

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Relatório final

Bolsa de pós-doutorado

**Desenvolvimento de dispositivos portáteis e de baixo custo obtidos por
impressão 3D aplicados em amostras de alimentos, bebidas e águas
contaminadas**

Capes Print Edital 41/2017 processo # 88887.891984/2023-00

Vigência 01/11/2023 até 31/10/2024

Dra. Saily Cristina Ayala Durán

Pós-doutoranda

Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Supervisor

Araraquara

2025

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE OS 12 MESES DE BOLSA DE PÓS-DOUTORADO

ARTIGOS PUBLICADOS

1. Irikura, K., Rojas-Mantilla, H. D., **Ayala-Durán, S. C.**, Souza, J. C, de, Rossini, E. L., Salazar-González, R., Zanoni, M. V. B. (2025). Performance of Ti/TiO₂-ZIF-67 photoanode under LED irradiation applied to the photoelectrodegradation of the antidepressant venlafaxine (VEN) in municipal wastewater effluent, *Journal of Environmental Management*, v. 373, pp. 123460. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.123460>.
2. **Ayala-Durán, S.C.**, Rojas-Mantilla, H. D., Pérez-Moya, M., Pupo Nogueira, R. F. (2024). Enhanced degradation of venlafaxine induced by Fe₂O₃/CeO₂ heterostructures through the thermal transformation from type I to direct Z-scheme in heterogeneous photo-Fenton, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 12, n. 6, pp. 114401. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114401>.
3. Ferreira, K. C., Rodrigues, T., Isquibola, G., **Ayala-Durán, S. C.**, Merib, J. O., Gonzalez, M. H., Anderson, J. L., Lima Gomes, P. C. F. (2024). Determination of parabens and bisphenol A in sludge samples using hydrophobic deep eutectic solvents by gas chromatography coupled to mass spectrometry and sample introduction via pyrolyzer, *Microchemical Journal*, v. 207, pp.112057. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112057>.
4. Lamarca, R. S., Ferreira, S. dos S., Paganini, É. R., Ferreira, N. dos S., **Ayala-Durán, S. C.**, Isquibola, G., Gomes, P. C. F. L., Amaral, C. D. B., Magnani, M., Franco, D. F., Fernandes, J. O., Cunha, S. C., Gonzalez, M. H. (2024) Sustainable cadmium extraction from sewage sludge samples: A novel approach with hydrophobic deep eutectic solvents and ultrasound-assisted

extraction (HDES-UAE) prior to ICP-MS analysis, Journal of Molecular Liquids, v. 398, pp. 124264. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124264>.

ARTIGOS SUBMETIDOS

1. Rojas-Mantilla H. D., Mauriz, P. P. †, **Ayala-Durán**, S. C., Lima Gomes P. C. F., Zaroni, M. V. B., Brito, J. F. (2025). Evaluation of Venlafaxine (VNF) degradation under sunlight and UV/Vis LED irradiation: effects on kinetics and transformation products in urban effluents using $WO_3/BiVO_4$ heterostructure. ACS Applied Materials & Interfaces. **Data:** 23/01/2025.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

Evaluation of semiconductor-modified membranes applied in the simultaneous filtration/degradation of emerging contaminants. Hernán Dario Rojas-Mantilla, **Saidy Cristina Ayala-Durán**, Maria Valnice Boldrin Zaroni. Apresentação de pôster por Rojas-Mantilla H.D, em CIPOA - VI Iberoamerican Conference on Advanced Oxidation Technologies, em Florianopolis/ Santa Catarina- Brasil, de 7 a 11 de Outubro, 2024.

Sustainable Cadmium Extraction in Sewage Sludge Samples by Hydrophobic Deep Eutectic Solvents (HDES) and Ultrasound-Assisted Extraction. Rafaela Silva Lamarca, Sabrina dos Santos Ferreira, **Saidy Cristina Ayala Durán**, **Nathália dos Santos Ferreira**, Douglas Faza Franco and Mario Henrique Gonzalez. Apresentação de pôster por Rafaela Silva Lamarca, no XXII B-MRS Meeting, em Santos-SP, de Setembro 29 até 3 Outubro, 2024.

CO-ORIENTAÇÃO DE ALUNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Aluna: Natália Dos Santos Trindade. **Desenvolvimento de dispositivo a partir de manufatura aditiva para determinação de ureia em amostras de leite e**

cosméticos. Projeto: FAPESP 2023/12972-9. **Período de vigência:** 01/12/2023 a 30/11/2024.

OUTRAS ATIVIDADES

Cursos de curta duração

“Curso LC- LC/MS” AGILENT Tecnologia do Brasil, Março 07, 2024, 8 h, UFSCar-São Carlos.

Curso de curta duração (ministrado)

Workshop Sustenta & Habilidade – “Ações e Inovações em Química em Busca dos ODS”. Determinação de Ureia em amostras de leite usando um fotômetro 3D impresso. Ministrado por **Saidy Cristina Ayala-Durán** e Gabriel Piassalonga Baroffaldi. 8h, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus da Unesp. 11 novembro 2024, São José do Rio Preto/ SP.

Workshop

“I WORKSHOP DE IMPRESSÃO 3D (IWS3D)”, Universidade de São Paulo (USP), Grupo de Biopolímeros e Fotoquímica (IQSC/USP), 20 e 21 de junho, 2024, São Carlos (SP).

Workshop Sustenta & Habilidade – “Ações e Inovações em Química em Busca dos ODS”. Use of Hydrophobic Deep Eutetic Solvents (HDES) for Cadmium Extraction in Sewage sludge samples. Rafaela Silva Lamarca, Sabrina dos Santos Ferreira, Leandro dos Santos Silva, Thamilly Luiza Uzan, **Saidy Cristina Ayala-Durán**, Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, Clarice Dias Britto do Amaral, Douglas Faza Franco, Mario Henrique Gonzalez. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus da Unesp. 11 e 12 de novembro 2024, São José do Rio Preto/ SP.

Workshop Sustenta & Habilidade – “Ações e Inovações em Química em Busca dos ODS”. Determinação de Ureia em amostras de leite usando um fotômetro 3D impresso. Natalia do Santos Trindade, **Saidy Cristina Ayala-Durán**, Gabriel Piassalonga Baroffaldi, João Pedro Silva, Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus da Unesp. 11 e 12 de novembro 2024, São José do Rio Preto/ SP.

