sido empregada no tratamento de feridas e úlceras[41].

1.5. Agronegócio Brasileiro - Leite bovino

O leite bovino é um fluido biológico complexo, composto essencialmente por água, gordura, proteínas, lactose e sais minerais, além destes, existem ainda, em quantidades mínimas, lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos e gases dissolvidos[42]. A produção de leite e de produtos lácteos constitui uma das atividades agrícolas mais importantes mundialmente, tendo-se observado, nos últimos anos, uma tendência para a estabilização do consumo destes produtos, verificando-se, no entanto, uma tendência de decréscimo para o leite líquido e um ligeiro crescimento para o queijo e iogurtes[43].

Entre os produtos agropecuários, o leite sempre assumiu grande importância econômica e social no Brasil e no mundo, desempenhando papel importante no suprimento de alimentos à população e na geração de emprego e de renda[44].

Para que o Brasil se consolide como exportador de produtos lácteos, torna-se necessária a melhoria da qualidade do leite *in natura*, adequando-se aos padrões de qualidade exigidos pela Instrução Normativa N°51 e pelos mercados internacionais[45]. Além disto, a execução de medidas e programas de conscientização, envolvimento, credenciamento e fiscalização de produtores e estabelecimentos industriais desencadeadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)[47], além das iniciativas das demais instituições públicas e privadas da cadeia produtiva do leite e derivados são importantes para o agronegócio do leite[46]. Além disto, o agronegócio do leite é de grande importância na geração de empregos e na fixação do homem no campo.

Ampliar a participação da agropecuária no comércio é, portanto, primordial para o crescimento do setor agrícola e do próprio crescimento econômico geral da nação[47].

1.6. Fração nitrogenada do leite bovino

Segundo Wattiaux[48] (2006), as proteínas do leite têm sua origem metabólica no nitrogênio ingerido pela vaca, principalmente na forma de aminoácidos, nitrogênio não protéico (NNP) e proteínas. No rúmen, o NNP ingerido sofre ação microbiana e

é transformado em amônia, que, por sua vez é em sua maior parte transformada em proteína microbiana em um processo que envolve consumo de energia resultante do metabolismo dos carboidratos. As proteínas de origem alimentar, uma vez no rúmen, podem seguir duas vias metabólicas: serem convertidas em aminoácidos e amônia e posteriormente em proteína microbiana ou não sofrerem nenhuma alteração. As proteínas de origem microbiana e proteínas que atravessaram o rúmen inalteradas são submetidas à ação enzimática, convertendo-se em aminoácidos. Nesta forma mais simples são passíveis de transferência à corrente sanguínea através da parede intestinal. Entretanto, uma parte das proteínas (20%) é eliminada junto às fezes. Uma vez na corrente sanguínea, os aminoácidos sofrem passagem pelo fígado, a partir de onde são conduzidos à corrente sanguínea para posteriormente serem convertidos em tecido muscular, proteínas do leite ou se necessário, energia. A parte da amônia que no rúmen não participou da síntese de proteínas microbianas é conduzida pela corrente sanguínea ao fígado, onde, junto com a amônia oriunda do metabolismo hepático de aminoácidos, sofre conversão a ureia[49]. Este composto pode ser conduzido pela corrente sanguínea à glândula salivar, ao rúmen, à glândula mamária e ao rim. Na glândula mamária a ureia é excretada e veiculada pelo leite e no rim, pela urina. A ureia que é direcionada à glândula salivar e ao rúmen é reconduzida à síntese de proteína microbiana, sendo previamente transformada em amônia. O fornecimento de dietas ricas em proteína bruta às vacas leva a uma diminuição da reciclagem da ureia, com consequente aumento de sua excreção pelo rim veiculada pela urina. No entanto, quando as dietas fornecidas são pobres em proteína bruta, a ureia é mais intensamente reciclada, diminuindo sua excreção pelo rim. Como os ruminantes, por meio do intenso metabolismo microbiano ruminal, são hábeis em converter NNP em proteína, estes compostos podem ser empregados na dieta, sobretudo aquelas pobres em proteína bruta, e o mais comumente empregado é a ureia. No entanto, seu emprego deve ser realizado de forma controlada, uma vez que o uso em larga escala conduz à formação excessiva e tóxica de amônia. Para minimizar este efeito, incrementa- se o nível energético das rações, para ocorrer, ainda no rúmen, uma conversão efetiva da amônia em proteína microbiana.

A ureia adicionada ao leite cru proporciona um aumento significativo do teor em proteína bruta e lactose e redução do teor em gordura fornecendo um falso

positivo para o teste oficial de quantificação de proteína, que quantifica a quantidade de nitrogênio total da amostra. Esquemas de fraude de leite se lançam mão da adição da ureia ao leite para aumentar ganhos em sistemas de pagamento por qualidade ou atendimento a dispositivos normativos, tais como a Instrução Normativa n° 51/2002. Devem ser realizados experimentos adicionais de avaliação da ação da ureia ao leite em outros parâmetros analíticos da qualidade do leite, tais como acidez, depressão do ponto de congelamento, resistência ao álcool, etc., estabelecendo-se associações para a constatação em caso de hipótese de fraude. Entretanto, em sistemas de pagamento de qualidade, um grande número de amostras são analisadas em um curto período inviabilizando o emprego contínuo de testes morosos. Na Tabela 2 temos descritos dados da participação percentual dos principais compostos de nitrogênio não proteico no leite[51].

Tabela 2- Participação percentual dos principais compostos de NNP do leite[53].

Composto nitrogenado	Percentagem relativa em relação ao NNP do leite (%)(m/v)	Concentração no leite (%) segundo (m/v)
Ureia	48,0	14,2
Creatina	8,6	2,6
Creatinina	4,1	1,2
Acido Úrico	2,7	0,8
Acido Orótico	5,2	1,5
Acido Hipúrico	1,4	0,4
Peptídeos	11,0	3,2
Amônia	3,1	0,9
Aminoácidos	15,1	4,4
Desconhecidos		0,48

Fonte:DePeters et al. (1993)

A avaliação da concentração de ureia, NNP e proteína bruta em leite de vacas individualmente amostradas podem ser úteis para avaliar programas de alimentação de gado em fazendas.

O Brasil lidera o ranking de maior exportador de carne bovina do mundo[52] desde 2008 e as estatísticas mostram crescimento também para os próximos anos. A exportação de carne bovina crescerá a 2,15% ao ano, enquanto a carne de aves a 3,64%. A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial. Essas estimativas indicam

que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango. Cabe ao Ministério da Agricultura, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária, regulamentar e controlar mercadorias de origem animal a serem exportadas, atestando sua qualidade e segurança, por esse motivo faz-se necessária a avaliação dos níveis de ureia presentes no leite, pois através desses valores é possível avaliar os programas da alimentação do rebanho e consequente qualidade da carne. Além disso, o ministério, com as secretarias de agricultura Estaduais, promove ampla fiscalização, visando à conformidade entre a legislação de inspeção industrial e sanitária brasileira e as normas de sanidade exigidas pelo país importador [52,53,54].

1.7. Leite adulterado no Rio Grande de Sul

Em Abril de 2013 o Ministério Público Estadual (MPE) do Rio Grande do Sul realizou a Operação Leite Compensado, que flagrou atravessadores fraudando cargas de leite cru para obterem mais lucro através da diluição das cargas de leite com água e para mascarar a diluição era adicionado ureia pecuária.[55,56].

A fórmula utilizada para a adulteração era comercializada por R$ 10 mil que tinha como o principio a diluição do leite com água. A cada 9 litros de leite era adicionado de 1 litro de água e posterior adição de ureia pecuária para fornecer um falso positivo de quantificação de proteínas mascarando a diluição do leite. O MPE informou acreditar que as empresas operavam independentemente[59].

A ureia pecuária contem formol, produto cancerígeno, que o MPE informou estimar ter contaminado 100 milhões de litros de leite em um ano[59]. A ureia é quantificada nos exames de controle de qualidade usados pela indústria de laticínios[58] .

A detecção e quantificação de ureia no leite através do método oficial é um método moroso que necessita de treinamento e oferece riscos ao operador, pois utilizam ácidos concentrados e altas temperaturas, os resultados da quantificação só analisados para avaliação da dieta do gado e possíveis fraudes no leite.

1.8. Aspectos da espectrometria no UV/VIS: Lei de Beer e espectroscopia de reflectância difusa[60,61].

Quando um feixe paralelo de radiação monocromática com determinada potência (P_0) incide perpendicularmente em um bloco de material absorvente com uma solução, apenas uma parte deste feixe, denominado de feixe emergente, sai pelo do outro lado do bloco, com outra potência (P). Em outras palavras, após atravessar uma espessura b do material contendo n espécies absorventes, sua potência decresce como resultado da absorção.

Este decréscimo está relacionado principalmente com perdas por reflexões na interface do bloco e por espalhamento na própria solução.

O tratamento matemático desta potência ao se levar em consideração todos os fatores externos e internos nos leva à Lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon.b.c \qquad \text{(Equação 1)}$$

A = absorbância

ε = absortividade molar da substância

b = caminho óptico (cm)

c = concentração

Porém, alguns desvios podem ser encontrados entre a medida de absorbância e a concentração. Estes desvios são caracterizados por limites da própria lei ou pelo modo como são realizadas as medidas de absorbância (desvios instrumentais) ou por mudanças químicas associadas às variações de concentração (desvios químicos).

Geralmente, a Lei de Lambert-Beer é ótima para descrever o comportamento da absorção de meios com baixas concentrações do analito, porém, quando a concentração aumenta a distância das moléculas diminui e cada uma delas afeta a distribuição de carga em sua vizinhança, alterando a capacidade das moléculas absorverem um determinado comprimento de onda da radiação. Tais desvios podem aparecer também devido à absortividade molar depender do índice de refração do meio.

Diferentemente da espectroscopia de absorção, a espectroscopia de reflectância tem sido pouco estudada por ser considerada inviável para análises quantitativas já que, a partir de spot tests convencionais, a precisão não era tão boa[61]. Tal fato foi reconsiderado após haver o desenvolvimento de instrumentos analíticos (fibras ópticas e esferas de reflectância melhores), sendo possível então a análise quantitativa por reflectância acopladas a spot tests, apresentando resultados muito melhores[62].

A espectroscopia de reflectância é um processo relativamente complexo que ocorre quando um feixe de radiação atinge a superfície de uma amostra. Caso a amostra seja sólida, ocorrerá reflexão especular em cada superfície plana, porém, como há muitas destas superfícies orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções. Geralmente a intensidade da radiação refletida é independente do ângulo de observação.

Diferentemente da reflexão especular, a reflexão difusa ocorre em superfícies foscas ou opacas devido à reflexões múltiplas a partir das superfícies das partículas que constituem o meio. Este tipo de reflexão compreende um processo que acontece devido à penetração da radiação em um substrato sólido (como um pó finamente dividido), sendo que parte desta radiação retorna para a superfície do substrato, ocorrendo também dispersão múltipla e absorção parcial da radiação pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido[15,62,63,65]. Como há muitas superfícies orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções, sendo a intensidade independente do ângulo de observação[61].

Vários modelos foram desenvolvidos de modo a descrever a intensidade da radiação refletida difusamente de um modo quantitativo. Dentre estes, está o modelo de Kubelka e Munk[61], relacionando a concentração da amostra com a reflectância através da relação entre o coeficiente de absorção molar do analito (k), coeficiente de dispersão ou de espalhamento (s) e poder de reflectância em um meio semi-infinito (infinitamente fino):

$$f(R_{\infty}^{'}) = \frac{(1-R_{\infty}^{'})^2}{2R_{\infty}^{'}} = \frac{k}{s} \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde R'_{∞} é a razão entre a intensidade refletida pela amostra e a de um padrão não absorvente, como o cloreto de potássio finamente moído.

Para uma amostra diluída, k está relacionado à absortividade molar ε e à concentração de analito c pela equação:

$$k = 2{,}303\ \varepsilon c \qquad \text{(Equação 3)}$$

A aplicação da Equação 2 fornece uma relação linear entre a concentração da amostra e a função $f(R'_{\infty})$ para concentrações médias e altas, enquanto que para concentrações mais baixas pode haver um desvio da linearidade[63].

1.9. Spot test [60,61]

O spot test é um procedimento químico utilizado para identificação ou quantificação de diversos tipos de substâncias através da reação entre o analito e um reagente químico de identificação em um suporte sólido (papel de filtro, placa de toque, entre outros). Esta reação deve ser mensurável por algum método, ou seja, deve haver ou mudança de cor, ou evolução de gás, ou precipitação, etc.

1.10. Química Verde: Conceitos básicos[13,14,66]

A química verde, também conhecida como química sustentável é uma filosofia cuja principal função é o encorajamento de produtos e processos que reduzam ou eliminem o uso de substância e métodos perigosos[13,66]. A química verde em si pode ser aplicada às diversas áreas da química: orgânica, inorgânica, bioquímica, analítica e físico-química, com ênfase em aplicações industriais e pesquisa.

É importante ressaltar que a química verde é diferentemente da química ambiental. Enquanto a química verde procura a redução e a prevenção da poluição, a ambiental é a química do meio-ambiente e dos poluentes químicos na natureza.

A Química Verde é regida por 12 Princípios que preconizam a redução dos resíduos na fonte[13,14] 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, consequentemente, 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[13].

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 Apesar de haver certas discordâncias uma vez que a química verde não considera, num primeiro momento, a parte econômica, o consentimento sobre a redução, prevenção e eliminação dos perigos através desta filosofia rebatem este problema. Infelizmente, muitas microempresas e indústrias não têm o capital suficiente para, no começo de seu desenvolvimento, aderir completamente ou até parcialmente a esta filosofia. Até grandes empresas têm certa relutância uma vez que o gasto, muitas vezes, é maior ao se adotar a filosofia verde.

Capítulo 2. Justificativa e Objetivos

Pela importância da detecção e quantificação da ureia em diversas matrizes tais como cosméticos e leite bovino, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias mais limpas e ambientalmente amigáveis para a determinação e quantificação desta substância em matrizes onde a mesma é encontrada. Diante das considerações apresentadas, os objetivos desse trabalho são:

- Desenvolver metodologia analíticas ambientalmente mais amigáveis, simples, rápidas, que possuam portabilidade, sensibilidade e de baixo custo relativo para a determinação de ureia em matrizes diversas utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa com detecção espectrofotométrica.

- Modificação do meio reacional visando um aumento da sensibilidade/seletividade dos métodos analíticos propostos.

- Otimização dos parâmetros experimentais dos novos métodos analíticos desenvolvidos via quimiometria, no sentido de se utilizar as mínimas quantidades possíveis de amostras, solventes e reagentes.

- Aplicação dos métodos analíticos desenvolvidos à análise de ureia em cosméticos (cremes hidratantes para a pele) e leite bovino.

- Validação da metodologia proposta.

Capítulo 3. Parte Experimental

3.1. Equipamentos, Reagentes e Preparo de Soluções.

3.1.1. 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 USB4000 com um software Spectra Suit. O mesmo foi calibrado com um *spot test* com ensaio em branco, ou seja, o *spot test* contendo o reagente, porém metanol 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 utilizando metanol como solvente. Nas medidas volumétricas foram empregadas buretas classe A, vidraria classe A e micropipetas E*ppendorf* (100 - 1000µL). 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 BRANSON. Para o tratamento dos dados obtidos foram utilizados microcomputadores com programas computacionais de cunho científico (Minitab 15 e Statistica 6.0).

3.1.2. 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 ($C_{11}H_{13}NO$) (*p*-DAC, 98%), (Acros®);

c) p-DAB (p-dimetilaminobenzaldeido)($C_9H_{11}NO$) (*p*-DAB, 98%), (Sigma-Aldrich®);

d) Ácido clorídrico 37% (m/m) ACS;

e) Papel de filtro qualitativo da marca WHATMAN 1;

f) Amostras comerciais de leite e cremes hidratantes;

g) metanol p.a., utilizado como solvente no preparo de todas as soluções.

3.1.3. Preparo de soluções utilizadas no presente estudo

3.1.3.1. Solução de ureia

Solução estoque de ureia 5000 ppm (mg.L^{-1})

Pesou-se 0,1250 g de ureia, solubilizou-se em metanol 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±0,03 mL, completando-se o volume com metanol. As demais soluções de ureia utilizadas neste trabalho foram preparadas através da devida diluição desta solução.

3.1.3.2. Soluções de reagentes cromogênicos:

3.1.3.2.1. p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) em HCl (p-DAC=0,200% (m/v) /HCl = 0,06 mol.L^{-1}): a solução foi preparada através da solubilização de 0,010 g de p-dimetilaminocinamaldeído em metanol e adição de 26µL de HCl 37% (m/m), d_{HCl}=1,19 g.ml^{-1}. Transferiu-se quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com o solvente (metanol/etanol).

3.1.3.2.2. p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) em HCl (p-DAC=3,2581% (m/v) /HCl = 0,2250 mol.L^{-1}): a solução foi preparada através da solubilização de 0,1629 g de p-dimetilaminocinamaldeído em metanol e adição de 97µL de HCl 37% (m/m), d_{HCl}=1,19 g.ml^{-1} . Transferiu-se quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com metanol.

3.1.3.2.3. p-DAB (p-dimetilaminobenzaldeido em HCl **(p-DAB=0,200% (m/v) /HCl = 0,06 mol.L^{-1}):** a solução foi preparada através da solubilização de 0,010 g de p-dimetilaminobenzaldeido em metanol e adição de 26 µL de HCL 37% (m/m), d_{HCl}=1,19 g.ml^{-1}. Transferiu-se quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com o solvente (metanol/etanol).

3.1.3.2.4. p-dimetilaminobenzaldeido p-DAB em HCl **(p-DAB=8,3985% (m/v) /HCl = 0,5014 mol.L^{-1}):** a solução foi preparada através da solubilização de 0,4199 g de p-dimetilaminobenzaldeido em metanol e adição de 215 µL de HCL 37% (m/m),

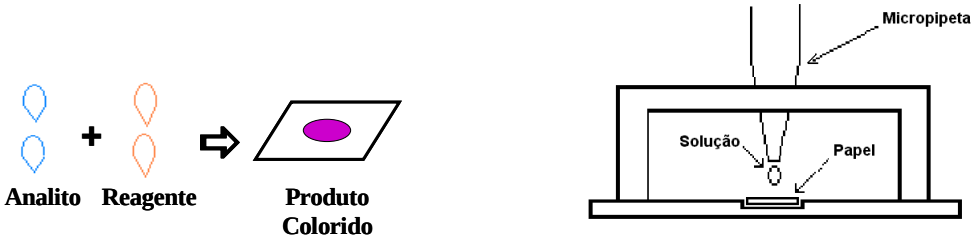
d_{HCl}=1,19 g.ml^{-1}. Transferiu-se quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com metanol.

3. 2. Spot Test combinado com reflectância difusa

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 literatura[15]. Em seguida, as soluções foram gotejadas no centro do papel de filtro qualitativo com o auxílio de uma micropipeta Eppendorf fixa no suporte.

Na Figura 2 encontram-se representados o procedimento para a realização do spot test e um exemplo de aplicação obtido experimentalmente Figura 3.

