UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

NATÁLIA DOS SANTOS TRINDADE

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO A PARTIR DE MANUFATURA ADITIVA PARA DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AMOSTRAS DE LEITE

Araraquara
2025

NATÁLIA DOS SANTOS TRINDADE

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO A PARTIR DE MANUFATURA ADITIVA PARA DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AMOSTRAS DE LEITE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Coorientadora: Dra. Saidy Cristina Ayala Durán

Araraquara

2025

T833d

Trindade, Natália dos Santos

Desenvolvimento de dispositivo a partir de manufatura aditiva para determinação de ureia em amostras de leite / Natália dos Santos Trindade. -- Araraquara, 2025

46 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Coorientadora: Saidy Cristina Ayala Durán

1. Química analítica. 2. Ureia. 3. Impressão 3D. 4. Espectrofotômetro. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

NATÁLIA DOS SANTOS TRINDADE

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO A PARTIR DE MANUFATURA ADITIVA PARA DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AMOSTRAS DE LEITE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP) Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Data da defesa: 08 / 12 / 2025

Banca Examinadora:

gov.br
Documento assinado digitalmente
PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES
Data: 11/12/2025 17:33:34-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

gov.br
Documento assinado digitalmente
LORENA OLIVEIRA PIRES
Data: 12/12/2025 15:48:56-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires

gov.br
Documento assinado digitalmente
GEISA ALBINI
Data: 12/12/2025 16:44:35-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Profa. Dra. Geisa Albini

Dedico este trabalho à minha família e seu apoio indescritível sempre, pessoas de carinho e cuidado gigantesco, que me permitiram e apoiaram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos discentes do Instituto de Química que tive contato, por tanta dedicação e ensinamentos. Agradeço principalmente ao Professor Paulo Clairmont e seu grupo de pesquisa, especialmente à Saidy Ayala-Durán, pois este trabalho não seria possível sem sua orientação.

Agradeço imensamente aos meus amigos de vida e aos que agora levo para a vida, os quais a UNESP me uniu.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº #2023/12972-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Dispositivos de análises químicas portáteis têm uma ampla aplicabilidade em testes nos quais é necessária uma resposta simples, rápida e precisa, como por exemplo em amostras de produtos perecíveis, como o leite. Este trabalho descreve a aplicação de um fotômetro miniaturizado, portátil e de baixo custo, obtido em impressora 3D, permitindo análises em campo para a detecção de ureia no leite. Para o tipo de amostra estudada neste trabalho, é de suma importância conhecer as reações químicas que são geradas e seus possíveis interferentes, além da matriz necessitar de um pré-tratamento a fim de ser analisada por técnicas analíticas fotométricas. Este trabalho tem como objetivo a determinação colorimétrica da ureia, em amostras de diferentes tipos de leite, gerando um complexo de coloração amarelada/alaranjada, com absorção máxima em 530 nm. O método de análise proposto apresenta uma preparação de amostra simples e ambientalmente amigável, fazendo uso do efeito *salting-out* promovido pelo cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$), em pH ácido (3,8). A partir do estudo de cinética e estabilidade da reação da ureia com o reagente derivatizante p-dimetilamina cinamaldeído (p-DAC), determinou-se o tempo de reação como 30 minutos. A faixa de trabalho foi de 4,0 mg mL^{-1} a 40 mg mL^{-1}, com limite de quantificação (LOQ) de 4,0 mg mL^{-1}, recuperação entre 97% e 105%, além de precisões intra e inter-dias entre 1,43% e 3,39%. O estudo foi realizado em amostras de leite UHT integral (3,0% de gordura) e leite UHT desnatado (0,5% de gordura). Os resultados de quantificação do analito obtidos com a metodologia proposta e dispositivo impresso foram comparados estatisticamente aos adquiridos por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV-Vis). A tabela ANOVA, o teste t e o teste F verificaram que o fotômetro impresso em 3D apresenta acurácia comparável à de equipamentos comerciais, sem diferenças significativas entre os valores de analito obtidos, uma vez que os p-valores foram superiores à 0,05. Além dos valores de F calculados superiores aos de significância, demonstrando que os modelos matemáticos utilizados nas curvas analíticas foram adequados.

Palavras-chave: fotometria; impressão 3D; espectrofotometria, Cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