SUMÁRIO

Resumo do projeto	7
Resumo das atividades científicas desenvolvidas durante os 12 meses de pós-doutorado	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Reação colorimétrica para determinação da ureia	9
1.2. Impressão de dispositivos por manufatura aditiva.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1. Materiais	12
2.1.1. <i>Componentes eletrônicos</i>	12
2.1.2. <i>Fotômetro 3D impresso</i>	12
2.2. Preparo de amostras de leite.....	12
2.2.1. <i>Otimização do preparo de amostras e condições de reação</i>	12
2.3. Determinação de ureia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo linear de diodos (DAD).....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. Fotômetro 3D- impresso	13
3.2. Preparo de amostras de Leite	14
3.2.1. <i>pH com precipitação usando 10% HCl-EtOH</i>	14
3.2.2. <i>Efeito salting-out</i>	15
3.2.3. <i>Concentração e Volume e do reagente cromogênico p-DAC</i>	16
3.3. Perda de ureia por hidrólise.....	17
3.4. Curvas analíticas de ureia em leite integral e leite desnatado no espectrofotômetro e no fotômetro-3D	18
3.5. Testes de recuperação e precisão inter e intra-dia.....	19
3.6. Determinação de ureia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo linear de diodos (HPLC- DAD)	20
3.7. Testes de determinação de ureia utilizando diferentes tipos de leite	22
3.8. Análise estatística ANOVA, teste-t e teste-F, comparação entre os equipamentos espectrofotômetro, fotômetro-3D, e HPLC-DAD	23
CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS.....	25

Resumo do projeto

Dispositivos fotométricos desenvolvidos por meio da impressão 3D, permitem análises químicas rápidas, sensíveis e precisas, com uma ampla aplicabilidade em diversas amostras, a partir do fundamento da lei de Lambert-Beer. Estes dispositivos podem ser criados usando a manufatura aditiva, utilizando modelos virtuais e projetados nas necessidades individuais. Amostras de leite, frequentemente podem apresentar contaminação por com peróxido de hidrogênio, antioxidantes, amido e ureia entre outros. A ureia é especialmente utilizada para aumentar a quantidade de proteína, que diminui com a adição de água, para aumentar o rendimento, a presença no organismo humano pode ser tóxica e afetar órgãos como o cérebro, coração, músculos e pulmões. Este projeto teve como objetivo a determinação colorimétrica da ureia, em amostras de diferentes tipos de (leite integral, desnatada, semidesnatada e zero-lactose), utilizando o reagente cromogênico *p*-dimetilamino cinamaldeído (*p*-DAC), que junto com a ureia gera um complexo de coloração amarelada/alaranjada, a partir de um fotômetro impresso por manufatura aditiva, contendo componentes eletrônicos simples e baratos. A variável resposta será o valor da absorbância obtida a partir da resposta pela variável tensão (voltagem).

Palavras chaves: fotômetro, LEDs, Componentes eletrônicos, *p*-DAC

Resumo das atividades científicas desenvolvidas durante os 12 meses de pós-doutorado

Durante o período de 12 meses de bolsa de pós-doutorado Capes-Print, publiquei 4 artigos, um como autor principal e os outros 3 em colaboração, todos em fator de impacto entre 4,9 até 8,3, além de 1 artigo submetido em fator de impacto 8,5. Também neste período participei de 2 workshops, 1 em impressão 3D e outro sustentabilidade, 1 curso de curta duração, 1 curso ministrado em workshop, 2 participações em congressos internacionais. Coorientei 1 estudante de Iniciação científica (IC) com bolsa FAPESP, além de auxiliar na revisão e correção de relatórios, dissertações de diferentes alunos do grupo. O projeto foi desenvolvido em três passos principais. O primeiro foi a montagem e elaboração do fotômetro 3D impresso, montagem do circuito eletrônico e desenho - impressão. A segunda parte foi a avaliação das condições do preparo de amostra de leite (pH, salting-out, solvente), e o terceiro consistiu na determinação de ureia em amostras de leite utilizando o fotômetro 3D impresso e a comparação com método espectrofotômetro e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na determinação de curvas analíticas, determinação dos análises de reprodutibilidade, confiabilidade, análises de intra-ensaio (intra-dia), inter ensaios (inter dias) e exatidão.

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo industrial de produção do leite, podem acontecer contaminações das mais variadas origens (proteínas, água, gordura, e outras substâncias), as quais podem causar prejuízos à saúde dos consumidores finais. Tanto de forma direta, instantaneamente, quanto a partir da reação entre componentes presentes no produto, assim, fora do ambiente industrial, ou no cotidiano. De acordo com (Silva, F.; Vasconcelos, J.S.; Vasconcelos, 2017), entre os principais contaminantes do leite encontra-se a ureia, que pode ser usada como aditivo de leite cru, com o objetivo de recompor a porcentagem padrão de proteína necessária para o consumo, parâmetro fortemente alterado quando a fraude com diluição com água é realizada (Dules, 2019).

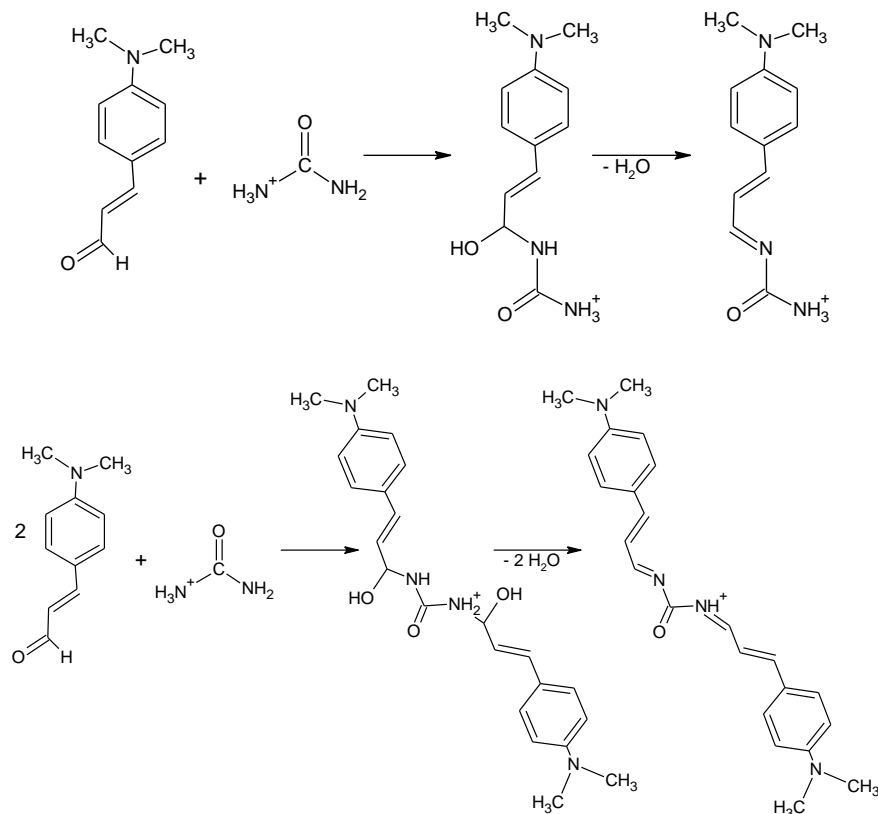
A ureia é um composto orgânico cristalino de fórmula molecular $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, solúvel em água, de coloração branca a incolora, não inflamável, com odor característico e potencialmente prejudicial à saúde humana, caso contato com quantidades elevadas (Ruy, 2011; Toledo *et al.*, 2017). A determinação de ureia pode ser feita por titulometria, cromatografia e espectrofotometria, sendo que as duas últimas técnicas necessitam de equipamentos específicos e robustos, assim como analistas treinados, elevando o custo por análise.