Figura 2: Procedimento e suporte para a realização da reação de spot test[15].



Após a aplicação de 20 µL do reagente cromogênico e 20 µL do analito no spot test obtem-se uma mancha colorida conforme ilustrado na Figura 3. Deve-se manter uma uniformidade na mancha para uma boa repetibilidade do método.

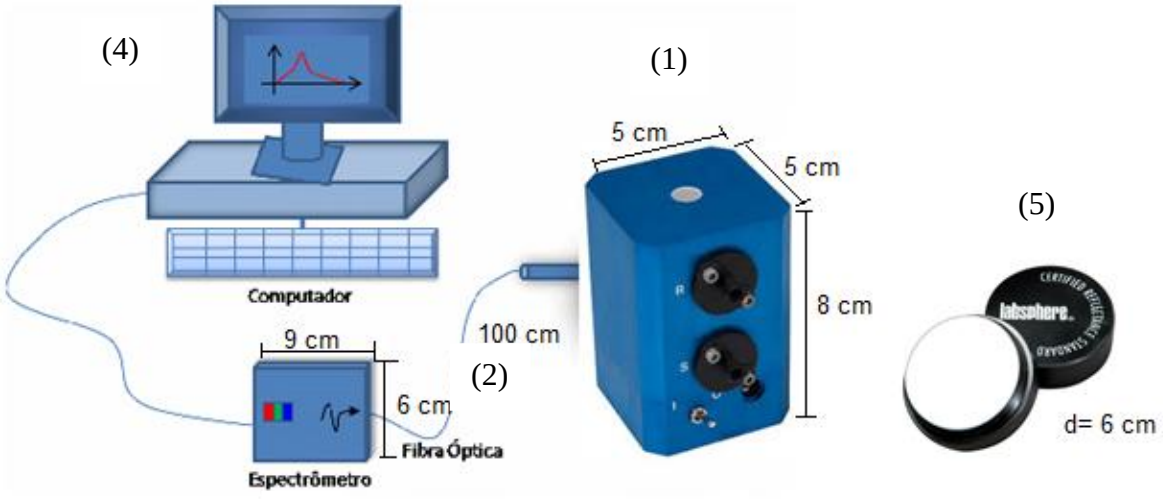
Figura 3-Exemplo de spot test realizado em papel de filtro, onde ocorre reação analito/reagente cromogênico e mudança de cor, mensurável através de um acessório de reflectância acoplado ao espectrofotômetro.



Dimensões do papel de *spot test*: 3 cm × 3 cm e contendo uma haste de aproximadamente 3 cm.

Através das manchas uniformes obtidas nos spot tests, as medidas de reflectância foram realizadas com o auxilio dos equipamentos ilustrados na Figura 4.

Figura 4- Esquematização dos equipamentos utilizados para as metodologias de reflectância difusa



No arranjo de medidas de reflectância difusa ilustrados na Figura 4 temos:

- ✓ (1) Uma esfera integradora de reflectância total (esfera integradora)
- ✓ (2) Uma fibra óptica que coleta a luz refletida da esfera
- ✓ (3) Um espectrômetro
- ✓ (4) Um computador
- ✓ (5) Um disco de *spetralon* usado como material de referência (branco)

Na Figura 5 temos ilustrado o espectrômetro portátil e fibra óptica utilizados durante as analises, que demonstram a portabilidade da instrumentação utilizada nas metodologias desenvolvidas.

Figura 5- Espectrômetro portátil, esfera de reflectância e fibra óptica utilizada.



Capítulo 4. Metodologia, Resultados e Discussão

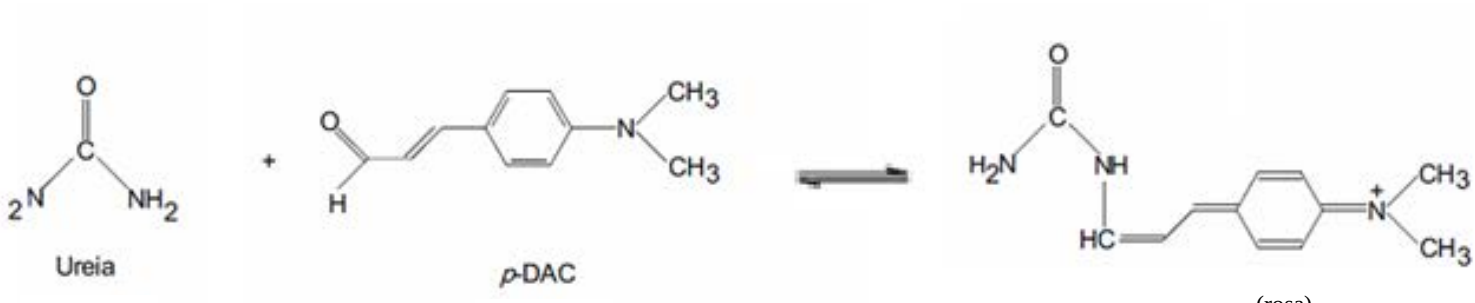
4.1 Testes Qualitativos Preliminares

Foram realizados testes qualitativos preliminares para determinar o comprimento de onda de máximo sinal para o produto colorido formado, além de testar a intensidade deste a partir das diferentes concentrações de ureia para obter uma ideia inicial da concentração de analito que pode ser detectada pelo método a ser desenvolvido neste trabalho. Paralelamente, também foi estudado o efeito do uso de surfactantes na reação devido, principalmente, à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais com consequente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica. As principais características do uso de tensoativos estão relacionadas à formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares.

4.1.2. Utilização do p-DAC como reagente cromogênico

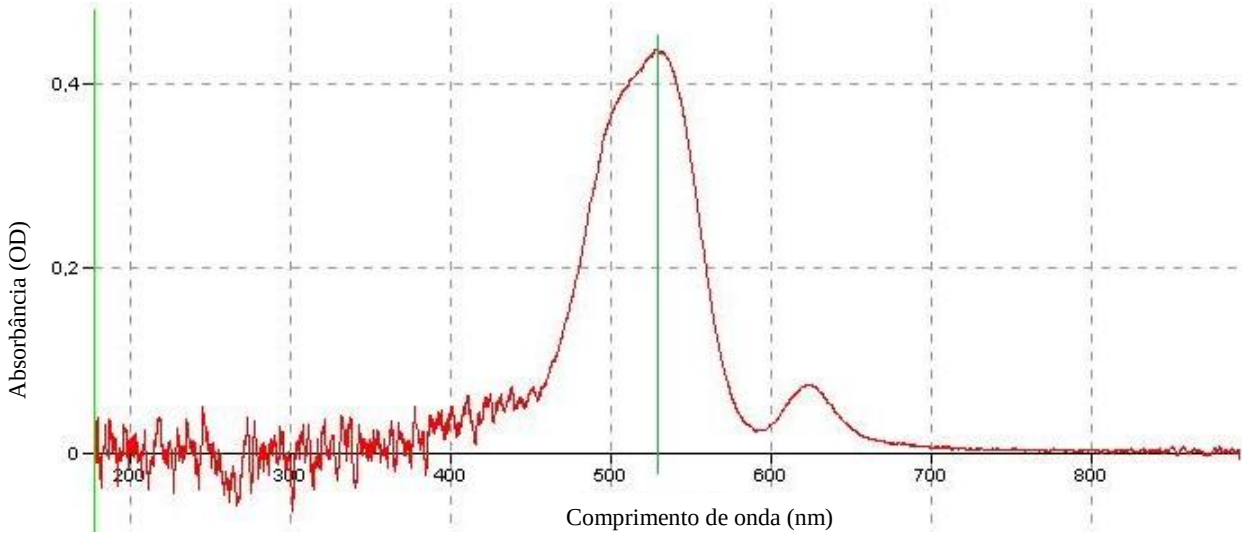
Observou-se a formação de um produto de coloração rósea estável na reação entre *p*-DAC e a ureia conforme equação da Figura 6. O *p*-DAC em meio ácido é bastante aplicado na determinação de aminas[16], a reação envolve a condensação do grupo amino protonado do analito com o grupo carbonila presente em sua estrutura formando um sal imínio[17,18].

Figura 6: Esquematização da reação entre a ureia e o p-*DAC*



O produto colorido formado na superfície do papel de filtro possui uma cor rosada intensa cujo espectro de A_R (Densidade óptica para medidas de reflectância) é mostrado na Figura 7.

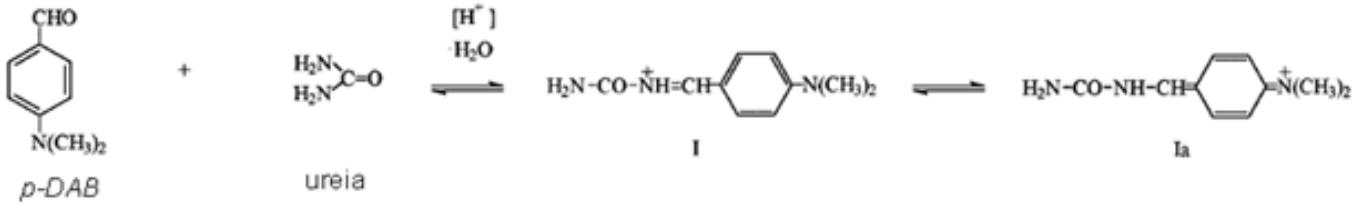
Figura 7. Espectro de A_R da reação de spot test no papel de filtro entre ureia e p-DAC em meio ácido. O valor máximo de A_R foi em 530 nm. [ureia] = 200 mg. L^{-1}.



4.1.3. Utilização do p-DAB como reagente cromogênico

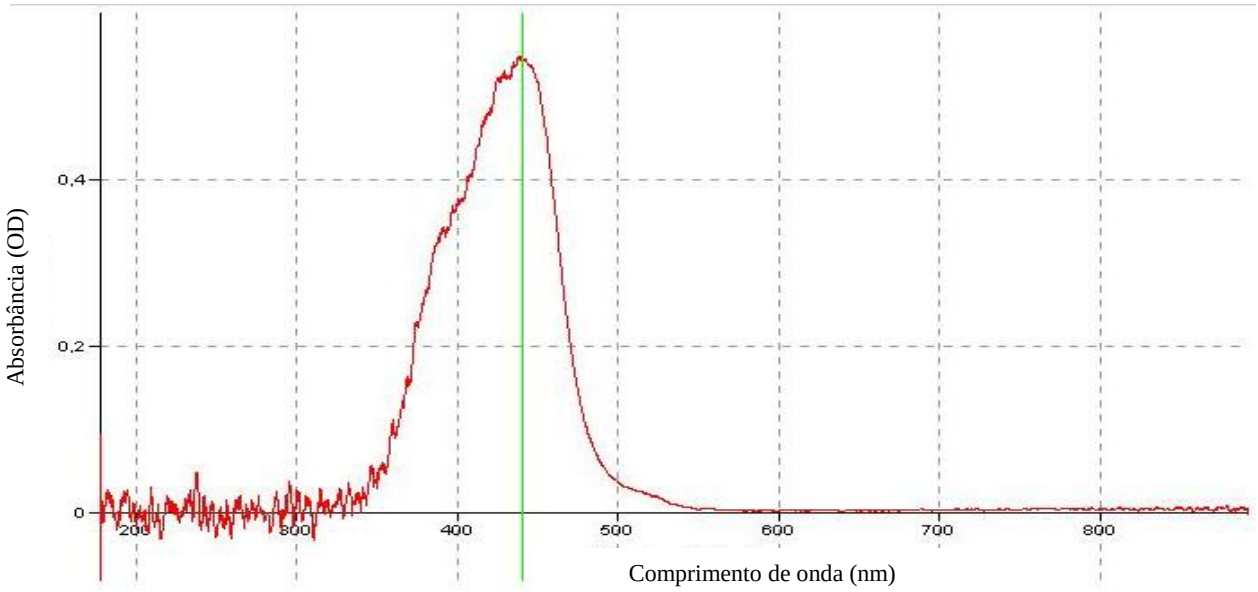
Observou-se a formação de um produto de coloração amarela estável na reação entre *p*-DAB e a ureia, conforme a Figura 8. De acordo com a literatura[32] o produto amarelo é uma simples Base de Schiff com estrutura ressonante quinóide.

Figura 8: Esquematização da reação a reação entre a ureia e o p-DAB



O produto colorido formado na superfície do papel de filtro possui uma cor amarela intensa cujo espectro é mostrado na Figura 9.

Figura 9. Espectro de A_R da reação de spot test no papel de filtro entre ureia e p-DAB em meio ácido. O valor máximo de A_R foi em 440 nm. [ureia] = 500 mg. L^{-1}.



4.1.4. Escolha do solvente

Foram realizados testes em diferentes concentrações de ureia ($mg.L^{-1}$) reagindo com os reagentes cromogênicos p-DAB e p-DAC ambos nas concentrações de 0,2 % (m/v) acidificado com [HCl] = 0,06 $mol.L^{-1}$. Adicionou-se 20µL de solução de reagente cromogênico e 20µL de solução do analito nas concentrações (50, 100, 250, 500, 1000, 5000 ppm ($mg.L^{-1}$)) utilizando como solvente etanol e metanol em momentos diferentes para a verificação da sensibilidade do produto reacional de ambos reagentes cromogênicos frente a diferentes solventes.

4.1.4.1. Resultados com diferentes solventes para o reagente cromogênico p-DAC

*Tabela 3- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **etanol**/ p-DAC**

Concentração ureia ppm ($mg.L^{-1}$)	A_R
50	0,0197
100	0,0634
250	0,4380
500	0,8750
1000	1,7240

*[p-DAC] 0,2 % (m/v) com [HCl] = 0,06 mol/L.

Figura 10-Curva Analítica - Solvente: etanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAC

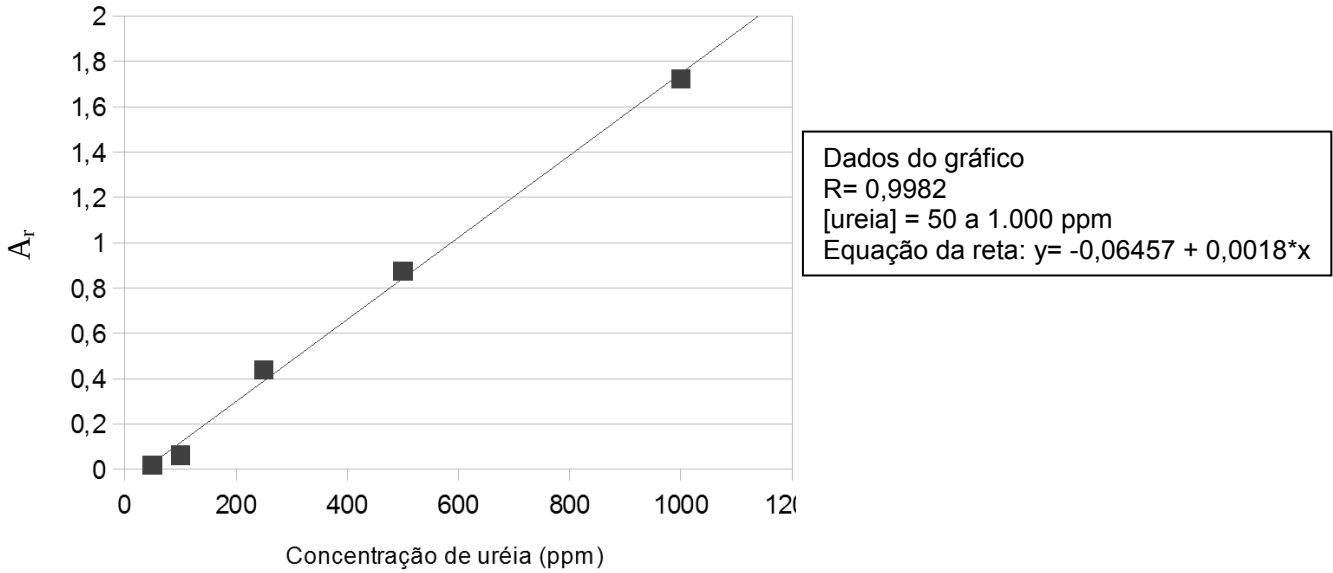
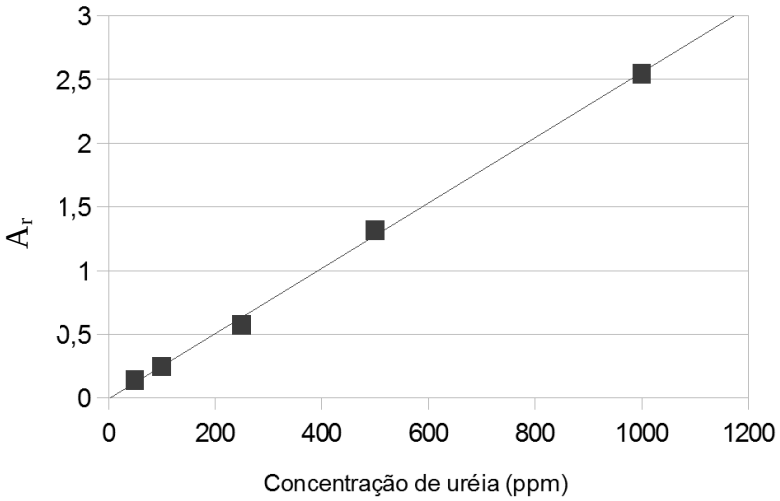


*Tabela 4- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **metanol**/ p-DAC**

Concentração ureia ppm ($mg.L^{-1}$)	A_R
50	0,1420
100	0,2470
250	0,5740
500	1,3160
1000	2,5460

*[p-DAC] 0,2 % (m/v) com [HCl] = 0,06 mol/L.

Figura 11- Curva Analítica - Solvente: metanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAC



Dados do gráfico
R= 0,9993
[ureia] = 50 a 1.000 ppm
Equação da reta:
y= -0,00914 + 0,00246*x

Analisando as curvas (Figuras 10 e 11) verifica-se uma sensibilidade maior do reagente cromogênico p-DAC quando é utilizado como solvente o metanol. Comparando-se ao etanol temos uma sensibilidade quatro vezes maior e um melhor coeficiente de correlação.