1.1. Reação colorimétrica para determinação da ureia

A ureia pode ser determinada com facilidade, a partir de reações de derivatização com agentes cromogênicos, entre os principais encontram-se o *p*-dimetilamino benzaldeído (*p*-DMAB) e o *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) (Toledo *et al.*, 2017). Na reação da ureia com o *p*-DAC o grupo carbonila presente na estrutura é condensado junto ao grupo amino protonado da ureia, formando um sal imínio (Gigante, 2011). As amins possuem um par de elétrons livres, advindo do átomo de nitrogênio de sua cadeia, dessa maneira, são agentes redutores e teoricamente interagem fortemente com espécies receptoras de elétrons, como o *p*-DAC. A Figura 1 apresenta o mecanismo sugerido para a reação deste reagente

com uma ou duas moléculas de ureia, produzindo um complexo de coloração amarela/alaranjada, que apresenta uma absorvância máxima em 530 nm.

Figura 1. Mecanismo de reação da ureia e *p*-DAC.



Fonte: Adaptado Gigante, (2011).

O uso do *p*-DAC foi reportado em estudos de determinação qualitativa (sim/não) espectrofotométrica de sulfonamidas em urina e leite bovino (Ruy, 2011), os autores relataram alta eficiência, rapidez e baixo consumo de reagentes, além de índices de recuperação altos (57 e 68 %), o método apresentou ótima linearidade entre 0,2 – 4,0 mg L⁻¹, com coeficientes de determinação ($R^2 > 0,998$).

Luiz *et al.*, (2019), utilizaram a interação entre o *p*-DAC e a bumetanida (grupo sulfamoiil) em meio ácido, na detecção de doping em esportes, a partir da análise de urina humana. Esta reação foi determinada utilizando um papel de filtro e determinado a partir de imagens digitais (RGB). A curva analítica apresentou linearidade entre 2,5 e 49,8 mg L⁻¹, com R^2 de 0,993 e recuperação entre 94 – 105%,

o método mostrou vantagens de portabilidade, alta sensibilidade e repetibilidade, problemas de efeito matriz nem interferentes foram reportados.

1.2. Impressão de dispositivos por manufatura aditiva

O baixo custo, assim como a liberdade na projeção de protótipos torna a obtenção de dispositivos mais eficientes (Nesterenko, 2020). Isso porque há a possibilidade de rápidos ajustes para adequação e modificações, segundo as necessidades que podem surgir ao longo do projeto, permitindo que a impressão 3D seja cada vez mais abrangente nas pesquisas da área de Química analítica, sendo publicados e descritos inúmeros estudos que fazem seu uso (Agrawaal; Thompson, 2021; Nesterenko, 2020; Wang; Pumera, 2021).

Os dispositivos manufaturados por deposição são construídos a partir da conversão da imagem virtual do objeto projetado, em um software do tipo computer-aided design (CAD), em um sinal compatível com o utilizado pela impressora. A técnica mais comumente usada para a obtenção do objeto físico é a modelagem por fusão e depósito (FDM), também conhecida de fabricação com filamento fundido (FFF). Ela faz uso de fios de materiais termoplásticos, ou polímeros, a partir da fusão desses materiais no bico extrusor.

Baumgartner; Freitag; Lendl, (2020), apresentaram um dispositivo de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, compatível com espectrômetro. O módulo foi impresso utilizando uma impressora FDM com filamento de PLA. O custo do dispositivo foi entre 360 e 600 €, mesmo sendo um pouco mas custoso, ainda assim representa um valor aproximadamente 50 vezes inferior ao de uma unidade comercial. O sistema mostrou alto potencial para aplicações que exigem alto rendimento de amostras ou manipulação de amostras complexas e com potencial risco biológico, como no caso de *Escherichia coli* e albumina sérica bovina. Os resultados mostraram baixos níveis de ruído, com curva analítica entre 2,0 – 10,0 mg L⁻¹, com R² de 0,999.

Nandeshwar; Mandal; Tallur, (2023), desenvolveram um sensor para a quantificação de ureia em amostras de leite com reagente colorimétrico *p*-DMAB. A

intensidade da cor é proporcional à quantidade de cromógeno produzido. O sistema de detecção óptica é de baixo custo, montado com componentes eletrônicos como LED azul, fotodiodo, amplificador de sinal elétrico, módulo de Bluetooth e microcontrolador Raspberry Pi RP2020. Os dados são transmitidos sem fio para um smartphone. O sensor demonstrou linearidade, com R^2 de 0,720, concentrações entre 0,1 - 0,7 mg mL⁻¹, o valor do dispositivo não foi reportado pelos autores.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O dispositivo fotométrico 3D-impresso foi constituído por componentes eletrônicos, especificamente selecionados para atingir os melhores resultados para de sinal analítica.

2.1.1. Componentes eletrônicos

Os componentes eletrônicos que constituem o dispositivo são simples e relativamente econômicos como microcontrolador ESP32, LED verde de alto brilho 3 mm (520 ± 30 nm), amplificador de sinal operacional OPA381, chave de ganho, potenciômetro de 10 kΩ, fotodiodo (BPW34), cubeta de plástico e cabo USB.

2.1.2. Fotômetro 3D impresso

As peças plásticas usadas foram impressas usando a impressora 3D GTMax 3D Core A3V2, tendo o Tritan (copoliéster) como material de filamento, e a impressão foi feita a 270 °C de temperatura de extrusão, 110 °C temperatura de mesa e velocidade de impressão de deposição do filamento foi de 70 mm s⁻¹.

2.2. Preparo de amostras de leite

2.2.1. Otimização do preparo de amostras e condições de reação

No preparo das amostras, foram testados diferentes tipos de leite UHT (Integral 3,0%, semidesnatado 1,0%, desnatado 0,5% e zero lactose 1,0% de gordura). Primeiramente, foi necessária a precipitação das proteínas (caseína)

presentes na matriz do leite. Para isso, foram testados solventes (acetonitrila, metanol, etanol), misturas de solventes, sais inorgânicos (CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl), diferentes concentrações de sais e variação de pH (HCl , H_2SO_4), além de volume e concentração do p-DAC, com o intuito de obter um sobrenadante límpido e claro e uma reação nas melhores condições de intensidade, reprodutibilidade e estabilidade.

2.3. Determinação de ureia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo linear de diodos (DAD)

Foi desenvolvido um método de quantificação de ureia utilizando HPLC-DAD (Shimadzu LC-10AT). O método usou um gradiente linear de 10 a 70 % em 7 min de acetonitrila (ACN) e ácido fórmico 0,1% (V/V), volume de injeção de 20 μL e vazão de 1,0 mL min^{-1} , comprimento de onda λ : 530 nm, Temperatura de forno 30 $^\circ\text{C}$, coluna Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x 100 mm, 5 μm , com coluna de guarda.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Fotômetro 3D- impresso

O fotômetro-3D possui dimensões 9,5 cm x 13 cm, os componentes eletrônicos encontram-se dentro de uma caixa impressa utilizando filamento ABS (Acrilonitrilo-butadieno-estireno) de cor preto (Figura 2). Além disso, foi desenvolvido um sketch (web service) em linguagem C++, que faz a conversão do sinal analógico para digital, obtendo a resposta do sinal analítico em mV (milivolts).

Figura 2. Fotografia do fotômetro 3D impresso, (a) vista superior (b) vista superior interna e (c) dispositivo em funcionamento.



Fonte: Autoria própria (2024).

A Tabela 1 mostra o preço total estimado do dispositivo, tendo em conta que a compra do filamento foi o mais caro, porém o filamento inteiro não foi gasto na sua totalidade o que permitiu a impressão de várias peças, sendo o custo total do dispositivo impresso atualizado de R\$ 100,0.

Tabela 1. Preço total estimado do dispositivo fotométrico

Componentes eletrônicos	Preço*(R\$)
LED UV verde alto brilho 5 mm	2,00
Microcontrolador ESP32	55,90
Resistores (Kit) 10 unid.	12,90
Potenciômetro de 10 kΩ	3,10
Fonte chaveada 12V	7,55
Interruptor push	6,56
Fotodiodo BPW34	8,64
Cubeta plástica (PS)	1,30
Amplificador operacional OPA381	2,10
PREÇO TOTAL ESTIMADO	100,05

Fonte: Autoria própria (2025).

*Preços estimados em Usinando, MakerHero e Amazon.br (20/01/2025).

3.2. Preparo de amostras de Leite

O matriz do leite apresenta uma coloração branca, certa turbidez, que podem afetar na leitura da absorbância, por isto é importante como primeira medida a precipitação das proteínas (caseínas) do leite. Sabe-se da literatura que o pH, salting-out, solventes podem auxiliar na precipitação.

3.2.1. pH com precipitação usando 10% HCl-EtOH

Utilizando uma concentração considerável de ureia adicionado diretamente no leite foram testados diferentes pH (3,75, 4,0, 5,0 e 6,0) usando 10% (V/V) HCl-EtOH e ajustado com NaOH (0,01 mol L⁻¹) após precipitação, centrifugação e filtração. Os resultados mostraram como o pH afeta a reação, sendo que o pH ideal está entre 3,75 - 4,0 (100 -150 µL 10% HCl-EtOH) para cada 10 mL do leite, em pH maiores do que isso, o sinal analítico começa a diminuir até que é afetado completamente no pH 6,0.

Solventes como acetonitrila (ACN), etanol (EtOH) foram testados para a precipitação, assim como a adição de H_2SO_4 , estes testes não foram obtidos resultados satisfatórios, já que ou não houve precipitação das proteínas, assim como quando adicionado o reagente dissolvido no mesmo solvente utilizado houve intensa precipitação, deixando o soro de leite, antes límpido, turvo. Provavelmente relacionado com a precipitação de sulfatos.

3.2.2. *Efeito salting-out*

A adição de diferentes sais para a precipitação de proteínas do leite está relacionado com o aumento da força iônica da solução, diminuindo a solubilidade das proteínas, onde os íons carregados dos sais competem pela água de hidratação das proteínas removendo-a. As proteínas desnaturam e se associam a outras, em vez de permanecerem na solução. Foi testado a adição direta de sais $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em diferentes proporções (10, 20 e 30% m/V). Após a adição de leite e agitação, foi adicionado HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$), seguido de centrifugação (4000 rpm/15 min) e filtração.

Foram comparados os aspectos visuais, volume de sobrenadante resultante e absorvância. O sal $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não apresentou boa precipitação em nenhuma das concentrações testadas, bem como a concentração 10% (m/V) em todos os casos, uma vez que a solução resultante não apresentava a separação das duas fases e apresentava alta turbidez. O NaCl resultou em uma solução límpida e bom sinal analítico, com adição de 20 e 30% (m/V), porém esta última apresentou restos de cristais na solução, após a centrifugação (sobressaturação). Para o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi observado que 20% (m/V) apresentava média turbidez e com 30% a solução se mostrava límpida e com bom sinal analítico. A separação das fases foi melhor obtida nas soluções com adição 30% de salting-out (m/V de leite) e com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, já que resultaram em soluções mais límpidas e maior volume de sobrenadante alcançado.