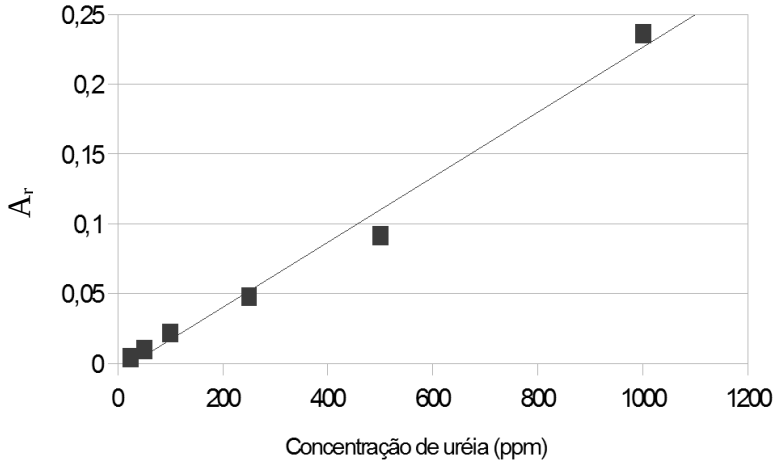
4.1.4.2. Resultados com diferentes solventes para o reagente cromogênico p-DAB

*Tabela 5- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **etanol**/ p-DAB**

Concentração ureia ppm ($mg.L^{-1}$)	A_R
25	0,00396
50	0,00996
100	0,02187
250	0,04778
500	0,09141
1000	0,23633

**[p-DAB] 0,2 % (m/v) com [HCl] = 0,06 mol/L.*

Figura 12-Curva analítica - Solvente: etanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAB



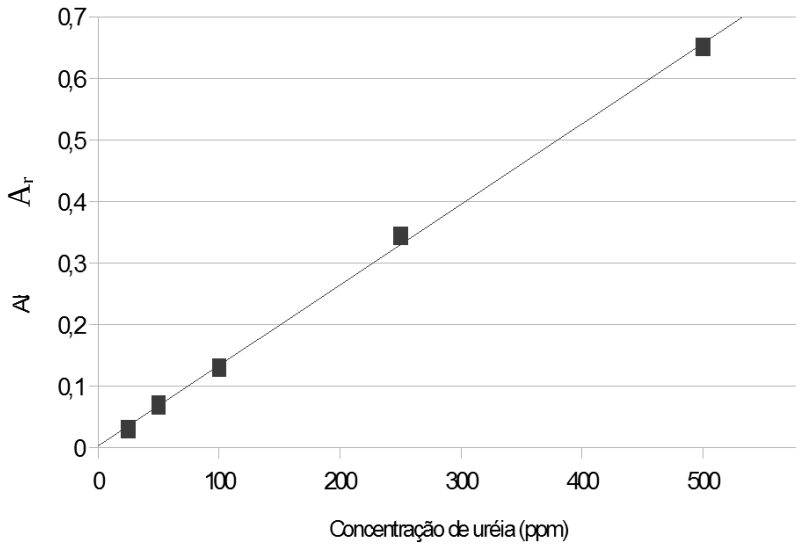
Dados do gráfico
R= 0,9986
[ureia] = 25 a 1.000 ppm
Equação da reta: y= 0,00025 + 0,00454*x

*Tabela 6- Dados de absorbância x conc. de ureia - Solvente: **metanol**/ p-DAB**

Concentração ureia PPM	A_R
25	0,0302
50	0,0690
100	0,1300
250	0,3433
500	0,6509
1000	0,9351

**[p-DAB] 0,2 % (m/v) com [HCl] = 0,06 mol/L.*

Figura 13-Curva analítica - Solvente: metanol (Absorbância x Concentração de Ureia) p-DAB



Dados do gráfico
R= 0,99991
[ureia] = 25 a 500 ppm
Equação da reta: y= 0,01058 + 0,00301*x

Analisando as curvas das Figuras 12 e 13 verifica-se uma sensibilidade maior do reagente cromogênico p-DAB quando é utilizado como solvente o metanol. Comparando-se ao etanol temos uma sensibilidade sete vezes maior.

Avaliando os dois reagentes cromogênicos frente aos solventes utilizados temos uma maior sensibilidade com o reagente cromogênico p-DAC e um aumento significativo de sensibilidade para ambos reagentes cromogênicos quando foi utilizado no meio reacional o metanol como solvente.

4.2. Meio micelar

Verificou-se a sensibilidade da reação entre a ureia com os reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC) frente à utilização de surfactantes adicionados no meio reacional. Os efeitos que as micelas exercem nas reações químicas tem sido estudados durante as últimas décadas, resultando no desenvolvimento de equações teóricas correspondentes aos processos químicos que ocorrem em ambientes micelares.

Os sistemas micelares podem modificar a velocidade das reações e surpreende, portanto, que estas características foram pouco exploradas para melhorar os métodos cinéticos de análises. As micelas catalisam as reações químicas e para que esta catálise ocorra são necessário que se cumpram duas condições: o substrato deve se solubilizar no agregado micelar e o centro da solubilização não deve impedir que o centro reativo do substrato seja acessível ao reativo atacante.

Por esse motivo decidiu-se então estudar a influência de um surfactante catiônico (DTAB, Brometo de dodecil-trimetilamônio) e um aniônico (SDS,Dodecil-sulfato de sódio).

Para tal, utilizaram-se concentrações de surfactante acima da concentração micelar crítica (0,8 $mmol.L^{-1}$ para o DTAB e 8,0 $mmol.L^{-1}$ para o SDS) e as concentrações de ureia utilizadas para os testes foram de 200 ppm ($mg.L^{-1}$).

O teste de influência do surfactante na mancha foi realizado com a adição de 20µL da solução de ureia e, logo em seguida, 20µL da solução do reagente cromogênico. O surfactante foi adicionado de diferentes maneiras: somente na solução de ureia, somente no reagente cromogênico ou em ambas as soluções.

Deste modo, além de se testar a influência do surfactante, testa-se também a influência da ordem de adição. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

- **Teste como surfactante aniônico SDS**

Tabela 7 -Solvente: metanol - p-DAB e p-DAC (0,4% (m/v) 0,12 mol/L de HCl- p-DAB:Leitura em 440 nm / p-DAC:Leitura em 530 nm

	p-DAB	**p-DAC**
	A_R	A_R
CROM + ureia	0,0839	0,1986
CROM + ureia(S)	0,1062	0,2026
CROM (S) + ureia	0,0704	0,1801
CROM (S) + ureia(S)	0,1023	0,2097

- Adição de SDS no analito: Ureia(S)
- Adição de SDS no reagente cromogênico: CROM(S)

Analisando-se os dados dispostos na Tabela 7 observa-se que ocorre um pequeno aumento na sensibilidade da reação frente à adição de SDS no analito.

- **Teste como surfactante aniônico SDS**

Tabela 8- Solvente: metanol - p-DAB e p-DAC (0,4% (m/v) 0,12 mol/L de HCl- p-DAB:Leitura em 440 nm / p-DAC:Leitura em 530 nm

	p-DAB	**p-DAC**
	A_R	A_R
CROM + ureia	0,0832	0,1802
CROM + ureia(S)	0,0863	0,1849
CROM (S) + ureia	0,0870	0,1914
CROM (S) + ureia(S)	0,0881	0,1830

- Adição de DTAB no analito: Ureia(S)
- Adição de DTAB no reagente cromogênico (p-DAB): p-DAB(S)

Analisando-se os dados dispostos na Tabela 8 não se observa aumento significativo da sensibilidade da reação com uso de surfactante catiônico (DTAB).

4.3. Estabilidade Óptica

Com o objetivo de avaliar a estabilidade óptica do produto colorido da reação de spot test em relação ao tempo entre ureia e os reagentes cromogênicos p-DAB e p-DAC no papel de filtro, realizou-se um acompanhamento cinético do valor de A_R a 530 nm para o p-DAC e 440 nm para o p-DAB a cada 5 minutos até completar 1 hora.

Figura 14- Estabilidade óptica do produto da reação p-DAB/ureia

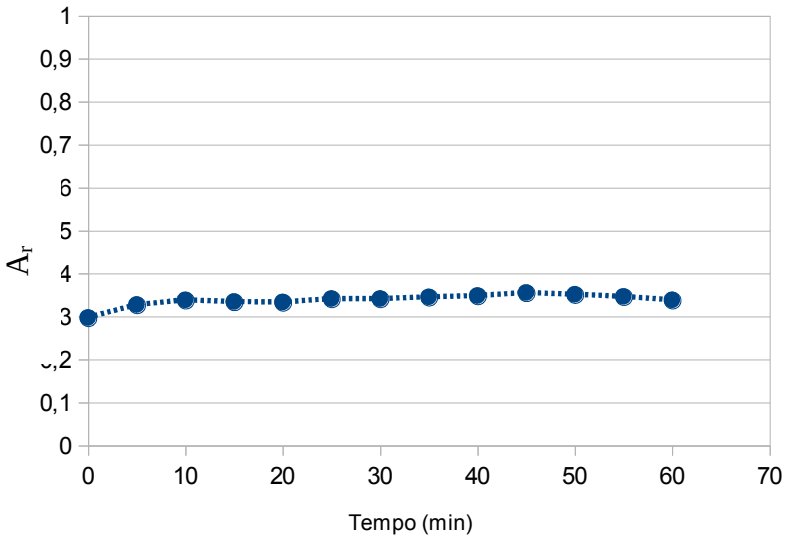
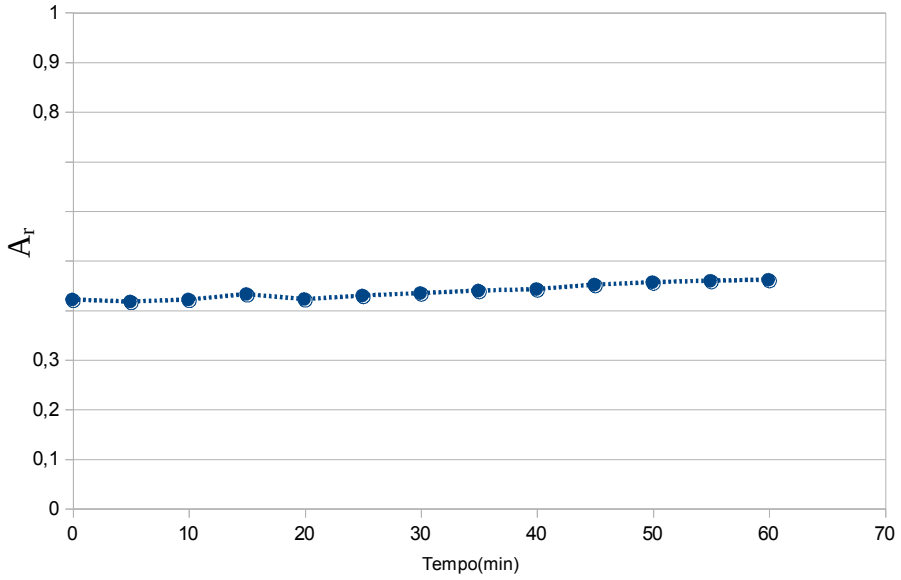


Figura 15-Estabilidade óptica do produto da reação p-DAC/ureia



Os resultados obtidos no estudo de estabilidade óptica do produto formado demonstram que o produto colorido da reação mostra um valor de reflectância estável por pelo menos 60 minutos, conforme ilustrado nas figuras 14 e 15 para ambos reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC).

4.4. Triagem das Variáveis e Planejamento Fatorial[67,68]

A otimização das condições experimentais foi realizada utilizando planejamento de experimentos[67,68]. O planejamento fatorial completo é utilizado para estimar os efeitos das variáveis na respectiva leitura. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados analisados utilizando os programas Minitab 15 e Statistica 6.0. No planejamento fatorial completo realizado fixou-se a concentração do analito (ureia) em 200 $mg.L^{-1}$ a ordem de aplicação no *spot test e volume da gota* foi 20 µL reagente cromogênico em seguida foi aplicado 20µL do analito com SDS. O solvente utilizado foi metanol, o ácido HCl 37% (m/m) foi adicionado ao reagente cromogênico no momento do preparo e as leituras de absorbância foram feitas em 440 nm para o p-DAB e 530 nm para o p-DAC.

4.4.1. Resultados do Planejamento Fatorial para o reagente cromogênico p-DAB

Tabela 9-Dados de absorbância x conc. de ureia/ Planejamento Fatorial p-DAB

Exp.	[p-DAB]% (m/v)	[HCl](mol.L^{-1})	[SDS](mmol.L^{-1})	A_R1	A_R2	A_R3	$A_{Rmédio}$
1	0,2	0,06	5	0,0882	0,0862	0,0890	0,0878
2	1,0	0,06	5	0,1879	0,1931	0,1988	0,1933
3	0,2	0,50	5	0,0019	0,0020	0,0017	0,0019
4	1,0	0,50	5	0,0647	0,0708	0,0681	0,0679
8	0,2	0,06	12	0,0966	0,0947	0,0931	0,0948
6	1,0	0,06	12	0,2033	0,2121	0,2310	0,2155
7	0,2	0,50	12	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8	1,0	0,50	12	0,1068	0,0872	0,0894	0,0945

Após a realização do planejamento fatorial foram feitas as leituras de absorbância em 440 nm (Tabela 9) e através de ferramentas de quimiometria utilizando o software MiniTab 16 foram obtidos os seguintes gráficos através da analise dos dados obtidos experimentalmente.

Figura 16- Gráfico de pareto p-DAB

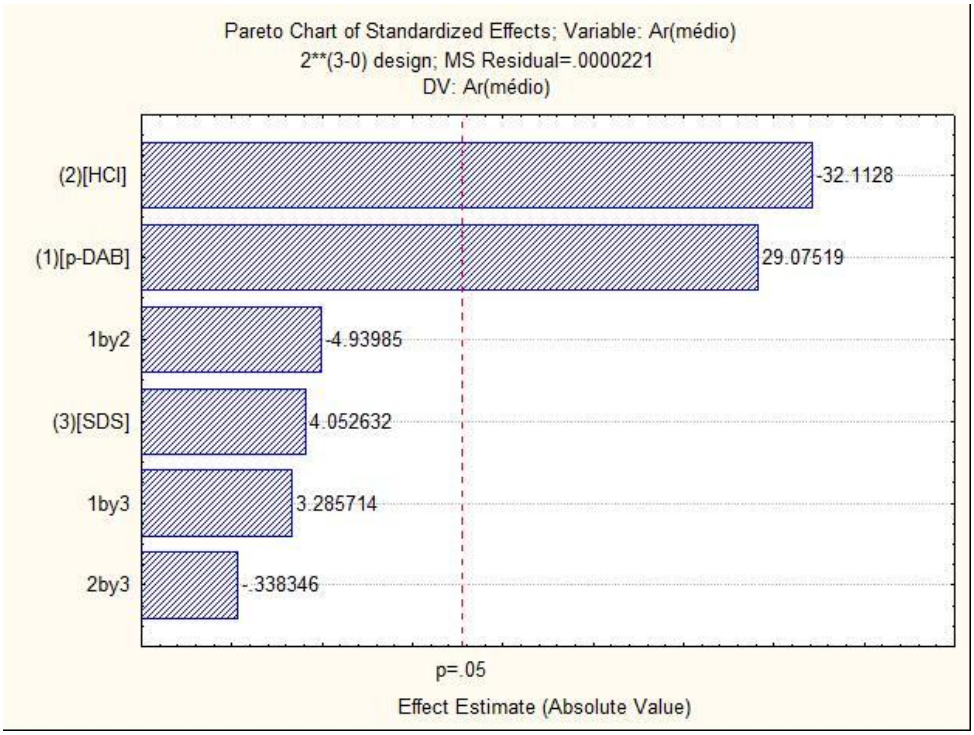
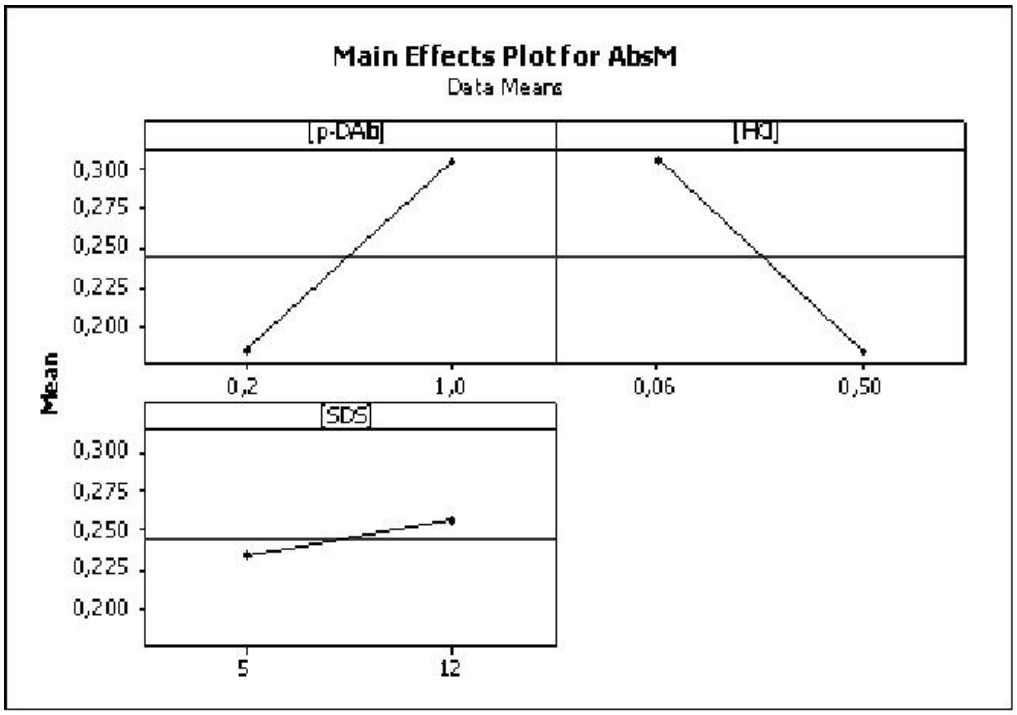


Figura 17-Gráfico dos efeitos principais p-DAB



A partir dos resultados do planejamento fatorial completo, obtivemos os gráficos (Figura 16 e 17) e analisando o gráfico de Pareto (Figura 16) temos uma visualização dos efeitos estimados dos fatores principais fornecendo uma representação gráfica para estes fatores e permitindo observar a magnitude e a importância de um determinado efeito. No gráfico (Figura 16) as barras (fatores) que graficamente ultrapassam a linha de significância foram [p-DAB] e [HCl] mostrando que estes dois fatores exercem uma influência estatisticamente significativa sobre a reação. Analisando a Figura 17 podemos concluir que a adição de surfactante não altera significativamente a sensibilidade da reação. Observa-se também na Figura 17 que a concentração de ácido também apresentou um valor negativo, indicando que as maiores respostas foram alcançadas com a solução de HCl em concentrações mais baixas, enquanto que a concentração do p-DAB apresentou valor positivo, sugerindo que as maiores respostas foram obtidas quando esta solução estava em concentrações mais altas.

4.4.2. Planejamento Composto Central (SUPERFICIE DE RESPOSTA) p- DAB[67,68]

Os experimentos foram realizados em triplicata, uma vez que a ordem de adição havia sido estabelecida na primeira etapa, os fatores estudados no planejamento composto central foram a concentração de HCl, variando de 0,01 – 0,60 mol/L, a concentração de solução de p-DAB (1 – 10,0 % (m/v)), fixou-se a concentração do analito (ureia) em 200 ppm conforme os dados da Tabela 10.

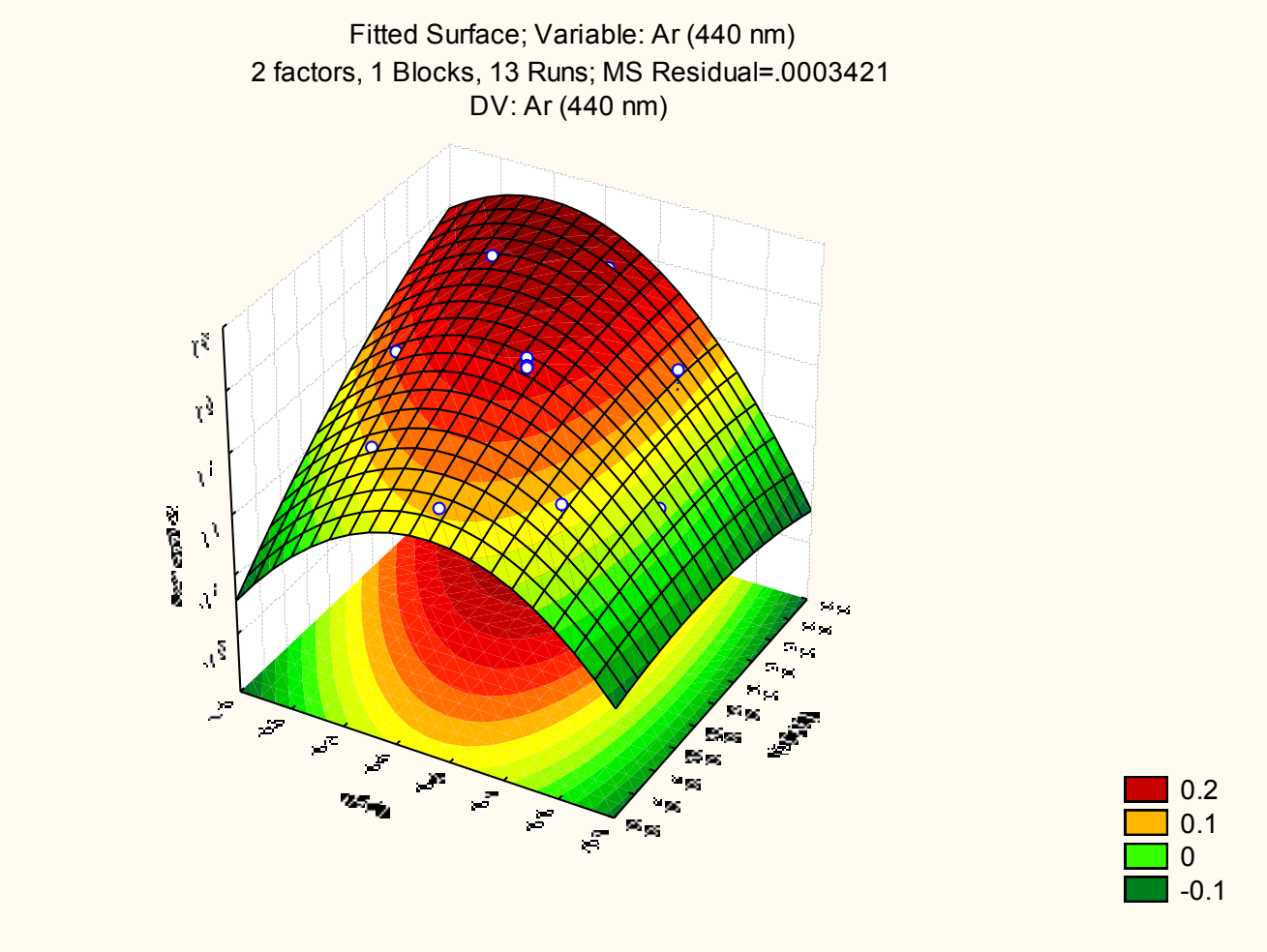
Tabela 10-Matriz e resultados obtidos no planejamento composto central

N° Exp.	Variáveis Codificadas		Variáveis não Codificadas		
	[HCl](mol.L^{-1})	[p-DAB]%(m/v)	[p-DAB]%(m/v)	[HCl](mol.L^{-1})	$A_{Rmédio}$
1	-1	-1	2,318	0,096	0,1483
2	+1	-1	8,682	0,096	0,2430
3	-1	+1	2,318	0,514	0,1293
4	+1	+1	8,682	0,514	0,3817
5	-√2	0	1,000	0,305	0,0863
6	+√2	0	10,00	0,305	0,3487
7	0	-√2	5,500	0,010	0,0000
8	0	+√2	5,500	0,600	0,2503
9	0	0	5,500	0,305	0,2963
10	0	0	5,500	0,305	0,2870
11	0	0	5,500	0,305	0,2923
12	0	0	5,500	0,305	0,2937
13	0	0	5,500	0,305	0,2893

Observando-se a superfície de resposta juntamente com sua curva de nível (Figuras 18 e 19), cuja matriz está representada na Tabela 10, percebe-se que há uma região de máximo valor de A_R situada na área vermelha mais escura do gráfico que representa as condições ótimas para a realização da reação de spot test quantitativo.

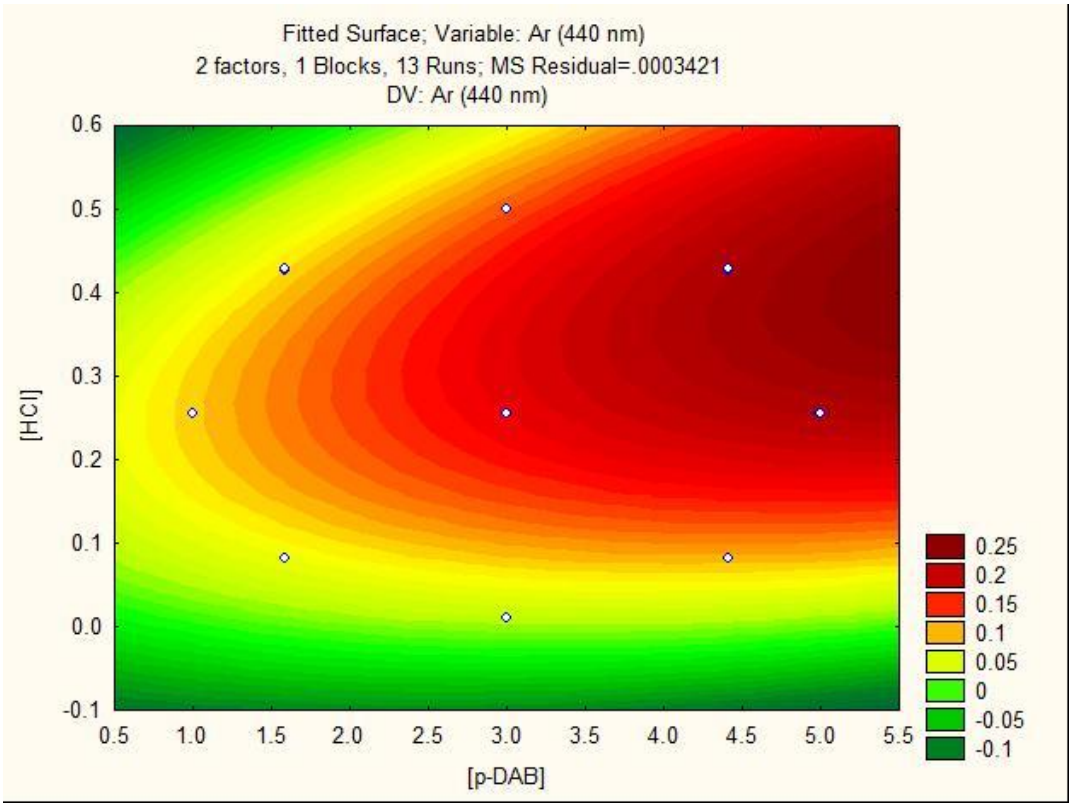
Figura 18 - Superfície de resposta obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e concentração de p-DAB (8,3985% (m/v)).

[ureia] =200 ppm ($mg.L^{-1}$)



Equação: $Z = -0,06978 + 0,03568\ x - 0,00232\ x^2 + 0,93465\ y - 1,60231\ y^2 + 0,005938\ x\ y$

Figura 19 -Curva de nível obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e p-DAB. [ureia] =200 mg.L



Os resultados obtidos a partir deste planejamento foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela equação acima, utilizando o programa Statistica, versão 6.0.

Depois de realizada toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais: **p-DAB = 8,3985% (m/v), HCl = 0,5014 mol.L^{-1}.**

4.4.3 Resultados do Planejamento Fatorial para o reagente cromogênico p-DAC

Tabela 11-Dados de absorbância x conc. de ureia/ Planejamento Fatorial p-DAC

Exp.	[p-DAC]% (m/v)	[HCl](mol.L^{-1})	[SDS](mmol.L^{-1})	A_R1	A_R2	A_R3	$A_{Rmédio}$
1	0,20	0,06	5	0,238	0,249	0,235	0,241
2	1,00	0,06	5	0,350	0,348	0,352	0,350
3	0,20	0,50	5	0,110	0,113	0,108	0,110
4	1,00	0,50	5	0,234	0,243	0,226	0,234
8	0,20	0,06	12	0,268	0,273	0,266	0,269
6	1,00	0,06	12	0,364	0,368	0,357	0,363
7	0,20	0,50	12	0,120	0,124	0,115	0,120
8	1,00	0,50	12	0,264	0,272	0,278	0,271

Após a realização do planejamento fatorial conforme Tabela 11 foram feitas as leituras de absorbância em 530 nm e utilizando o software Mini Tab 16 foram obtidos os seguintes gráficos através da analise dos dados obtidos experimentalmente.

Figura 20-Gráfico de pareto p-DAC

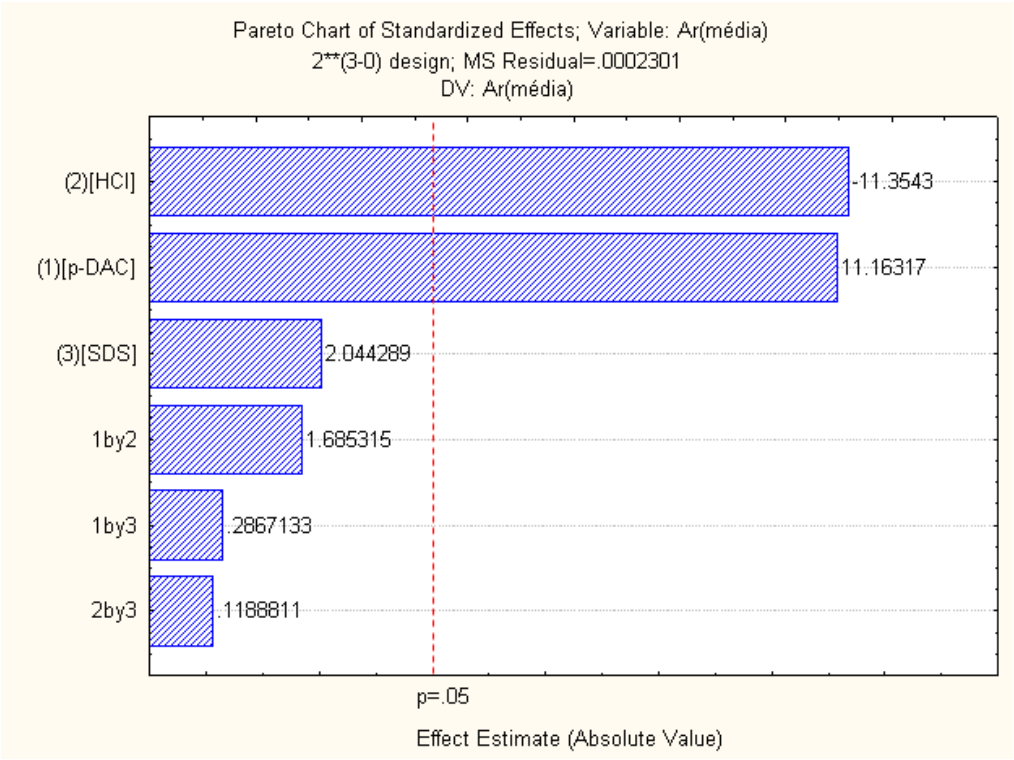
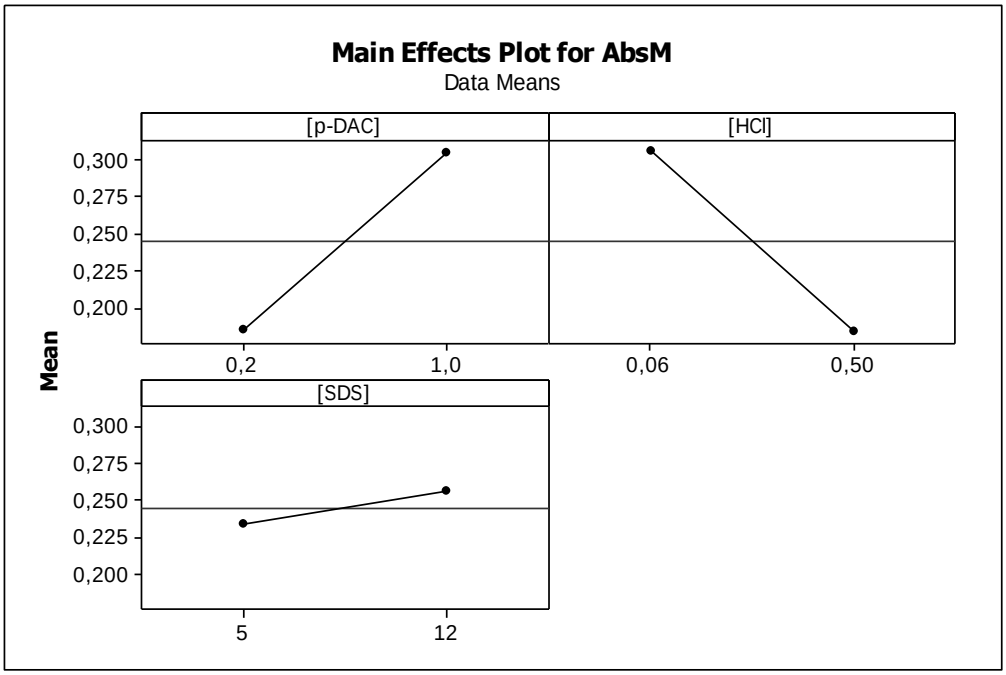


Figura 21-Gráfico dos efeitos principais -p-DAC



Através do planejamento fatorial completo, obtivemos os gráficos (Figura 20 e 21) analisando o gráfico de Pareto (Figura 20) temos uma visualização dos efeitos estimados dos fatores principais fornecendo uma representação gráfica para estes fatores e permitindo observar a magnitude e a importância de um determinado efeito. No gráfico (Figura 20) as barras (fatores) que graficamente ultrapassam a linha de significância foram [p-DAC] e [HCl] mostrando que estes dois fatores exercem uma influência estatisticamente significativa sobre a reação. Analisando a Figura 21 podemos concluir que a adição de surfactante não altera significativamente a sensibilidade da reação. Observa-se na Figura 21 que a concentração de ácido também apresentou um valor negativo, indicando que as maiores respostas foram alcançadas com a solução de HCl em concentrações mais baixas, enquanto que a concentração do p-DAC apresentou valor positivo, sugerindo que as maiores respostas foram obtidas quando esta solução estava em concentrações mais altas.

4.4.4. Planejamento Composto Central (SUPERFICIE DE RESPOSTA) p- DAC

Os experimentos foram realizados em triplicata, uma vez que a ordem de adição havia sido estabelecida na primeira etapa, os fatores estudados no planejamento composto central foram a concentração de HCl, variando de 0,010 – 0,300 mol.L^{-1}, e o a concentração de solução de p-DAC (0,500 – 3,00 % (m/v)), fixou-se a concentração do analito (ureia) em 200 ppm conforme Tabela 12.

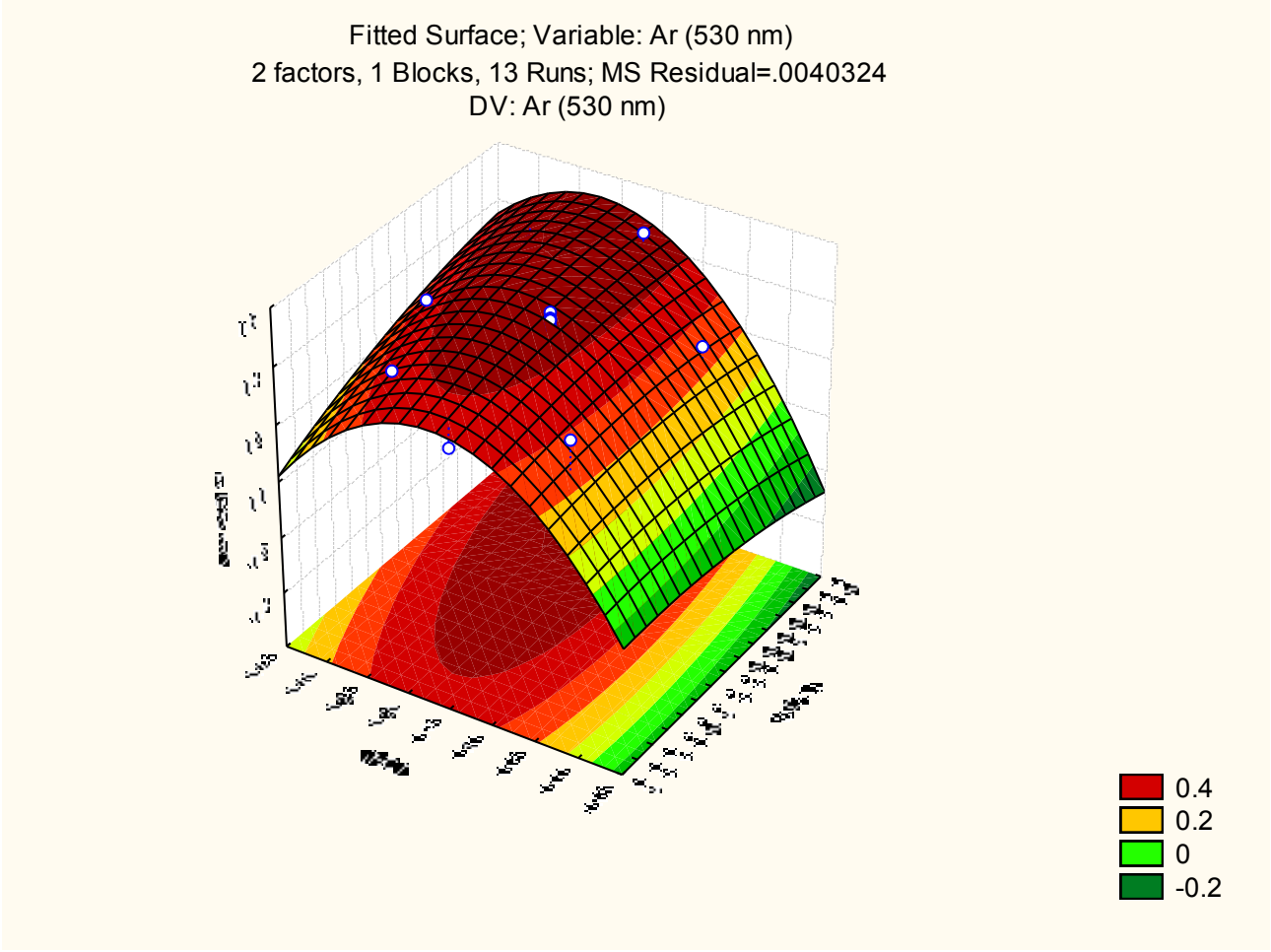
Tabela 12-Matriz e resultados obtidos no planejamento composto central- p-DAC

N° Exp.	Variáveis Codificadas		Variáveis não Codificadas		
	[HCl](mol.L^{-1})	[p-DAC]%(m/v)	[p-DAC]%(m/v)	[HCl](mol.L^{-1})	$A_{Rmédio}$
1	-1	-1	0,866	0,053	0,340
2	+1	-1	2,634	0,053	0,265
3	-1	+1	0,866	0,258	0,371
4	+1	+1	2,634	0,258	0,445
5	-√2	0	0,500	0,155	0,295
6	+√2	0	3,000	0,155	0,491
7	0	-√2	1,750	0,010	0,025
8	0	+√2	1,750	0,300	0,383
9	0	0	1,750	0,155	0,483
10	0	0	1,750	0,155	0,459
11	0	0	1,750	0,155	0,434
12	0	0	1,750	0,155	0,451
13	0	0	1,750	0,155	0,454

Observando-se a superfície de resposta juntamente com sua curva de nível (Figura 22 e 23), cuja matriz está representada na Tabela 12, percebe-se que há uma região de máximo valor de A_R situada na área vermelha mais escura do gráfico que representa as condições ótimas para a realização da reação de spot test quantitativo.