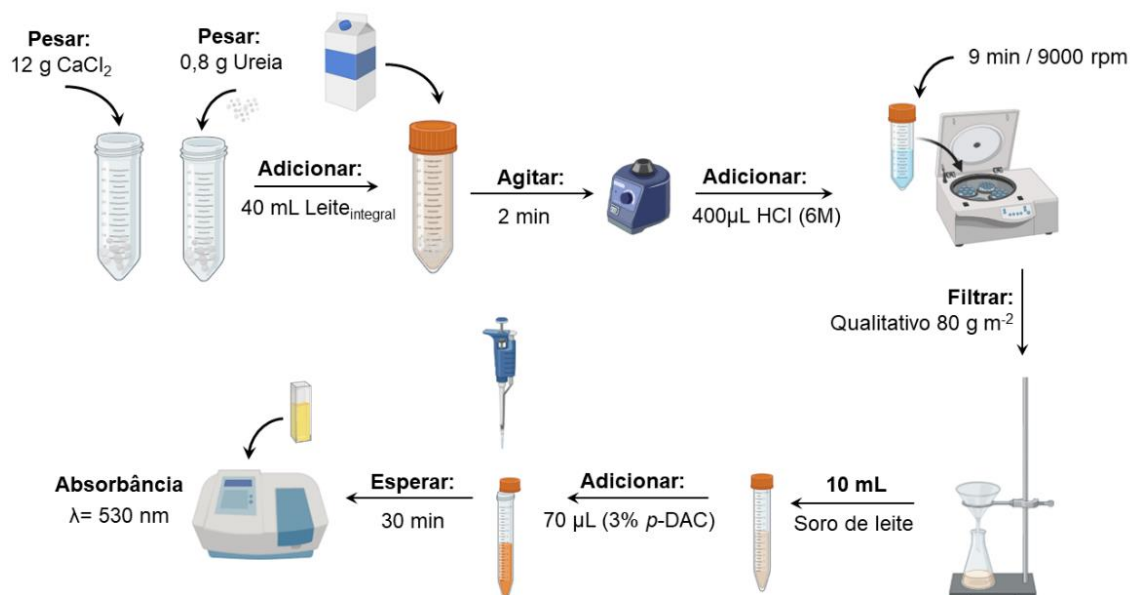
3.2.3. Concentração e Volume e do reagente cromogênico *p*-DAC

A concentração e o volume e a do reagente são necessários já que podem afetar na turbidez, e portanto no sinal analítico. Foram avaliados concentrações de 1,6, 3,0 e 5,0% de concentração de *p*-DAC, todos dissolvidos em solução de 0,5 mol L⁻¹ HCl/ EtOH, assim como o volume entre 70, 100, 500 µL.

Utilizando 1,6% *p*-DAC, era necessário a adição de mais de 300 µL para obter um bom sinal, porem mesmo nessa concentração e volume o sinal obtido foi relativamente baixo. Quando utilizadas concentrações de 5,0% *p*-DAC mesmo volumes pequenos 70 µL a solução mostra precipitação, aumentando a turbidez e mudando o valor do sinal, tendo dificuldade na medida. Portanto a melhor concentração foi de 3,0% *p*-DAC com volume de 70 µL, que consegue bom sinal analítico, sem precipitar nem o reagente nem a proteína restante após centrifugação.

Tendo em conta todas as variáveis otimizadas para obter as melhores condições do preparo de amostra a Figura 3 mostra os passos realizados no procedimento utilizado para a determinação de ureia no leite.

Figura 3. Procedimento padrão de preparo de amostra do leite para a determinação de ureia



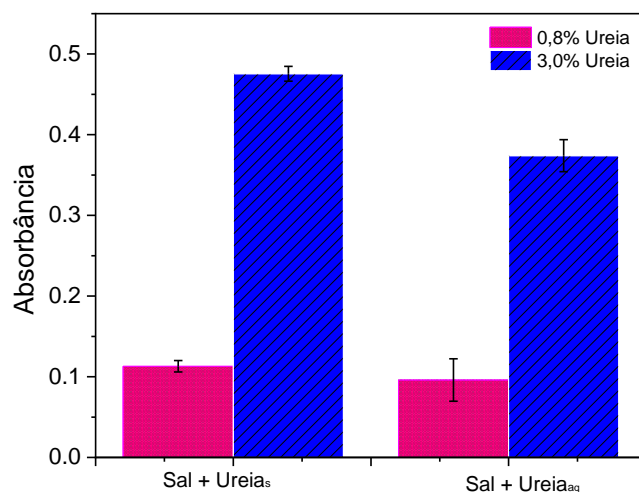
Fonte: Autoria própria (2024).

3.3. Perda de ureia por hidrólise

Para verificar se o preparo de amostra utilizado era adequado e se a ureia está sendo precipitada junto às proteínas do leite, o método desenvolvido (Figura 3) foi comparado com a adição da ureia a partir de uma solução aquosa de ureia 50 % (m/V), e sua adição realizada após a precipitação com sal em meio ácido. Foram testadas duas concentrações de ureia, 0,8% e 3,0 % (m/V). Foi observado que a adição conjunta (sal +ureia), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Ureia}_{(s)}$, foi a que alcançou maior valor de absorbância (0,475) na concentração mais alta de ureia. Enquanto a adição da solução de analito após precipitação, apresentou uma perda de 21,0 % do sinal analítico (0,374).

Para a concentração de 0,8% (m/V), o sinal apresentou menor diferença, sendo $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Ureia}_{(s)}$ (0,113) e $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Ureia}_{(aq)}$ (0,096). Neste caso, houve uma perda de 15 % (Figura 4). Um possível fator para a diferença de sinais obtidos é a perda de ureia por hidrólise. Dessa forma, o procedimento de preparo de amostra proposto é o que resulta em maiores valores de sinal analítico, assim como menor erro. Portanto, foi escolhido como procedimento padrão de preparo de amostra.

Figura 4. Avaliação de diferentes métodos de adição da ureia.



Fonte: Autoria própria (2024).

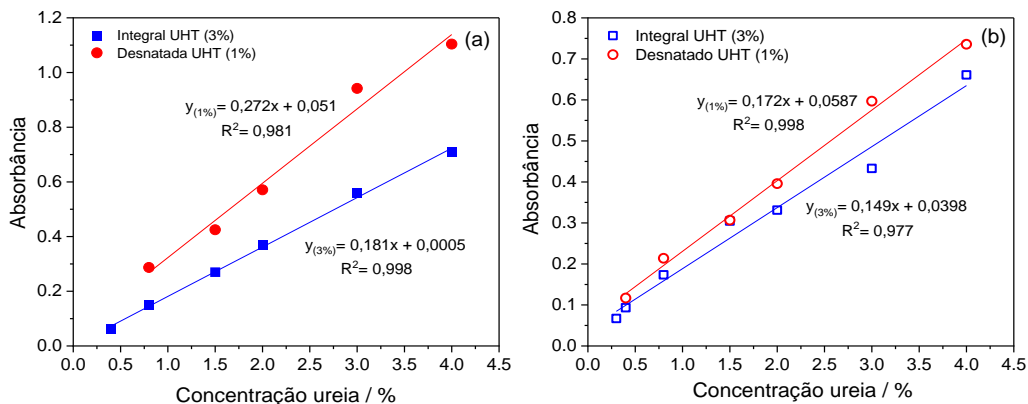
3.4. Curvas analíticas de ureia em leite integral e leite desnatado no espectrofotômetro e no fotômetro-3D

Foram realizadas as curvas analíticas para a determinação de ureia utilizando o espectrofotômetro e o fotômetro-3D, em amostras de leite integral (3,0 % gordura) e leite desnatado (0,5 % gordura), com faixa de trabalho entre 0,3 e 4,0 % (m/V) de ureia.