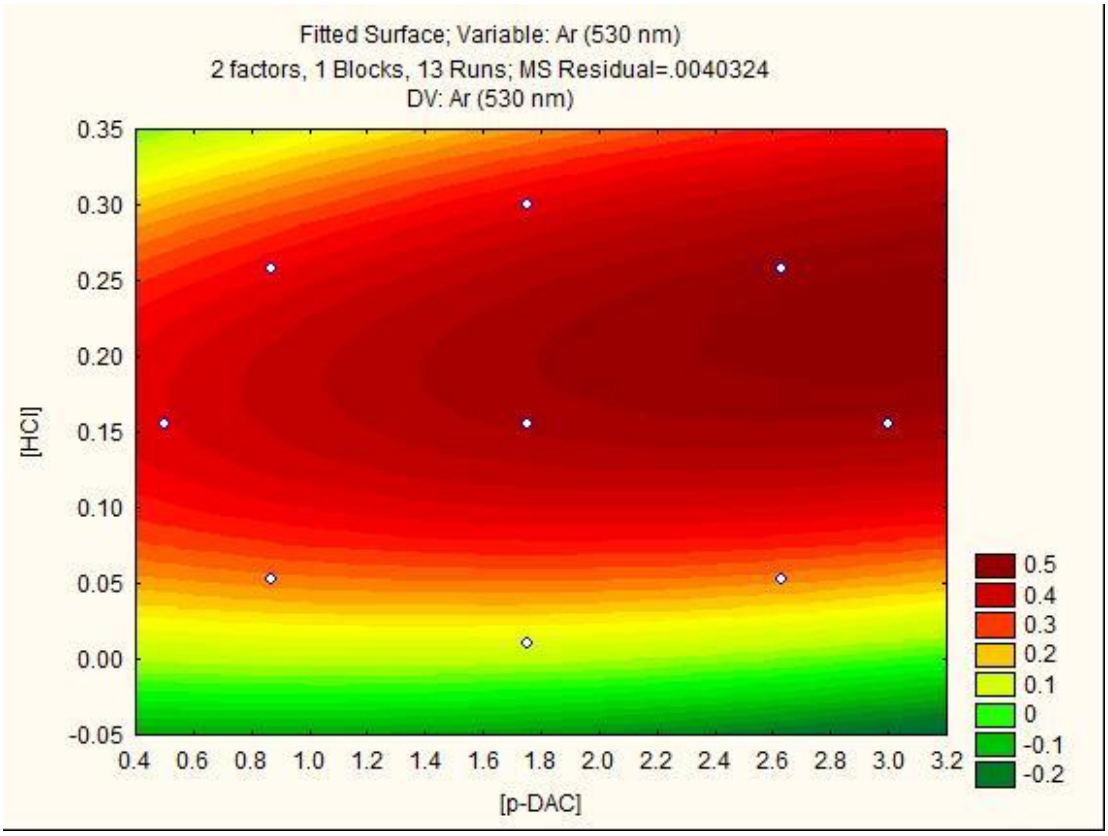
Figura 22-Superfície de resposta obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e concentração de p-DAC (3,2581% (m/v)).

[ureia] =200 ppm ($mg.L^{-1}$)



Equação: Z = 0,03942 + 0,05410 x – 0,02250 x^2 + 3,45336 y -10,64565 y^2 + 0,41103 x y

Figura 23- Curva de nível obtida no planejamento composto central para valores de A_R em função da concentração de HCl e p-DAC. [ureia] =200 mg.L^{-1}



Os resultados obtidos a partir deste planejamento foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela equação acima, utilizando o programa Statistica, versão 6.0.

Depois de realizada toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais: **p-DAC = 3,2581% (m/v) e HCl = 0,2250 mol.L^{-1}.**

4.5. Testes de Linearidade, Repetibilidade e Curva Analítica

O teste de linearidade foi repetido 3 vezes utilizando concentrações de 10 a 750 ppm (mg.L^{-1}) de ureia. Utilizando o p-DAB como reagente cromogênico verificamos que para valores abaixo de 10 ppm o sinal de reflectância era muito baixo e, portanto, sujeitos a um erro muito grande. Para valores muito altos de concentração de ureia, as manchas não ficavam uniformes e ocorriam perdas, pois

as soluções permeavam através dos papéis de filtro, alterando a concentração do analito para análise. Tendo-se em mente estas limitações, construiu-se então a curva analítica.

A curva analítica, numa faixa linear de 25 a 750 ppm *(*mg.L^{-1}), foi construída através das devidas diluições da solução estoque de ureia (5000 ppm), descrita anteriormente. Um branco contendo 20 µL do reagente cromogênico e 20 µL de metanol foi preparado para zerar o equipamento.

4.5.1 Curva analítica concentrações otimizadas p-DAB

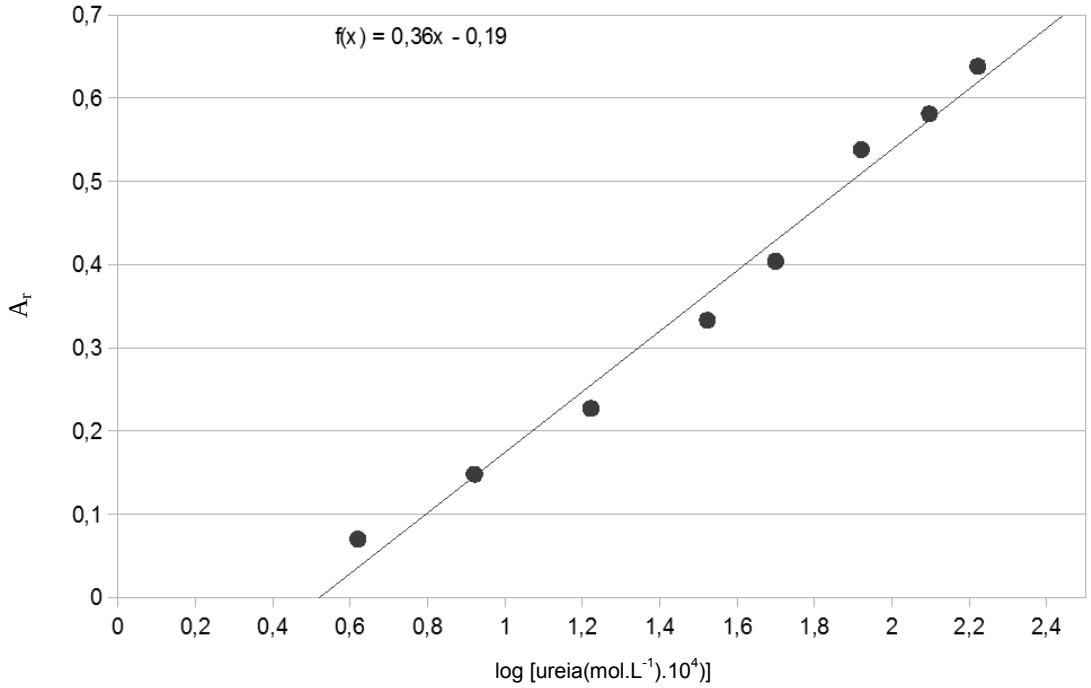
A Tabela 13 e a Figura 24 apresentam, respectivamente, os dados e a curva analítica construída a partir de soluções padrão de ureia e utilizando p-DAB como reagente cromogênico nas condições ótimas (**p-DAB = 8,3985% (m/v) e HCl = 0,5014 mol.L^{-1})**.

Tabela 13-Dados de reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAB. (Leitura em 440nm)

[Ureia] (mg.L^{-1})	**log[ureia(mol/l)*10^4]**	**A_R1**	**A_R 2**	**A_R 3**	**A_R (média)**
10	0,222	0,025	0,022	0,029	0,025
25	0,62	0,068	0,069	0,072	0,070
50	0,921	0,147	0,153	0,145	0,148
100	1,222	0,224	0,225	0,231	0,227
200	1,523	0,330	0,338	0,331	0,333
300	1,699	0,398	0,405	0,410	0,404
500	1,921	0,537	0,535	0,541	0,538
750	2,097	0,581	0,585	0,578	0,581

Figura 24-Gráfico da reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAB. Aplicação de regressão linear aos dados da Tabela 13. Concentração de ureia: 25 – 750 mg.L^{-1}.

Equação da reta: A_R = -0,1893 + 0,36428 x . Coeficiente de correlação: 0,992



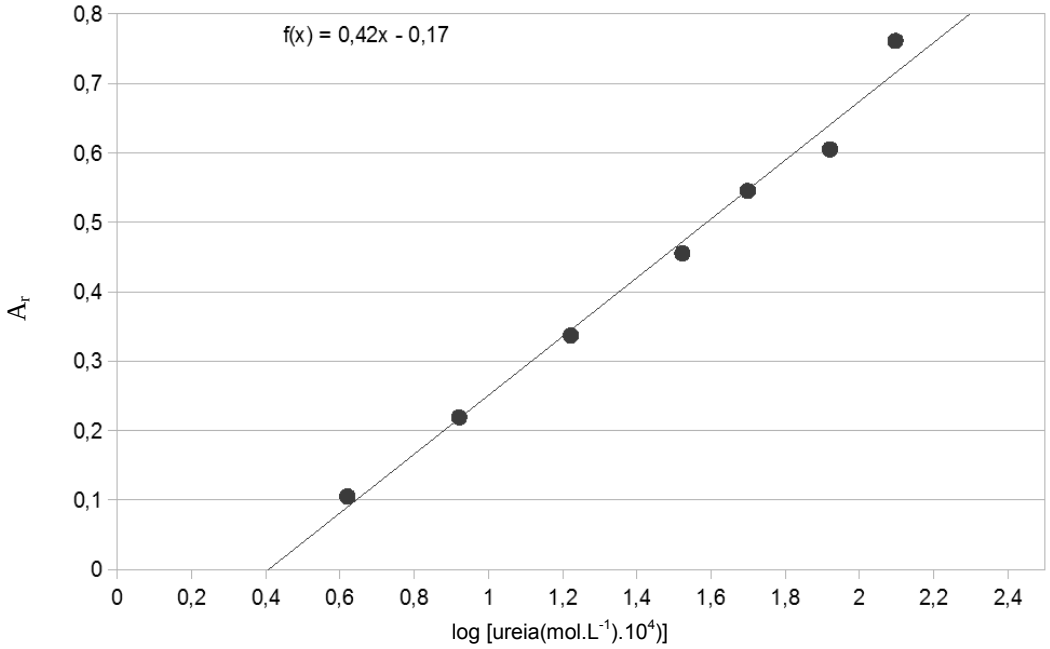
4.5.2. Curva analítica concentrações otimizadas p-DAC

A Tabela 14 e a Figura 25 apresentam, respectivamente, os dados e a curva analítica construída a partir de soluções padrão de ureia e utilizando p-DAC como reagente cromogênico nas condições ótimas (**p-DAC = 3,2581% (m/v) e HCl = 0,2250 mol.L^{-1})**.

Tabela 14-Dados de reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAC. (Leitura em 530nm)

Conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	log [ureia(mol/l)*10^4]	A_R1	A_R 2	A_R 3	A_R (média)
10	0,222	0,054	0,057	0,055	0,055
25	0,620	0,106	0,102	0,108	0,105
50	0,921	0,219	0,218	0,221	0,219
100	1,222	0,337	0,340	0,335	0,337
200	1,523	0,455	0,451	0,459	0,455
300	1,699	0,542	0,548	0,544	0,545
500	1,921	0,605	0,601	0,609	0,605
750	2,097	0,763	0,760	0,759	0,761

Figura 25- Gráfico da reflectância em função da concentração de ureia utilizando p-DAC. Aplicação de regressão linear aos dados da Tabela 14.Concentração de ureia: 25 – 750 $mg.L^{-1}$ Equação da reta: A_R = -0,17214 + 0,42307 x . Coeficiente de correlação: 0,994



Em seguida, foram feitos ensaios a fim de verificar a repetibilidade do método dentro de um mesmo dia e entre dias diferentes. Para tal, foram feitos 3 experimentos repetindo alguns pontos da curva analítica, sendo dois desses experimentos realizados num mesmo dia em períodos diferentes e o terceiro, no dia subsequente a fim de se calcular o Desvio Padrão Relativo (RSD).

Tabela 15-: Verificação das repetibilidades intra e inter-dia –p-DAB

	RSD (%)
Repetibilidade Intra-dia	2,97
Repetibilidade Inter-dia	3,23

Tabela 16-Verificação das repetibilidades intra e inter-dia - p-DAC

	RSD (%)
Repetibilidade Intra-dia	1,90
Repetibilidade Inter-dia	1,80

Os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16 demonstram que as medidas são bastante precisas e satisfatórias, evidenciando a boa repetibilidade do método proposto.

4.6. Limites de Detecção e Quantificação

Com o objetivo de determinar os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ), foram preparados 10 brancos do mesmo modo descritos nos procedimentos acima realizando-se a leitura dos spot tests em 530 nm para o p-DAC e 440 nm para o p-DAB. Os valores de reflectância média e o desvio estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17**.** Reflectância média e desvio para os brancos

n=10	**p-DAB**	**p-DAC**
A_R médio	0,0393	0,1548
Desvio (σ)	0,0050	0,0052

Para determinar o Limite de Detecção (LD), partiu-se da seguinte fórmula:

$$LD = \frac{3*\sigma}{B},$$

onde σ é o desvio e B é o coeficiente angular da curva analítica.

Para determinar o Limite de Quantificação (LQ), partiu-se da seguinte fórmula:

$$LQ = \frac{10*\sigma}{B}.$$

Tabela 18. Limites de Detecção e Quantificação para a ureia.

	p-DAB	
	mol.L^{-1}	**[ureia] mg.L^{-1} (ppm)**
LD	1,10.10^{-4}	6,60
LQ	1,32.10^{-4}	7,90
	p-DAC	
LD	1,08.10^{-4}	6,50
LQ	1,33.10^{-4}	8,00

Através dos resultados obtidos, ambos reagentes cromogênicos evidenciaram uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido.

4.6.1. Resumo das otimizações.

Na Tabela 19 encontra-se um resumo de todas as figuras de mérito para a determinação de ureia utilizando os reagentes cromogênicos p-DAB e p-DAC.

Tabela 19- Resumos das figuras de mérito para cada um dos reagentes cromogênicos estudados

	Reagente cromogênico	
	p-DAB	**p-DAC**
Comprimento de onda (nm)	440	530
Concentrações dos componentes do reagente cromogênico	[p-DAB] = 8,398% (m/v) [HCl] = 0,5014 mol.L^{-1}	[p-DAC] = 3,258% (m/v) [HCl] = 0,2250 mol.L^{-1}
Ordem de adição dos reagentes	Reagente cromogênico + analito	Reagente cromogênico + analito
Estabilidade óptica	pelo menos 60 minutos	pelo menos 60 minutos
Linearidade	25 a 750 ppm	25 a 750 ppm
Curva analítica	AR = -0,1893 + 0,36428 x	AR = -0,17214 + 0,42307 x
Coeficiente de correlação	0,99217	0,99365
Repetibilidade intradia (%)	2,97	1,90
Repetibilidade interdia (%)	3,23	1,80
LD	6,60 mg.L^{-1}	6,50 mg.L^{-1}
LQ	7,90 mg.L^{-1}	8,00 mg.L^{-1}

4.7. Aplicação do Método Proposto para Amostras de Cosméticos e Cremes para pele contendo ureia

A metodologia desenvolvida com os dois reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC) foi aplicada para cremes hidratantes para a pele contendo ureia em diferentes concentrações (1% a 10%) e adquiridos em comércio local (farmácias). Os cremes utilizados tinham como excipiente o creme Croda (base hidrófilo umectante, emoliente e hidratante). Descrição dos componentes do excipiente utilizado: álcool cetearílico, álcool cetearílico 20, óleo mineral, álcool de lanolina, petrolatum, álcool de lanolina acetilado, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol, ureia e água deionizada. Nenhum dos excipientes supramencionados aparentemente apresenta interferência na reação do analito com os reagentes cromogênicos empregados.

Tabela 20-Valores de massa de creme para soluções preparadas. Solvente: metanol

Conc. Ureia creme (m/m)	**Massa de creme pesada(g)**	**Solução (mL)** (volume final)	**Conc. Ureia calculada ($mg.L^{-1}$)**
Therap 1% (1)[a]	0,1262	10	126,20
Therap 1% (2)[a]	0,1343	10	134,30
Therap 1% (3)[a]	0,1297	10	129,70
Therap 3% (1)[a]	0,0885	25	106,20
Therap 3% (2)[a]	0,0823	25	98,76
Therap 3% (3)[a]	0,0801	25	96,12
Viva 5% (1)[a]	0,1862	25	372,40
Viva 5% (2)[a]	0,1942	25	388,40
Viva 5% (3)[a]	0,2600	25	520,00
Therap 5% (1)[a]	0,1049	50	104,90
Therap 5% (2)[a]	0,1010	50	101,00
Therap 10% (1)[a]	0,0948	100	94,80
Therap 10% (2)[a]	0,0920	100	92,00
Nutra 10% (1)[b]	0,3460	100	346,00
Nutra 10% (2)[b]	0,3230	100	323,00
Nutra 10% (3)[b]	0,3670	100	367,00
Cos10%(1)[b]	0,0883	50	176,60
Cos10%(2)[b]	0,0721	50	144,20
Cos10%(3)[b]	0,0701	50	140,20

a = cremes adquiridos em farmácias de manipulação.
b = produtos comerciais adquiridos em farmácia.

Foram preparadas as soluções com valores finais de concentração de ureia de acordo com a tabela 20. Após a pesagem solubilizou-se o creme em metanol transferindo-se quantitativamente para um balão volumétrico e completado o volume

com metanol. Para completa solubilização a solução foi mantida em ultrassom por 10 minutos e na sequência foram realizadas as medidas de reflectância para os dois reagentes cromogênicos utilizando os métodos desenvolvidos. Os resultados obtidos para os reagentes cromogênicos p-DAB e p-DAC estão listados nas tabelas 21 e 22 respectivamente.