Tanto a curva analítica do espectrofotômetro, quanto a do fotômetro mostraram linearidade em concordância com a diretiva de validação da ANVISA, (2017) e do INMETRO, (2020), com valores acima de R^2 0,993 (Tabela 2). A faixa de linearidade mudou ligeiramente para o fotômetro-3D, sendo de 0,4 % até 4,0 % (m/V) de ureia. Quando comparadas as inclinações das curvas, foi possível observar que o espectrofotômetro apresenta uma sensibilidade maior do que o fotômetro-3D. Vale ressaltar que o dispositivo 3D apresentou boa linearidade, com resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, além de resultados precisos, obtendo variação inferior a 0,04 %, mesmo sendo uma matriz complexa permitiu identificar e quantificar o analito (Figura 5).

Foram testados leites zero lactose, desnatado e semidesnatado, sendo que a absorbância apresentou variação frente ao leite integral. Dessa forma, a quantificação da ureia nos demais tipos de leite implicou na construção de uma curva analítica adicional, que foi realizada com leite desnatado que permite associar o leite semidesnatado, zero lactose e desnatado.

Figura 5. Curvas analíticas para a determinação de ureia em amostras de leite, a partir do: (a) Espectrofotômetro e (b) Fotômetro-3D.



Fonte: Autoria própria (2024).

3.5. Testes de recuperação e precisão inter e intra-dia

Os testes de recuperação foram avaliados em duas concentrações: 1,7 % e 2,8 % (m/V) de ureia, realizados em triplicata. Os resultados foram determinados em porcentagem a partir da Eq.1.

$$\text{Recuperação (Rec)} = \frac{\text{Concentração obtida (Rec.Experimental)}}{\text{Concentração inicial}} \times 100 \% \quad (\text{Eq. 1})$$

A recuperação apresentou valores entre 89% e 115%, com CV% (desvio padrão relativo) entre 3,5 e 16 %. Valores de recuperação entre 80% e 120% são geralmente considerados aceitáveis para testes de recuperação (Oliveira, 2006). Os resultados indicam que o método é adequado para determinação de ureia.

A determinação da precisão intra e inter dia, foi realizada com a concentração de 3,0% (m/V) de ureia. Os resultados mostraram valores de precisão intra-dia de 3,4 a 9,1%, demonstrando precisão aceitável conforme os guias de validação. A precisão inter-dia foi comparada em três dias diferentes, como recomenda a ANVISA, (2017), variando entre 1,5 e 9,1%. Os valores mais baixos apresentados em sua maioria pelo fotômetro impresso indicam a repetibilidade do método proposto. Enquanto que os valores um mais elevados, porém ainda abaixo de 10%, podem ser relacionados a variações das condições de experimento e ambientais. Os dados foram resumidos na Tabela 2. A mesma mostra as principais figuras de mérito obtidas no método desenvolvido para a determinação de ureia em amostras de leite integral e desnatado.

Tabela 2. Figuras de mérito do espectrofotômetro de referência e do dispositivo 3D-impresso para a determinação da ureia em leite.

PARÂMETROS	ESPECTROFOTÔMETRO		FOTÔMETRO-3D		
	INTEGRAL	DESNATADO	INTEGRAL	DESNATADO	
Curva analítica	$y = 0,181 [\text{ureia}] + 5,0 \times 10^{-4}$	$y = 0,272 [\text{ureia}] - 5,11 \times 10^{-2}$	$y = 0,149 [\text{ureia}] + 3,98 \times 10^{-2}$	$y = 0,172 [\text{ureia}] + 5,87 \times 10^{-2}$	
R ²	0,997	0,993	0,997	0,996	
LOQ / % ureia	0,3	0,4	0,4	0,4	
REC média do spike ± CV%	REC _{1,7%}	108 ± 10,0	100,8 ± 3,51	106 ± 8,20	104 ± 16,6
	REC _{2,8%}	89,1 ± 6,90	108,9 ± 6,21	104 ± 10,3	115 ± 15,7
Precisão Intra-dia / CV%	3,98	7,11	3,79	3,39	
Precisão Inter-dia / CV%	7,69	7,24	1,47	9,10	

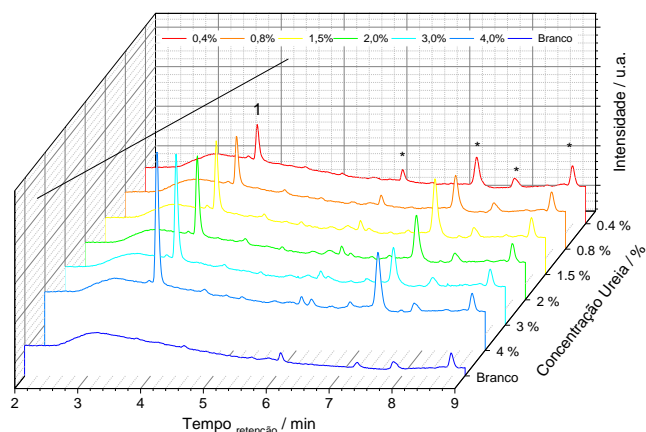
Fonte: Autoria própria (2024).

O fotômetro-3D apresentou um limite de quantificação de 0,4% (m/V) ureia, sendo a concentração mínima que pode ser quantificada em um nível confiável. Valor muito próximo ao obtido no espectrofotômetro, 0,3% (m/V). Este resultado era esperado, já que o dispositivo proposto não apresenta componentes eletrônicos e ópticos refinados como um aparato mais robusto, impactando na sensibilidade do método.

3.6. Determinação de ureia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo linear de diodos (HPLC- DAD)

O sobrenadante obtido a partir do preparo da amostra da Figura 3 foi diluído 2 vezes em água Milli-Q, em seguida, foi realizada a derivatização com *p*-DAC (3,0 %), seguida de filtração com filtro PDVF >0,45 μm para eliminar qualquer precipitação que poderia danicar a coluna. A Figura 6 mostra os cromatogramas obtidos no leite integral nas concentrações 0,4 a 4,0% (m/V) de ureia. O tempo de retenção do analito derivatizado foi determinado para $3,78 \pm 0,02$ min, no comprimento de onda de 530 nm. O branco (soro de leite e *p*-DAC sem ureia) não apresenta sinal neste tempo de retenção, indicando que a reação acontece só na presença de ureia, não havendo detecção de ureia nas amostras de leite.

Figura 6. Cromatogramas da curva analítica de ureia em leite integral.



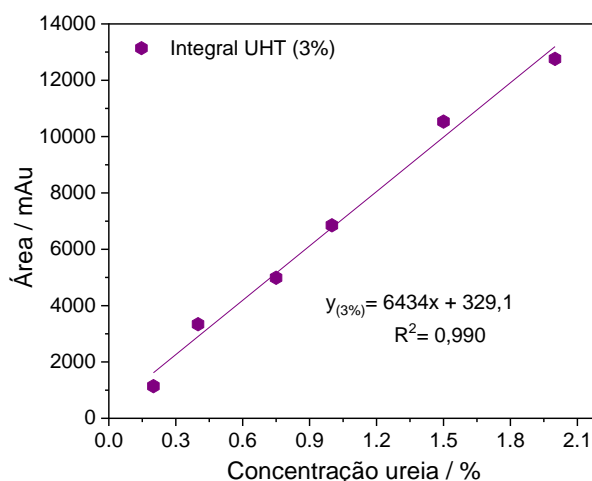
¹ Reação derivatizada com *p*-DAC e * Outras reações *p*-DAC com ureia.

Fonte: Autoria própria (2024).

Foi realizada a curva analítica no HPLC nas condições estabelecidas no item

2.3. diretamente na matriz do leite diluído em água 2 vezes, sendo avaliada nas mesmas concentrações de ureia de 0,2 até 2,0%. A Figura 7 mostra os resultados da uma curva analítica, apresentou boa linearidade em concordância com as diretrizes de validação, com R^2 de 0,990. A Tabela 3 mostra as principais figuras de mérito da curva analítica para a determinação de ureia em leite integral. O método desenvolvido por HPLC, assim como espectrofotométrico, serão usados como referência.e precisão tendo variação inferior a 18,8 %. Os valores de recuperação ficaram entre 75 e 80 %, indicando que o método quantifica a ureia, apesar de apenas a concentração de 1,7 % estar um pouco abaixo do intervalo considerado ideal, de 80 a 120 %.

Figura 7. Curva analítica da ureia em leite integral em HPLC-DAD



Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 3 . Figuras de mérito do HPLC-DAD para a determinação da ureia em leite integral.

Curva analítica		$y = 6434 [\text{ureia}] + 329,1$
R^2		0,990
LOQ / % ureia		0,3
Tempo de retenção/ min		$3,78 \pm 0,02$
Rec média do spike \pm CV %	REC 1,7%	$75,1 \pm 5,50$
	REC 2,8%	$80,4 \pm 19,2$
Precisão Intra-dia / CV %		18,8
Precisão Inter-dia / CV %		12,8

Fonte: Autoria própria (2024).

3.7. Testes de determinação de ureia utilizando diferentes tipos de leite

Diferentes tipos de leite UHT além da integral (3,0% gordura), foram testados, zero lactose (1,0% gordura), semidesnatado (1,0% gordura) e desnatado (0,5% gordura), todos na concentração de 3,0% (m/V) de ureia, foram determinados utilizando espectrofotômetro, fotômetro-3D e no HPLC-DAD.

Para o fotômetro e espectrofotômetro, a ureia foi quantificada utilizando as curvas analíticas em leite integral e desnatado (zero-lactose, semidesnatada e desnatada), apresentadas na Tabela 2. Já para o HPLC foi necessário realizar uma nova curva analítica, específica para o leite integral (Tabela 3).

Os diferentes valores de concentração média determinada e seus respectivos desvios implicam na influência da matriz para a quantificação do analito, relacionado a alta heterogeneidade e composição da amostra que pode apresentar uma ligeira variabilidade, com CV% entre 0,0018 – 0,42%, sendo necessária a quantificação individual por leite, sendo que o leite integral foi o que mais se ajustou ao método proposto com concentração ureia (2,9% - 3,3%), sendo o único possível de quantificar o analito no espectrofotômetro, fotômetro e HPLC. O desnatado somente os dois primeiros, isso porque as equações apresentam inclinações similares nesses tipos de leite e equipamentos. No HPLC, não foi comprovado, mas os resultados indicam que as inclinações variam ao mudar o tipo de leite.

Tabela 4. Quantificação de ureia em diferentes tipos de leite, a partir dos diferentes equipamentos e curvas analíticas.

LEITE	% (m/V) DE UREIA MÉDIA ± CV%		
	ESPECTROFOTÔMETRO	FOTÔMETRO-3D	HPLC-DAD
Integral	2,9 ± 0,17	2,8 ± 0,23	3,3 ± 0,17
Desnatado	3,0 ± 0,42	3,2 ± 0,24	2,2 ± 0,0018
Zero lactose	2,0 ± 0,12	2,3 ± 0,17	2,5 ± 0,096
Semidesnatado	2,0 ± 0,29	2,1 ± 0,31	2,7 ± 0,13

Fonte: Autoria própria (2024).

3.8. Análise estatística ANOVA, teste-t e teste-F, comparação entre os equipamentos espectrofotômetro, fotômetro-3D, e HPLC-DAD

No primeiro momento, a partir dos resultados da análise ANOVA das regressões lineares foi possível confirmar que em todas as curvas analíticas realizadas, não existe falta de ajuste, uma vez que os valores de F tabelado são maiores do que os de significação (Tabela 5), dessa forma, os modelos matemáticos ajustados descrevem bem a concentração de analito obtida em cada equipamento.

Tabela 5. Parâmetros de ajuste da regressão linear das curvas analíticas (ANOVA).

PARÂMETRO	ESPECTROFOTÔMETO		FOTÔMETRO-3D		HPLC DAD
	INTEGRAL	DESNATADO	INTEGRAL	DESNATADO	INTEGRAL
F_{tabelado}	1521	235	250	249	558
$F_{\text{significação}}$	$2,72 \times 10^{-17}$	$1,05 \times 10^{-9}$	$3,47 \times 10^{-11}$	$7,42 \times 10^{-10}$	$7,23 \times 10^{-14}$
Observações	18	15	18	15	18
Erro padrão	0,024	0,077	0,046	0,044	685

Fonte: Autoria própria (2024).

Também foram comparados, aos pares, os resultados obtidos nos três diferentes equipamentos, para determinar se há variância entre as médias dos sinais analíticos (espectrofotômetro/ fotômetro-3D, fotômetro-3D/ HPLC-DAD), a partir dos testes-t e teste F, com 95% de confiança.