Tabela 21-Determinação de ureia em cremes para a pele pelo método proposto utilizando p-DAB (n =3).

Conc. Ureia creme (%(m/m))	**$A_{r(médio)}$ 440nm**	**Conc. Ureia calculada ($mg.L^{-1}$)**	**Conc. Ureia obtida ($mg.L^{-1}$)**	**Conc. Ureia total creme obtida (%(m/m))**
Therap 1% (1)[a]	0,276	126,20	113,94	**0,90**
Therap 1% (2)[a]	0,282	134,30	118,34	**0,88**
Therap 1% (3)[a]	0,280	129,70	116,85	**0,90**
Therap 3% (1)[a]	0,258	106,20	101,25	**2,86**
Therap 3% (2)[a]	0,238	98,76	89,23	**2,71**
Therap 3% (3)[a]	0,236	96,12	88,11	**2,75**
Therap 5% (1)[a]	0,238	101,00	89,29	**4,20**
Therap 5% (2)[a]	0,236	160,10	132,60	**4,40**
VIVA 5% (1)[a]	0,442	372,40	322,36	**4,32**
VIVA 5% (2)[a]	0,451	388,40	343,45	**4,42**
VIVA 5% (3)[a]	0,488	520,00	483,94	**4,65**
Therap 10% (1)[a]	0,239	92,00	88,11	**9,49**
Therap 10% (2)[a]	0,236	110,40	99,14	**9,58**
COS 10% (1)[b]	0,321	176,60	151,11	**8,55**
COS 10% (2)[b]	0,290	144,20	124,22	**8,62**
COS 10% (3)[b]	0,289	140,20	123,18	**8,78**
NUTRA 10% (1)[b]	0,471	346,00	389,71	**11,26**
NUTRA 10% (2) [b]	0,461	323,00	368,17	**11,39**
NUTRA 10% (3) [b]	0,480	367,00	412,62	**11,24**

a = cremes adquiridos em farmácias de manipulação.
b = produtos comerciais adquiridos em farmácia.

Tabela 22-Determinação de ureia em cremes para a pele pelo método proposto utilizando p-DAC (n =3).

Conc. Ureia creme (%(m/m))	$A_{r(médio)}$ 530nm	Conc. Ureia calculada ($mg.L^{-1}$)	Conc. Ureia obtida ($mg.L^{-1}$)	Conc. Ureia total creme obtida (%(m/m))
Therap 1% (1)[a]	0,379	126,20	126,89	1,00
Therap 1% (2) [a]	0,402	134,30	145,22	1,08
Therap 1% (3) [a]	0,399	129,70	142,69	1,10
Therap 3% (1) [a]	0,319	106,20	89,22	2,52
Therap 3% (2) [a]	0,346	98,76	104,14	3,16
Therap 3% (3) [a]	0,343	96,12	102,32	3,19
Therap 5% (1) [a]	0,322	101,00	90,45	4,30
Therap 5% (2) [a]	0,319	160,10	88,88	4,40
VIVA 5% (1) [a]	0,5550	372,40	313,94	4,32
VIVA 5% (2) [a]	0,5807	388,40	361,61	4,42
VIVA 5% (3) [a]	0,6147	520,00	435,16	4,65
Therap 10% (1) [a]	0,353	94,80	108,72	9,84
Therap 10% (2) [a]	0,327	92,00	93,51	9,86
Therap 10% (3) [a]	0,324	110,40	91,88	8,89
COS 10% (1) [b]	0,454	176,60	197,05	11,10
COS 10% (2) [b]	0,417	144,20	158,59	10,90
COS 10% (3) [b]	0,414	140,20	155,82	11,10
NUTRA 10% (1) [b]	0,5730	346,00	346,22	11,26
NUTRA 10% (2) [b]	0,5620	323,00	326,10	11,39
NUTRA 10% (3) [b]	0,5830	367,00	365,63	11,24

a = cremes adquiridos em farmácias de manipulação.
b = produtos comerciais adquiridos em farmácia.

4.7.1. Adição de Padrão e Recuperação em amostras de creme comerciais

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 conforme Tabelas 23 e 24.

Tabela 23. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB.

P-DAB (n =3)					
	Conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	**$A_{r(médio)}$**	**log{[ureia(mol/L)]*10^4 }**	**Conc. Obtidas ($mg.L^{-1}$)**	**Recuperação (%)**
Inicio	**25,00**	0,059	0,68	**28,83**	**----------**
inicio + 50%	**37,00**	0,117	0,84	**41,7**	**111,0**
inicio + 100%	**50,00**	0,171	0,99	**58,42**	**116,0**
inicio + 150 %	**62,00**	0,194	1,05	**67,7**	**108,0**
inicio + 200%	**75,00**	0,217	1,12	**78,46**	**105,0**

Tabela 24. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC.

P-DAC (n =3)					
	Conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	**$A_{r(médio)}$**	**log{[ureia(mol/L)]*10^4 }**	**Conc. Obtidas ($mg.L^{-1}$)**	**Recuperação (%)**
Inicio	**25,00**	0,107	0,680	**25,710**	----------
inicio + 50%	**37,00**	0,155	0,840	**34,080**	**91,0**
inicio + 100%	**50,00**	0,208	0,990	**46,330**	**93,0**
inicio + 150 %	**62,00**	0,266	1,050	**65,121**	**104,0**
inicio + 200%	**75,00**	0,303	1,120	**81,170**	**108,0**

Os resultados expressos na tabela 23 e 24 mostram que o método proposto possui uma boa recuperação para análises de ureia em cremes dermatológicos com uma boa precisão e confiabilidade.

4.7.2. Validação do método proposto para cremes hidratantes através de comparação com o método oficial (Kjeldahl)

O método de Kjeldahl adotado pela AOAC[34] (Association of Official Analytical Chemists) baseado na quantificação total de nitrogênio da amostra é o método oficial para determinação de ureia em cremes hidratantes e cosméticos. Tal método consiste de uma completa digestão da amostra em ácido clorídrico 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, e gasto de energia que colidem com os princípios da química verde[1]. Adicionalmente o método também oferece riscos de manuseio durante a abertura de amostras e da realização das determinações, uma vez que o mesmo é conduzido em meio ácido e sob aquecimento, além de ser um procedimento demorado.

Foram preparadas soluções de acordo com a Tabela 25 com volumes e massas de ureia final conhecidas.

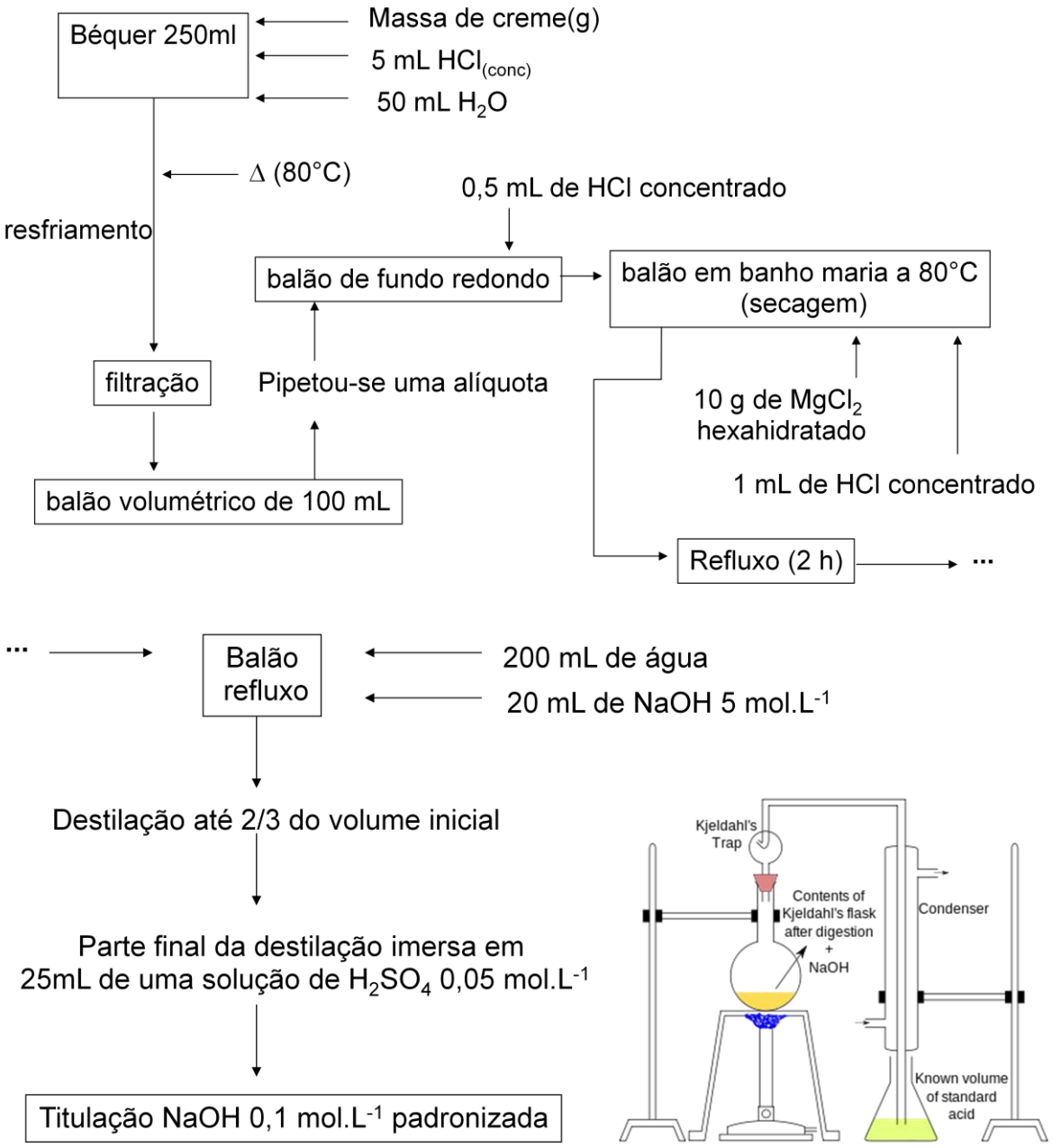
Tabela 25 Valores de massa e volume das soluções preparadas para o método de Kjeldahl

Conc. Ureia creme (%(m/m))	Massa creme	Volume de solução (mL)	Alíquota pipetada (mL)	Massa de ureia final (mg)
Therap 1%	6,765	100±0,08	50±0,05	33,82
Therap 3%	4,598	100±0,08	50±0,05	68,98
Therap 5%	4,603	100±0,08	25±0,03	57,54
Viva 5%	4,852	100±0,08	15±0,02	60,65
Therap 10%	4,831	100±0,08	15±0,02	72,47
Cos 10%	6,251	100±0,08	15±0,02	93,76
Nutra 10%	6,392	100±0,08	25±0,03	95,88

Pesaram-se as massas de creme em um béquer de 250 mL de acordo com a Tabela 25, em seguida adicionou-se 5±0,01 mL de HCl concentrado, adicionou-se 50 mL de água e aqueceu-se em chapa de aquecimento a 80°C até liquefazer e separar a fase oleosa. Esfriou-se até que os óleos se solidificassem, filtrou-se a fase aquosa para um balão volumétrico de 100 mL completando em seguida o volume com água até o menisco. Pipetou-se uma alíquota de acordo com a Tabela 25, e transferiu-se para um balão de fundo redondo, acidificou-se com 0,5 mL de HCl concentrado. Imergiu-se o balão em banho maria a 80°C e deixou-se evaporar até secura, adicionou-se 10 g de $MgCl_2$ hexa-hidratado e 1 mL de HCl concentrado. Conectou-se a um condensador de refluxo e aqueceu-se a mistura cuidadosamente e manteve-se em refluxo por 2 horas.

Diluiu-se a solução da amostra com 200 mL de água destilada e acrescentou-se 20 mL de NaOH 5 $mol.L^{-1}$, imediatamente iniciou-se o processo de destilação até 2/3 do volume inicial com a parte final do condensador a ponta imersa em 25mL de uma solução de H_2SO_4 0,05 $mol.L^{-1}$. Após a destilação, titulou-se a solução de H_2SO_4 com NaOH 0,1 $mol.L^{-1}$ padronizada[26].

Figura 26-Esquematização do método oficial (Método de Kjedahl) para cremes hidratante[26]



Na Tabela 26 temos os valores esperados de concentração de ureia das alíquotas retiradas da solução preparada de cada creme e um comparativo com a concentração obtida na alíquota através do método oficial. Estes valores posteriormente foram utilizados para encontrar a concentração de ureia total em cada creme hidratante.

Tabela 26. Quantificação de ureia pelo método oficial Kjeldahl

Conc. Ureia creme (%(m/m))	Conc. Ureia Esperada (mg)	Conc. Ureia Obtida (mg)
Therap 1%	33,82	30,01
Therap 3%	68,98	61,82
Therap 5%	57,54	45,61
Viva 5%	60,65	61,81
Therap 10%	72,47	79,85
Cos 10%	93,76	97,10
Nutra 10%	95,88	106,82

Os valores médios encontrados pelo método oficial estão expressos na Tabela 26.

Tabela 27. Comparativo - Método oficial x Métodos Propostos (p-DAB e p-DAC)

Creme	ROTULO (%(m/m))	KJELDAHL(%(m/m))	P-DAB (%(m/m))	P-DAC (%(m/m))
Therap	1	0,89 ±0,03	0,90±0,01	1,06 ±0,05
Therap	3	2,70 ±0,08	2,77±0,07	2,96 ±0,38
Therap	5	4,00 ±0,13	4,20±0,15	4,37 ±0,10
Viva	5	5,10 ±0,04	4,46±0,17	4,47 ±0,17
Therap	10	11,00 ±0,27	9,35±0,08	9,86 ±0,55
Cos	10	10,40 ±0,21	8,65±0,12	11,03 ±0,11
Nutra	10	11,10 ±0,20	11,29±0,08	11,30 ±0,08

[a:] Média ± Desvio Padrão (D.P.), n=3;

Na tabela 27 temos um comparativo do método oficial com o método propostos. Os valores apresentados evidenciam uma boa precisão e confiabilidade em ambos os métodos desenvolvidos.

Tabela 28 - Comparativo Método Oficial e Método proposto (p-DAB)

Creme	KJELDAHL(%(m/m))	P-DAB (%(m/m))	TEST F(19,00)d	TEST t(2,78)d
Therap 1%(m/m)[a]	0,89 ±0,03	0,90±0,01	0,430	0,227
Therap 3% (m/m)[a]	2,70 ±0,08	2,77±0,07	1,846	0,150
Therap 5% (m/m)[a]	4,00 ±0,13	4,20±0,15	1,695	0,075
Viva 5% (m/m)[a]	5,10 ±0,04	4,46±0,17	0,264	0,048
Therap 10% (m/m)[a]	11,00 ±0,27	9,35±0,08	0,328	0,011
Cos 10% (m/m)[b]	10,40 ±0,21	8,65±0,12	0,974	0,015
Nutra 10% (m/m)[b]	11,10 ±0,20	11,29±0,08	0,554	0,099

[c:] Média ± Desvio Padrão (D.P.), n=3;

[d]: Valores críticos de t ao nível de confiança de 95%;

Tabela 29 - Comparativo Método Oficial e Método proposto (p-DAC)

Creme	KJELDAHL(%(m/m))	P-DAC (%(m/m))	TEST F(19,00)d	TEST t(2,78)d
Therap 1%(m/m)[a]	0,89 ±0,03	1,06 ±0,05	1,300	0,004
Therap 3% (m/m)[a]	2,70 ±0,18	2,96 ±0,38	1,188	0,154
Therap 5% (m/m)[a]	4,00 ±0,13	4,37 ±0,10	1,470	0,301
Viva 5% (m/m)[a]	5,10 ±0,40	4,47 ±0,17	0,264	0,481
Therap 10% (m/m)[a]	11,00 ±0,27	9,86 ±0,55	0,762	0,950
Cos 10% (m/m)[b]	10,40 ±0,21	11,03 ±0,11	0,950	0,490
Nutra 10% (m/m)[b]	11,10 ±0,20	11,30 ±0,08	0,554	0,991

[c:] Média ± Desvio Padrão (D.P.), n=3;

[d]: Valores críticos de t ao nível de confiança de 95%;

Os resultados obtidos pelo método oficial e pelo proposto foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste t de Student, com nível de confiança 95%, e o teste F para verificar exatidão da metodologia. Os valores de t calculados para os as amostras de cremes hidratantes analisados não excederam os valores teóricos, indicando que não houve diferença significativa com relação à precisão e exatidão.

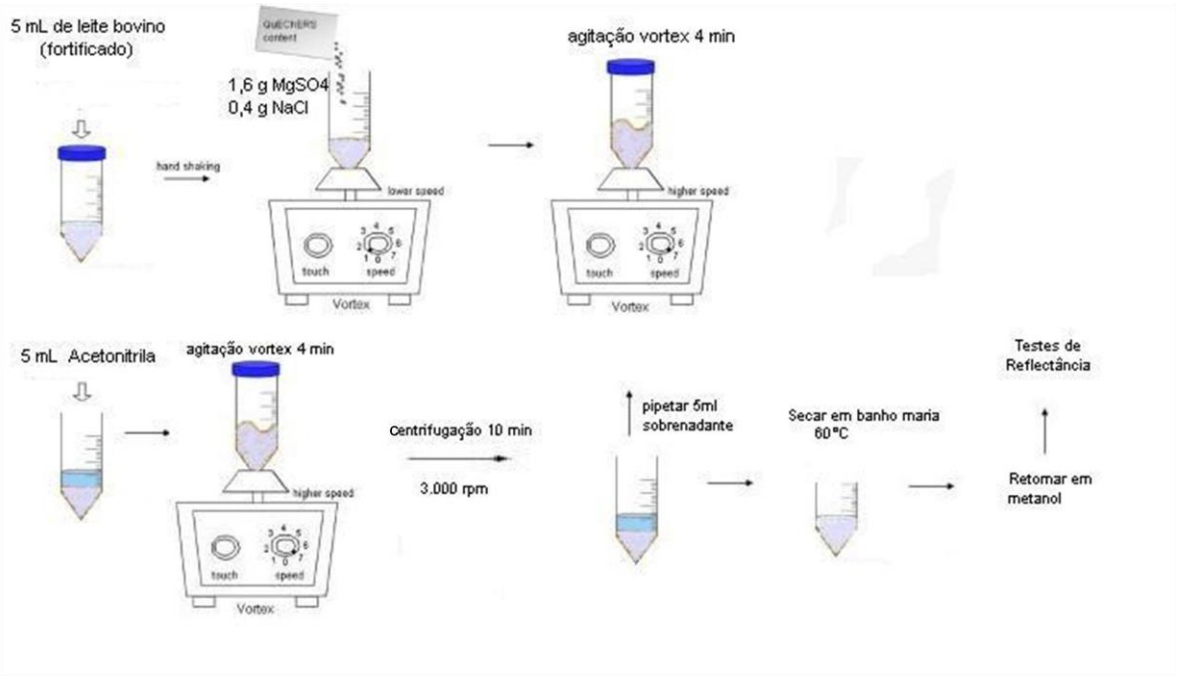
4.8. Aplicação do Método Proposto em amostras de leite bovino

4.8.1. Método de QUECHERS[3]

A determinação de ureia foi realizada primeiramente em uma amostra de leite bovino desnatado, o qual foi fortificado com concentração inicial de ureia de 25 ppm a 75 ppm. Foi realizado um *clean up* na amostra aplicando o método de QUECHERS (*quick, easy, cheap, effetive, rugged and save*) com o uso de acetonitrila como solvente e adição de $MgSO_4$ e NaCl para precipitação das proteínas por desnaturação e efeito *salt out*.

Procedimento: Foi pipetado 5 mL de leite fortificado com ureia em um tubo de centrifuga e adicionado 5 ml de acetonitrila. A seguir foi adicionado ao tubo 1,6 g de $MgSO_4$ e 0,4 g de NaCl, foi realizada agitação do tubo em vortex por 3 minutos e posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Pipetou-se 5 ml do sobrenadante e transferiu-se para um tubo de ensaio para secagem em banho-maria a 60° C. Retomou-se o sólido em metanol e realizaram-se os testes de reflectância com ambos os reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC) de acordo com a esquematização da figura 27. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 30 e 31.

Figura 27- Esquematização do processo de clean up e leitura de amostras



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 amostras de leite amostras antes do *clean up*. As quantidades de padrão adicionadas partem de 25 ppm aumentando 50, 100, 150 e 200 % da concentração de ureia presente nas amostras e considerando como branco o leite não fortificado, que sofreu o mesmo tratamento de *clean up* realizado com o leite fortificado conforme tabelas 30 e 31.

Tabela 30. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando QUECHERS

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas ($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,009	0,544	21,01	84,1
inicio + 50%	37,50	0,101	0,797	37,59	100,2
inicio + 100%	50,00	0,126	0,866	44,02	88,0
inicio + 150%	62,50	0,148	0,926	50,59	80,9
inicio + 200%	75,00	0,182	1,019	62,72	83,6

Tabela 31. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando QUECHERS

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas ($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,034	0,487	18,42	73,7
inicio + 50%	37,50	0,055	0,537	20,66	55,1
inicio + 100%	50,00	0,093	0,627	25,40	50,8
inicio + 150%	62,50	0,132	0,719	31,41	50,3
inicio + 200%	75,00	0,146	0,752	33,89	45,2

Nas tabelas 30 e 31 temos descritos os valores de recuperação de ureia obtidos para o leite bovino desnatado. Os valores de recuperação para o reagente cromogênico p-DAB foram muito satisfatórios porem com o p-DAC não foram obtidos valores satisfatórios de recuperação, considerando-se a complexidade da amostra estudada.

4.8.2. Método de QUECHERS[3] variando volume da amostra

Procedimento: Foi pipetado 3 mL de leite fortificado com ureia e adicionado 7 ml de acetonitrila, foi adicionado ao tubo 1,6 g de $MgSO_4$ e 0,4 g de NaCl, foi realizada agitação do tubo em vortex por 3 minutos e posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Pipetou-se 5 ml do sobrenadante e transferiu-se para um tubo de ensaio para secagem em banho-maria a 60° C. Retomou-se o sólido em metanol e realizaram-se os testes de reflectância com ambos os reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC).

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 amostras de leite antes do *clean up*. As quantidades de padrão adicionadas partem de 25 ppm aumentando 50, 100, 150 e 200 % da concentração de ureia presente nas amostras e considerando como branco o leite não fortificado que sofreu o mesmo tratamento de *clean up* realizado com o leite fortificado tabelas 32 e 33.

Tabela 32. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB – Método de QUECHERS variando volume da amostra

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas ($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,015	0,561	21,83	87,3
inicio + 50%	37,50	0,089	0,764	34,84	92,9
inicio + 100%	50,00	0,115	0,836	41,15	82,3
inicio + 150%	62,50	0,155	0,945	52,88	84,6
inicio + 200%	75,00	0,195	1,056	68,24	91,0

Tabela 33. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC -– Método de QUECHERS variando volume da amostra

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas ($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,088	0,615	24,72	98,9
inicio + 50%	37,50	0,128	0,709	30,73	82,0
inicio + 100%	50,00	0,171	0,810	38,76	77,5
inicio + 150%	62,50	0,203	0,886	46,14	73,8
inicio + 200%	75,00	0,255	1,010	61,34	81,8

Nas tabelas 32 e 33 temos descritos os valores de recuperação de ureia obtidos para o leite bovino desnatado. Tais valores são muito satisfatórios pois obtivemos valores de recuperação maiores que 70%, considerando-se a complexidade da amostra estudada.

4.8.3. Método de QUECHERS variando volume da amostra concentração dos sais ($MgSO_4$ e NaCl)

Procedimento: Foi pipetado 3 mL de leite fortificado com ureia e adicionado 7 ml de acetonitrila, foi adicionado ao tubo 1,6 g de $MgSO_4$ e 0,8 g de NaCl, foi realizada agitação do tubo em vortex por 3 minutos e posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Pipetou-se 5 ml do sobrenadante e transferiu-se para um tubo de ensaio para secagem em banho-maria a 60° C. Retomou-se o sólido em metanol e realizaram-se os testes de reflectância com ambos os reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC).

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 amostras de leite amostras antes do *clean up*. As quantidades de padrão adicionadas partem de 25 ppm aumentando 50, 100, 150 e 200 % a concentração de ureia presente nas amostras e considerando como branco o leite não fortificado que sofreu o mesmo tratamento de *clean up* realizado com o leite fortificado conforme tabelas 34 e 35.

Tabela 34. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB variando a concentração de NaCl

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,017	0,572	22,10	88,4
inicio + 50%	37,50	0,085	0,753	34,05	90,7
inicio + 100%	50,00	0,129	0,871	44,77	89,5
inicio + 150%	62,50	0,145	0,925	49,64	79,4
inicio + 200%	75,00	0,175	1,002	60,13	80,2

Tabela 35. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC variando a concentração de NaCl

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,080	0,596	23,70	94,8
inicio + 50%	37,50	0,160	0,785	36,57	97,5
inicio + 100%	50,00	0,194	0,866	44,09	88,2
inicio + 150%	62,50	0,208	0,898	47,49	76,0
inicio + 200%	75,00	0,234	0,959	54,72	72,9

Nas tabelas 34 e 35 temos descritos os valores de recuperação de ureia obtidos para o leite bovino desnatado. Tais valores são muito satisfatórios, considerando-se a complexidade da amostra estudada porem não se obtém uma sensibilidade expressiva quando modificou-se a concentração do sal NaCl (0,4g para 0,8g) comparando-se com os resultados das tabelas 32 e 33 .

4.8.4. Método utilizando TCA[2]

Procedimento: Foi pipetado 3 mL de leite desnatado fortificado com ureia e adicionado 7 ml de TCA 20% (m/v) (Ácido Tricloroacético) para precipitação das proteínas nos leite, foi realizada agitação do tubo em vortex por 3 minutos e posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Pipetou-se 5 ml do sobrenadante e transferiu-se para um tubo de ensaio para secagem em banho-maria a 60° C. Retomou-se o sólido obtido em metanol e realizaram-se os testes de reflectância com ambos os reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC). Os resultados estão demonstrados na Tabela 35 e 36.

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 amostras de leite antes do *clean up*. As quantidades de padrão adicionadas partem de 25 ppm aumentando 50, 100 e 150 % da concentração de ureia presente nas amostras e considerando como branco o leite não fortificado conforme tabelas 36 e 37.

Tabela 36. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando TCA

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,028	0,597	23,75	95,0
inicio + 50%	37,50	0,081	0,741	33,06	88,1
inicio + 100%	50,00	0,137	0,895	47,10	94,2
inicio + 150%	62,50	0,159	0,955	54,12	86,6

Tabela 37. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando TCA

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
inicio	25,00	0,069	0,571	22,33	89,3
inicio + 50%	37,50	0,085	0,609	24,36	65,0
inicio + 100%	50,00	0,105	0,655	27,12	54,2
inicio + 150%	62,50	0,140	0,739	32,87	52,6

Nas tabelas 36 e 37 temos descritos os valores de recuperação de ureia obtidos para o leite bovino desnatado. Tais valores são muito satisfatórios pois obtivemos valores de recuperação maiores que 70% considerando-se a complexidade da amostra estudada.

4.8.5. Método de *clean up* utilizando metanol e sais

Procedimento: Foi pipetado 3 mL de leite fortificado com ureia e adicionado 7 ml de metanol, foi adicionado ao tubo 1,6 g de $MgSO_4$ e 0,8 g de NaCl para precipitação das proteínas nos leite, em seguida foi realizada agitação do tubo em vortex por 3 minutos e posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para realizar os testes de quantificação de ureia por reflectância com ambos os reagentes cromogênicos (p-DAB e p-DAC) as matrizes utilizadas foram: leite desnatado, leite integral, leite semi desnatado, leite em pó.

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 amostras de leite antes do *clean up:* leite desnatado (Tabelas 38 e 39), leite semi desnatado(Tabelas 40 e 41), leite integral(Tabelas 42 e 43), leite em pó (Tabelas 44 e 45). As quantidades de padrão adicionadas partem de 25 ppm aumentando 50, 100, 150 e 200 % da concentração de ureia presente nas amostras e considerando como branco o leite não fortificado conforme as tabelas abaixo.

Matriz: Leite desnatado

Tabela 38. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,048	0,652	26,95	107,8
inicio + 50%	37,50	0,081	0,743	33,20	88,5
inicio + 100%	50,00	0,119	0,846	42,12	84,2
inicio + 150%	62,50	0,157	0,951	53,55	85,7
inicio + 200%	75,00	0,195	1,055	68,09	90,8

Tabela 39. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,064	0,559	21,73	86,9
inicio + 50%	37,50	0,113	0,673	28,27	75,4
inicio + 100%	50,00	0,167	0,802	38,00	76,0
inicio + 150%	62,50	0,195	0,867	44,17	70,7
inicio + 200%	75,00	0,256	1,013	61,79	82,4

Matriz: Leite Semi desnatado

Tabela 40. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,054	0,668	27,93	111,7
inicio + 50%	37,50	0,056	0,674	28,34	75,6
inicio + 100%	50,00	0,084	0,749	33,69	67,4
inicio + 150%	62,50	0,134	0,888	46,31	74,1
inicio + 200%	75,00	0,165	0,972	56,21	75,0

Tabela 41. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,062	0,553	21,46	85,8
inicio + 50%	37,50	0,082	0,601	23,97	63,9
inicio + 100%	50,00	0,125	0,703	30,29	60,6
inicio + 150%	62,50	0,195	0,869	44,33	70,9
inicio + 200%	75,00	0,215	0,915	49,34	65,8

Matriz: Leite Integral

Tabela 42. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,053	0,666	27,81	111,2
inicio + 50%	37,50	0,061	0,687	29,19	77,8
inicio + 100%	50,00	0,092	0,772	35,51	71,0
inicio + 150%	62,50	0,119	0,846	42,04	67,3
inicio + 200%	75,00	0,136	0,894	47,04	62,7

Tabela 43. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,057	0,542	20,88	83,5
inicio + 50%	37,50	0,074	0,583	22,95	61,2
inicio + 100%	50,00	0,141	0,740	32,98	66,0
inicio + 150%	62,50	0,175	0,821	39,69	63,5
inicio + 200%	75,00	0,201	0,883	45,81	61,1

Matriz: Leite e pó

Tabela 44. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAB utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas(ppm)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,050	0,657	27,23	108,9
inicio + 50%	37,50	0,070	0,713	30,97	82,6
inicio + 100%	50,00	0,089	0,764	34,84	69,7
inicio + 150%	62,50	0,107	0,812	38,96	62,3
inicio + 200%	75,00	0,157	0,951	53,55	71,4

Tabela 45. Validação do Método Proposto por Adição de Padrão e Recuperação utilizando p-DAC utilizando metanol

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	$A_{r(médio)}$	log {[ureia(mol/l)]*10^4}	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Inicio	25,00	0,050	0,525	20,10	80,4
inicio + 50%	37,50	0,074	0,581	22,86	61,0
inicio + 100%	50,00	0,133	0,720	31,52	63,0
inicio + 150%	62,50	0,144	0,748	33,59	53,7
inicio + 200%	75,00	0,171	0,810	38,76	51,7

Através dos resultados obtidos para a metodologia que utiliza metanol e sais para *clean up* da amostra e avaliando as diversas amostras de leite analisadas nas tabelas acima Obteve-se valores muito satisfatórios, considerando-se a complexidade da amostra estudada os valores de recuperação para o p-DAB foram superiores a 70% evidenciando a seletividade, sensibilidade do método.

Comparando as metodologias que utilizada metanol e sais na etapa de *clean up* com as demais metodologias supramencionadas, temos as seguintes vantagens:

- resposta de recuperação melhor utilizando p-DAB;
- economia energética pois não é necessária a etapa de evaporação e retomada de solvente;
- maior simplicidade
- maior rapidez de analise, cerca de 40 min.

4.8.6. Validação do método proposto para amostras de leite bovino através de comparação com o método oficial (Kjeldahl)[3]

A quantificação de ureia das amostras de leite bovino foi realizada em conformidade com a norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993)[2]. Empregou-se o método Kjeldahl da AOAC[3,64]. Todos os reagentes empregados

foram de grau analítico (P.A.) e a balança analítica empregada encontrava-se calibrada e a água empregada era deionizada e destilada.

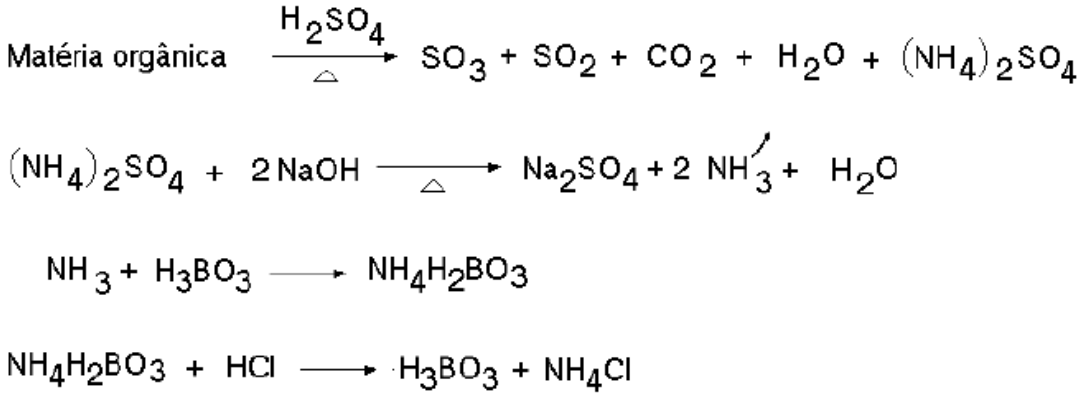
Procedimento: Pesagem do leite para determinação da ureia, uma alíquota correspondente a 20 mL de amostra foi pesada sobre um Erlenmeyer e adicionada de 80 mL de solução de ácido tricloroacético 12% m/v também analítica e exatamente pesados. Procedeu-se agitação manual leve com movimentos circulares, e aguardou-se no mínimo 5 minutos para precipitação das proteínas. Todo o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido para um funil de vidro contendo um papel de filtro qualitativo, e realizada a filtração completa. O filtrado foi recolhido em frasco de vidro e devidamente vedado com tampa . Os procedimentos de obtenção do filtrado foram realizados em triplicata.

Os filtrados representativos das amostras fortificadas com ureia foram pipetados uma alíquota de 20 mL de cada um deles foi analítica e exatamente pesada e transferida para os respectivos balões de digestão. Sobre a porção de amostra e em capela de exaustão foram adicionados 12,0 gramas de sulfato de potássio, 1,0 mL de solução de sulfato de cobre penta-hidratado 5% (m/v) e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Realizou-se agitação leve dos balões com movimentos circulares para permitir mistura dos reagentes adicionados ao filtrado. Em capela de exaustão, os balões foram mantidos em refluxo 350°C por 2,5 horas (tempo de digestão total). Em seguida os balões foram mantidos na capela de exaustão para serem naturalmente resfriados à temperatura ambiente, foi adicionada água deionizada destilada para lavagem das paredes internas dos tubos e solubilização dos cristais formados, perfazendo um total de 85 mL de água deionizada por tubo, aguardando-se em seguida resfriamento à temperatura ambiente.

O processo de destilação foi realizado com a adição de 70 mL de água deionizada, 65 mL de solução de hidróxido de sódio 40% m/m e destilação suficientes para produzir entre 150 e 200 mL de destilado. Os tubos de digestão foram bem acoplados ao equipamento e realizada a destilação. O destilado foi recolhido em frasco erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 50 mL de solução de ácido bórico a 4% m/v adicionado de indicadores de pH vermelho de metila e verde de bromocresol em uma concentração final de 5,0 x 10^{-5} g/50 mL e 25,0 x 10^{-5} g/50 mL. A solução receptora inicialmente vermelha adquiria coloração

verde azulada com a recepção do destilado contendo amônia. A solução obtida foi titulada contra solução volumétrica de ácido clorídrico de concentração de 0,01 mol.L^{-1} com fator de correção conhecido. A bureta empregada foi com sensibilidade ao centésimo do mililitro e o ponto de viragem foi considerado aquele em que se observou o primeiro traço de coloração rosa em substituição à coloração verde. As equações químicas que explicam o processo de mineralização do nitrogênio são demonstradas pela Figura 28.

Figura 28- Representação da conversão da matéria orgânica nitrogenada em sulfato de amônio, da reação que ocorre de liberação de amônio em meio alcalino e do recebimento do amônio destilado em ácido bórico no método de Kjeldahl[3,64]



Fonte: Gomes (1996) e Silva (1990) modificado.

Na determinação do teor em NNP das amostras empregou-se a fórmula definida pela norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), demonstrada pela equação 4.

$$\%\ NNP\ (\%\ m/m) = \frac{1{,}4007\ (Vs - Vb)\ M}{(W_f \times W_m) / (W_t - 0{,}065\ W_m)}$$

(Equação 4)

Vs	Volume, em mililitros, da solução volumétrica padronizada de ácido usada na titulação da amostra;
Vb	Volume, em mililitros, da solução volumétrica padronizada de ácido usada no teste branco;
M	Molaridade exata, com quatro casas decimais, da solução volumétrica padronizada de ácido usada = 0,01 x Fc;
Fc	Fator de correção da solução de HCl 0,01 mol/L;
Wf	Massa em gramas de 20 mL do filtrado;
Wm	Massa em gramas do leite amostrado;.
Wt	Massa em gramas do leite amostrado mais a massa de solução de ácido tricloroacético adicionada.

Os valores de concentração e volume gasto na titulação obtidos através do método oficial para as diferentes amostras de leite estão descritos nas tabelas 46, 47, 48, foram realizados estudos de recuperação através do método de adição de padrão. Nestes estudos, quantidades conhecidas de ureia (padrão analítico) foram adicionadas às amostras de leite antes do *clean up:* leite desnatado, leite semi desnatado, leite integral, leite em pó. As quantidades de padrão adicionadas partem de 25 ppm aumentando 50, 100, 150 da concentração de ureia presente nas amostras e considerando como branco o leite não fortificado.