Foram comparados os valores de concentração de ureia (3,0 % m/V) quantificados pelas equações das curvas analíticas de leite integral e desnatado (Tabela 2, Tabela 3).

O teste de hipótese e valores de significância, a partir da hipótese nula (distribuição entre os dois grupos não é diferente) e a hipótese alternativa (existe diferença entre os grupos ou associação entre as variáveis) foi utilizado. O teste-t (95%), para a comparação entre espectrofotômetro/ fotômetro-3D resultou em um p-valor bicaudal de 0,821, maior do que o p-valor pré-determinado conhecido como $\alpha = 0,05$.

O teste F de significância comparando resultou em p-valor uni-caudal de 0,167, maior do que $\alpha = 0,05$, então confirma-se que as variâncias são equivalentes. Já o teste-t não pareado para as médias dos mesmos valores, presumindo

variâncias equivalentes, resultou em um p-valor bicaudal igual a 0,858, maior do que $\alpha = 0,05$. A partir destes testes estatísticos pode-se afirmar que a hipótese nula é verdadeira, sendo o p-valor a probabilidade de obter um resultado igual ao que foi observado nos dados.

A comparação estatística para os resultados obtidos com o fotômetro-3D/HPLC-DAD foi realizada da mesma maneira. Vale ressaltar que para a cromatografia, foi obtida uma curva analítica de leite integral. Portanto, as amostras de leite desnatado foram quantificadas a partir desta. O teste-t para os pares das médias das três concentrações, com mesmo nível de confiança (95%), resultou em um p-valor bicaudal igual a 0,853, maior do que $\alpha = 0,05$, portanto, as variâncias são equivalentes.

O teste F para análise das variâncias foi realizado. O p-valor uni-caudal resultante foi de 0,252, maior do que $\alpha = 0,05$, então as variâncias são equivalentes. Por fim, o teste-t não pareado, presumindo variâncias equivalentes, resultou em um p-valor bicaudal de 0,788, maior do que $\alpha = 0,05$. Portanto, não existe variação significativa entre as variáveis de concentração obtidas no HPLC-DAD e no fotômetro-3D.

Ao comparar os dados obtidos no fotômetro com os resultados obtidos pelo HPLC-DAD e pelo espectrofotômetro, é possível confirmar a exatidão do método desenvolvido no fotômetro 3D-impresso, ou seja, não existem diferenças significativas entre os valores dos sinais obtidos a partir dos equipamentos robustos e do dispositivo impresso.

CONCLUSÕES

Na determinação de ureia a partir da reação com *p*-DAC em amostras de leite utilizando um fotômetro impresso por manufatura aditiva, se mostrou estável com resultados precisos e confiáveis, similares aos obtidos em espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência, nos diferentes tipos de leite utilizados. Assim como a metodologia desenvolvida para o preparo de amostra a partir do efeito salting-out promovido pelo sal $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em meio ácido, a qual resultou em um aumento do sinal analítico, por meio de uma solução límpida, clara e sem

interferência nos resultados, mesmo após a derivatização com *p*-DAC. Os métodos para quantificação da ureia no leite não apresentaram falta de ajuste na validação do método analítico, tanto no dispositivo projetado, quanto em equipamentos de referência, sendo que as curvas analíticas mostraram faixa linear de trabalho muito próxima, e valores de recuperação e repetibilidade dentro da faixa sugerida pelos principais guias de validação nacionais. Os testes estatísticos permitiram comprovar que os resultados obtidos com o fotômetro-3D são semelhantes aos obtidos por espectrofotometria ou cromatografia líquida de alta eficiência, mesmo a matriz da análise sendo complexa. Além disso, constata-se que o desenvolvimento do dispositivo impresso apresentou uma solução inovadora, acessível, destacando-se por sua portabilidade e pelo seu baixo custo de produção (valor aprox. de R\$ 100,05 reais), o que reforça seu potencial uso no acesso de tecnologias de análise, com benefícios significativos para áreas como a educação, indústria e agronegócio.

REFERÊNCIAS

AGRAWAAL, Harshit; THOMPSON, J. E. Additive manufacturing (3D printing) for analytical chemistry. **Talanta Open**, [s. l.], v. 3, n. January, p. 100036, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100036>.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 24 de Julho de 2017**. , Brasília - DF: 2017.

BAUMGARTNER, Bettina; FREITAG, Stephan; LENDL, Bernhard. 3D Printing for Low-Cost and Versatile Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 92, n. 7, p. 4736–4741, 2020.

DULES, Elís Dias. ELÍS DIAS DULES Os principais conservantes utilizados na produção de cosméticos. [s. l.], 2019.

GIGANTE, Andréa Cristina. **Desenvolvimento de método limpo para a determinação de ureia**. 2011. 60 f. - Universidade Estadual Paulista, [s. l.], 2011.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. Revisão 09. *In*: , 2020. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2020.

LUIZ, Vitor Hugo Marques *et al.* Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 147, n. March, p. 43–48, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.006>.

NANDESHWAR, Ruchira; MANDAL, Poulami; TALLUR, Siddharth. Portable and

Low-Cost Colorimetric Sensor for Detection of Urea in Milk Samples. **IEEE Sensors Journal**, [s. l.], v. 23, n. 14, p. 16287–16292, 2023.

NESTERENKO, Pavel N. 3D printing in analytical chemistry: Current state and future. **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 92, n. 8, p. 1341–1355, 2020.

OLIVEIRA, Fernando Mota De. **Controle da Qualidade Analítica**. [S. l.: s. n.], 2006.

RUY, M.R.S. **Dissertação de Mestrado Dissertação de Mestrado**. 2011. 108 f. - Instituto de Química- UNESP, [s. l.], 2011.

SILVA, F.; VASCONCELOS, J.S.; VASCONCELOS, A.C.S. DISPOSITIVO SENSORIAL OLFATIVO ASSOCIADO À REDE NEURAL ARTIFICIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES NO LEITE. *In:* , 2017, Porto Alegre – RS. **XIII Simpósio Brasileiro de Automação Inteligente**. Porto Alegre – RS: [s. n.], 2017.

TOLEDO, Paulo R.A.B. *et al.* Fast and simple method for identification of adulteration of cow's milk with urea using diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 9, n. 45, p. 6357–6364, 2017.

WANG, Lujun; PUMERA, Martin. Recent advances of 3D printing in analytical chemistry: Focus on microfluidic, separation, and extraction devices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 135, p. 116151, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116151>.