Tabela 46- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite desnatado através do método oficial

n=3	**conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)**	**Volume gasto titulação**	**conc. Obtidas($mg.L^{-1}$) (média)**
Branco	---	1,57	---
inicio	25,00	2,27	26,4
inicio + 50%	37,50	2,53	36,8
inicio + 100%	50,00	2,87	48,0
inicio + 150%	62,50	3,30	64,0

Tabela 47- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite integral através do método oficial

n=3	**conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)**	**Volume gasto titulação**	**conc. Obtidas($mg.L^{-1}$) (média)**
Branco	---	2,92	---
inicio	25,00	3,57	27,0
inicio + 50%	37,50	3,87	37,7
inicio + 100%	50,00	4,35	54,7
inicio + 150%	62,50	4,73	69,3

Tabela 48- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite semi desnatado através do método oficial

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	Volume gasto titulação	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$) (média)
Branco	---	2,53	---
inicio	25,00	3,23	27,7
inicio + 50%	37,50	3,53	38,9
inicio + 100%	50,00	3,83	48,4
inicio + 150%	62,50	4,23	63,2

Tabela 49- Resultados obtidos da concentração de ureia em leite em pó através do método oficial

n=3	conc. Ureia ($mg.L^{-1}$)	Volume gasto titulação	conc. Obtidas($mg.L^{-1}$) (média)
Branco	---	1,23	---
inicio	25,00	1,77	20,7
inicio + 50%	37,50	2,13	34,2
inicio + 100%	50,00	2,48	48,1
inicio + 150%	62,50	2,93	65,4

Através dos resultados obtidos no método oficial foi construída a tabela 50 e 51 para validação do método fazendo um comparativo com a metodologia desenvolvida com a metodologia oficial.

Tabela 50- Comparativo entre Método proposto (p-DAB) e método oficial

Amostras n=3	ureia adicionada(mg.L^{-1})	p-DAB		Método oficial Kjeldahl		TEST t (2,78)d	TEST F (19,00)d
Leite Desnatado	25,0	26,95	±1,05	26,40	±3,77	0,3997	12,8915
	37,5	33,20	±1,35	36,80	±2,20	0,3108	2,6557
	50,0	42,12	±1,34	48,00	±7,38	0,1330	22,1121
	62,5	53,55	±1,41	64,00	±2,13	0,1007	2,2820
Leite Semi Desnatado	25,0	27,93	±1,08	27,70	±3,96	0,4699	13,4444
	37,5	28,34	±1,18	38,90	±3,89	0,2049	10,8676
	50,0	33,69	±1,11	48,40	±0,58	0,1010	0,2730
	62,5	46,31	±1,20	63,20	±1,15	0,2010	0,9184
Leite Integral	25,0	27,81	±1,67	27,00	±2,08	0,4722	1,5513
	37,5	29,19	±1,41	37,70	±1,99	0,2011	1,9919
	50,0	35,51	±1,20	54,70	±2,91	0,1002	5,8806
	62,5	42,04	±1,23	69,30	±2,91	0,2010	5,5973
Leite em pó	25,0	27,23	±1,43	20,70	±2,24	0,1034	2,4537
	37,5	30,97	±1,30	34,20	±3,81	0,1167	8,5894
	50,0	34,84	±1,18	48,10	±1,92	0,2002	2,6475
	62,5	38,96	±1,28	65,40	±3,85	0,2011	9,0469

[c:] Média ± Desvio Padrão (D.P.), n=3;

[d]: Valores críticos de t ao nível de confiança de 95%;

Tabela 51- Comparativo entre Método proposto (p-DAC) e método oficial

Amostras n=3	ureia adicionada(mg/L)	p-DAC		Método oficial Kjeldahl		TEST t (2,78)d	TEST F (19,00)d
Leite Desnatado	25,0	21,73	±1,24	26,40	±3,77	0,0873	9,2436
	37,5	28,27	±1,87	36,80	±2,20	0,0231	1,3841
	50,0	38,00	±1,50	48,00	±5,38	0,0823	17,6464
	62,5	44,17	±1,43	64,00	±2,13	0,3019	2,2186
Leite Semi Desnatado	25,0	21,46	±1,34	27,70	±3,96	0,0614	8,7333
	37,5	23,97	±1,13	38,90	±3,89	0,0105	11,8507
	50,0	30,29	±1,36	48,40	±0,58	0,2001	0,1819
	62,5	44,33	±1,46	63,20	±1,15	0,2012	0,6204
Leite Integral	25,0	20,88	±1,16	27,00	±2,08	0,3328	3,2152
	37,5	22,95	±1,08	37,70	±1,99	0,3032	3,3951
	50,0	32,98	±1,24	54,70	±2,91	0,4027	5,5073
	62,5	39,69	±1,57	69,30	±2,91	0,3012	3,4355
Leite em pó	25,0	20,10	±1,47	20,70	±2,24	0,4773	2,3220
	37,5	22,86	±1,17	34,20	±3,81	0,1190	10,6042
	50,0	31,52	±1,25	48,10	±1,92	0,2028	2,3593
	62,5	33,59	±1,71	65,40	±3,85	0,3032	5,0691

[c:] Média ± Desvio Padrão (D.P.), n=3;

[d]: Valores críticos de t ao nível de confiança de 95%;

Analisando as tabelas 50 e 51 observam-se os desvios-padrão de 0,5 a 7,38 (Tabela 50) e 0,08 a 7,38 (Tabela 51). Os resultados obtidos pelo método oficial e pela metodologia proposta foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste t de Student, com nível de confiança 95%. Os valores de t calculados para as amostras de leite analisados não excederam os valores teóricos, indicando que não houve diferença significativa com relação à precisão e exatidão entre os métodos assim com os valores de teste F que verificam a exatidão não ultrapassaram os valores teóricos.

4.8.7. Considerações finais das metodologias para cada matriz

Analisando os reagentes cromogênicos e processos de *clean up* frente as diferentes matrizes temos:

CREMES HIDRATANTES

Tempo total para analise (por amostra):

Método proposto (p-DAB e p-DAC): 20 min

Método oficial: 270 min

Maior sensibilidade : p-DAC

Para amostras de creme hidratante o reagente cromogênico com apresentou melhores valores de recuperação e melhor sensibilidade foi o p-DAC, utilizando o método de *clean up* que solubiliza em metanol a amostra de creme com posterior sonicação. Fazendo um comparativo com o método oficial, a metodologia desenvolvida que faz a combinação de spot test reflectância difusa obteve uma rapidez efetiva, cerca de 10 vezes maior para analise de cada amostra, oferecendo riscos mínimos ao analista, pois no método desenvolvido não temos etapas de aquecimento e uso de soluções de ácidos concentradas.

LEITE BOVINO

Tempo total para analise (por amostra):

Método proposto (p-DAB e p-DAC): 45 min

Melhor Clean up : metanol com sais

Método oficial: 320 min

Maior sensibilidade : p-DAB

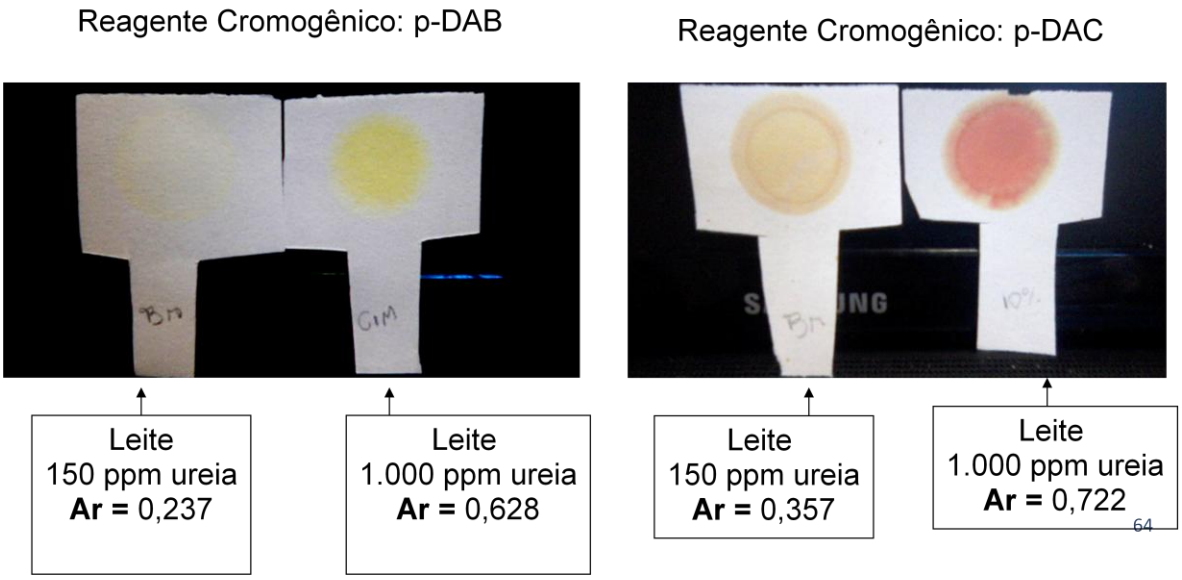
Para amostras de leite bovino o reagente cromogênico que apresentou melhores valores de recuperação e melhor sensibilidade foi o p-DAB, utilizando o método de *clean up* metanol com sais, para precipitação das proteínas e posterior analise. A vantagem desta metodologia que utiliza metanol e sais é que temos uma economia energética e maior rapidez de analise por amostra, pois pulamos a etapa de evaporação do solvente e retomada em metanol. Fazendo um comparativo com o método oficial, a metodologia desenvolvida que faz a combinação de *spot test* reflectância difusa obteve uma rapidez efetiva, cerca de 7 vezes maior na analise de cada amostra, oferecendo riscos mínimos ao analista, pois no método desenvolvido não temos etapas de aquecimento e uso de soluções de ácidos concentradas.

4.8.8. Testes rápidos em amostra de leite bovino fortificado (Fraude Rio Grande do Sul)

Foi realizado um teste rápido para comparativo visual e leitura de reflectância das amostras nas concentrações dos leites fraudados no Rio Grande do Sul.

Procedimento: foi fortificada a amostra de leite desnatado com concentração final de ureia similar a concentração das amostras de leite fraudadas em abril de 2013 no estado de Rio Grande do Sul[55,56,57,58] (1000 $mg.L^{-1}$). Foi realizado o *clean up* da amostra as leituras dos *spot test* utilizando as metodologias desenvolvidas. Os spot test obtidos estão ilustrados na Figura 29.

Figura 29- Spot tests com leite fortificado (1.000 $mg.L^{-1}$ ureia)



Conforme experimento da Figura 29 podemos observar visualmente a diferença de um leite com concentrações normais de ureia (150 $mg.L^{-1}$) e um leite fraudado (1.000 $mg.L^{-1}$) conforme esquemas de fraude ocorridos em abril deste ano no estado do Rio Grande do Sul.

Através deste teste rápido podemos verificar mais uma vantagem da metodologia desenvolvida, que é o *screening* rápido de amostras de leite, o que possibilita o desenvolvimento de kits para analise sem o uso de aparelhos de alto custo (espectrofotômetro), se for verificado adulteração da amostra pelo teste rápido, a amostra poderá ser posteriormente analisada através da metodologia desenvolvia e com o auxilio de um espectrofotômetro quantificado os teores de ureia.

Capítulo 5. Conclusões

O método analítico desenvolvido neste trabalho e que faz da combinação Espectroscopia de Reflectância Difusa/ Spot test foi aplicado com sucesso na análise de amostras comerciais de cremes hidratantes e amostras de leite bovino (desnatado, semi desnatado, integral e leite em pó) apresentando boa sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão.

Adicionalmente o método desenvolvido proporciona simplicidade de execução, baixo custo de analise, rapidez, portabilidade (atribuídos ao fato de o equipamento ser portátil sendo possível analise “in situ”), além de baixo consumo de reagentes e quantidade mínima de resíduos gerados, estando em concordância com os princípios propostos pela Química Verde(“método ambientalmente mais amigável”).

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

1 BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13th ed. Whitehouse Station: The Merck, 1996. p. 1683.

2 RETZ, K. C.; STEELE, W. J. Acid precipitation of protein in the presence of triton X-100 and deoxycholate. **Analytical Biochemistry**, v. 79 n. 1/2, p. 457-461, 1977.

3 GOMES, J. C. **Análise de alimentos**. Viçosa: Ed. UFU, 1996. p. 126.

4 BOJIC, J.; RADOVANOVIC, B.; DIMITRIJEVIC, J. Spectrophotometric determination of urea in dermatologic formulations and cosmetics. **Analytical Sciences**, v. 24, p. 769-774, 2008.

5 IIDA, Y.; IKEDA, M.; AOTO, M.; SATOH, I. Fluorometric determination of urea in alcoholic beverages by using an acid urease column-FIA system. **Talanta**, v. 64 n. 5, p. 1278-1282, 2004.

6 PEREZ, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.) **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001. p. 30-45.

7 CAMPOS, J. P. et al. (Ed.). **TIETZ fundamentos de química clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 558.

8 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. **Quimica Nova**, v. 24 n. 2, p. 191-194, 2001.

9 GRABOWSKA, I. et al. Miniaturized module with biosensors for potentiometric determination of urea. **Microchimica Acta**, v. 164, n. 3/4, p. 299-305, 2009.

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

11 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.

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 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.

14 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.

15 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.

16 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.

17 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.

18 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.

19 CLINE, R. E.; FINK, R. M. Investigation of color reaction between p-dimethylaminobenzaldehyde and urea or ureido acids. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1 p. 47-52, Jan.1956.

20 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.

21 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.

22 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.

23 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.

24 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.

25 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.

26 DALLET, 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.

27 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.

28 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.

29 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.

30 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.

31 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.

32 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.

33 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.

34 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.

35 AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000, Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e outros com abrangência neste contexto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, ago. 2000. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79_2000.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2013.

36 AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2013.

37 DEE B. W. **Cosmetic ingredient review**. Washington: Compendium, 2002. p. 265-266.

38 RIVITTI, S. **Dermatologia básica**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 1033.

39 BONIFAZ, A.; IBARRA, G. Onychomycosis in children: treatment with bifonazole-urea. **Pediatric Dermatology**, v. 17 n. 4, p. 310-314, Aug. 2000.

40 ARENAS, R.; RUIZ-ESMENJAUD, J. Onicomicose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 2, p. 225-232, Apr. 2004.

41 ESTETIC DERM. **Composição da pele**. 2013. Disponível em: <http://www.esteticderm.com.br/artigos/hidratar.htm>. Acesso em: 05 de nov. 2013.

42 BARBANO, D. M.; CLARCK, J. L.; DUNHAM, C. E.; FLEMING, J. R. Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, n. 74, p. 849-859, 1990.

43 BRUCKMAIER, R. M.; ROTHENANGER, E.; BLUM, J. W. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. **Veterinary Medicine Czech**, v. 49, p. 283-290, 2004.

44 BURCHARD, J. F.; BLOCK, E. Nutrição do gado leiteiro e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais**...Curitiba: Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 16-19.

45 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, 18 set, 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção I, p. 13-22. Disponível em: <http://www.qualidadedoleite.com.br/hd/arquivos/IN51de2002_leitebnormas.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2013.

46 CARVALHO, L. de A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. **Mercados e comercialização**: mercado de leite e derivados. Juiz de Fora: EMPRAPA Gado de Leite, 2002. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/mercados.html>. Acesso em: 14 jun. 2005.

47 BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ranking dos produtos das exportações**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/BALANCA_COMERCIAL/BALANCA_COMERCIAL_NOVA/01%20A%2008%20 -%20RANKING%20- %20PRODUTOS%20NCM.XLS> . Acesso em: 18 jan. 2006.

48 WATTIAUX, M. **Dairy essentials**. Madison: Babcock Institute for International Dairy Research and Development. Disponível em: <http://www.babcock.wisc.edu/downloads /de/01 a 35.en.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2006.

49 NICKERSON, S. C. Milk production: factors affecting milk composition. In: HARDING. F. **Milk quality**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. v. 1, p. 3-23.

50 NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Percentages of protein and nonprotein nitrogen with varying fat and somatic cells in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 5, p. 1257-1262, 1985.

51 DePETERS, E. J.; CANT, J. P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2043-2070, 1992.

52 BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acesso em: 05 nov. 2013.

53 DePETERS, E. J.; FERGUSON, J. D.; BAKER; L. D. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. In: SYMPOSIUM ON PROTEIN DEFINITION, 1., 1993. Minneapolis: **Proceedings** ... [S. l.]: International Dairy Federation, 1993. p. 7-31.

54 MEYER, P. M. **Fatores não nutricionais que afetam as concentrações de nitrogênio uréico no leite**. 2003. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

55 ULTIMO SEGUNDO BRASIL. **Empresas fazem recall de 900 mil litros de leite contaminado por ureia**. 2013. Disponível em: <http://ultimosegundo.ig.com.br/brasil/2013-06-01/empresas-fazem-recall-de-900-mil-litros-de-leite-contaminado-por-ureia.html>. Acesso em: 05 nov. 2013.

56 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. **Anvisa avalia risco da presença de formol e ureia no leite**. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2013+noticias/anvisa+avalia+risco+da+presenca+de+formol+e+ureia+no+leite>. Acesso em: 05 nov. 2013.

57 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. **Informe Técnico**, n. 53. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/903a10804f8f08cb8357f79a71dcc661/Informe+T%C3%A9cnico+53_risco+de+ureia+e+formol+no+leite.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 05 nov. 2013.

58 G1-RIO GRANDE DO SUL. **Indústria não faz teste para detectar nível de ureia no leite, diz especialista**. 2013. Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2013/05/industria-nao-faz-teste-para-detectar-nivel-de-ureia-no-leite-diz-especialista.html> . Acesso em: 05 nov. 2013.

59 UOL NOTICIAS. **Fórmula para fraudar leite no Sul era vendida a R$ 10 mil, diz Promotoria**. 2013. Disponível em: <http://noticias.uol.com.br/cotidiano/ultimas-noticias/2013/05/11/formula-para-fraudar-leite-no-sul-era-vendida-a-r-10-mil-diz-mp.htm>. Acesso em: 05 nov. 2013.

60 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. São Paulo: LTC, 2001. p. 435-444.

61 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 124-125.

62 NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors and biosensors for food safety and security applications. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 118, p. 317-322, 1993.

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

64 SILVA, D. J. Dosagem do nitrogênio total pelo método Kjeldahl. In: SILVA, D. J. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 2. ed. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1990. p. 24-38.

65 WENDLANT, W. W.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience Publishers, 1966. p. 297.

66 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Green chemistry**. 2013. Disponível em: <http://www.epa.gov/greenchemistry>. Acesso em: 20 maio 2009.

67 CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando Statistica®**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003. p. 260.

68 BARROS, B. N.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1995.

69 INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk determination of nitrogen content**. International Dairy Federation IDF Standard 20B. Brussels, 1993. p. 12.