Portable chemical analysis devices have broad applicability in tests requiring a simple, rapid, and accurate response, such as those involving perishable products like milk. This study describes the application of a miniaturized, low-cost, portable photometer produced using a 3D printer, enabling field analyses for the detection of urea in milk. For the type of sample investigated in this work, it is essential to understand the chemical reactions involved and their potential interferences, in addition to requiring sample pretreatment for analysis by photometric techniques. The objective of this study is the colorimetric determination of urea in samples of different types of milk, forming a yellowish/orange-colored complex with maximum absorption at 530 nm. The proposed analytical method features a simple and environmentally friendly sample preparation, utilizing the salting-out effect promoted by calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) under acidic conditions (pH 3.8). Based on the kinetic and stability study of the reaction between urea and the derivatizing reagent p-dimethylaminocinnamaldehyde (p-DAC), the reaction time was established as 30 minutes. The working range was from 4.0 mg mL^{-1} to 40 mg mL^{-1}, with a limit of quantification (LOQ) of 4.0 mg mL^{-1}, recovery between 97% and 105%, and intra- and inter-day precision ranging from 1.43% to 3.39%. The study was conducted using samples of whole UHT milk (3.0% fat) and skimmed UHT milk (0.5% fat). The results of analyte quantification obtained using the proposed methodology and printed device were statistically compared to those obtained by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC-UV-Vis). ANOVA, t-test, and F-test confirmed that the 3D-printed photometer exhibits accuracy comparable to commercial instruments, with no significant differences in the analyte values obtained, as all p-values were greater than 0,05. Additionally, the calculated F-values were higher than the significance thresholds, demonstrating that the mathematical models used for the analytical curves were appropriate.

Keywords: photometry; 3D printing; spectrophotometry; high-performance liquid chromatography.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8
1.1 Ureia, métodos de referência e normas regulamentadoras 8
1.2 Impressão 3D 13

2. OBJETIVOS 16

3. MATERIAIS E MÉTODOS 17
3.1 Materiais, reagentes e soluções 17
3.2 Amostras e pré-tratamento com salting-out 17
3.3 Preparo e análise das amostras 18
3.4 Fotômetro 3d-impresso 18
3.5 Caracterização térmica 21
3.6 Quantificação do analito 21
3.7 Avaliação das figuras de mérito 22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23
4.1 Preparação das amostras com salting-out 23
4.2 Caracterização térmica 25
4.2.1 Reagentes sólidos 26
4.2.2 Ureia em solução 27
4.4 Análise no dispositivo impresso 31
4.5 Curvas analíticas e figuras de mérito 31
4.5.1 Curvas analíticas 31
4.5.2 Figuras de mérito 32
4.6 Quantificação da ureia em hplc-uv-vis 33
4.7 Determinação de ureia em diferentes tipos de leite 35
4.8 Análise estatística: anova, teste-t, teste-f e comparação entre fotômetro impresso, espectrofotômetro e hplc-uv-vis 36

5. CONCLUSÃO 39
REFERÊNCIAS 40

1. INTRODUÇÃO

O leite é uma solução coloidal, uma emulsão na qual moléculas de gordura estão suspensas em uma matriz aquosa, juntamente com proteínas e sais minerais. Essa bebida e seus derivados constituem parte na rotina alimentar humana, sendo produtos de grande relevância para a indústria alimentícia. Durante o processo industrial de produção do leite, a contaminação por diferentes origens, bem como a presença de proteínas, água, gordura e outras substâncias — como microplásticos, pode representar riscos à saúde dos consumidores finais[1-4].

Os contaminantes presentes no leite bovino podem ser compostos biológicos e/ou químicos. A forma biológica está geralmente associada a práticas inadequadas de ordenha. Vissers e Driehuis[5] relataram que a exposição do produto ao ambiente e o uso de equipamentos contaminados são fatores relevantes. Por outro lado, a contaminação química pode decorrer do uso e consumo de produtos veterinários (legais ou ilegais), pesticidas, agroquímicos, forragens e rações contaminadas, ou ainda da aplicação indevida de compostos químicos nas etapas de produção, processamento, embalagem e armazenamento do leite bovino[6].

Entre os adulterantes comuns que representam riscos à saúde e são frequentemente reportados no leite, destacam-se água, sal, açúcar, peróxido de hidrogênio e ureia sintética[7]. A adição de ureia ao leite é uma prática utilizada para mascarar a diluição com água e aumentar a produção, além de alterar as proporções de sólidos não gordurosos e nitrogênio não proteico. Essa substância também reduz a acidez titulável e inibe a fermentação do leite[8]. Embora possa estar presente na composição heterogênea do leite cru, a ureia é frequentemente adicionada com o objetivo de restaurar o percentual padrão de proteína exigido para o consumo. Parâmetro significativamente alterado em casos de fraude por diluição. Tal prática visa ocultar a adição de água com o intuito de aumentar o volume final do produto[9].

1.1 Ureia, métodos de referência e normas regulamentadoras

A ureia é um composto orgânico cristalino, de fórmula molecular $(NH_2)_2CO$, solúvel em água, variando de branco a incolor, não inflamável, com odor característico e potencialmente nocivo à saúde humana quando em altas concentrações[10,11].

Por ser um constituinte natural do leite cru, a ureia pode estar presente em concentrações de até 70 mg/100 mL, conforme estabelecido pela Lei de Segurança

Alimentar e Padrões da Índia (FSSAI), de 2006, e pelas Regras de Prevenção à Adulteração de Alimentos (PFA)[7]. No Brasil, a legislação vigente proíbe a presença de quaisquer substâncias estranhas no leite cru refrigerado, conforme disposto nas Instruções Normativas nº 76 e nº 77 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento[12]. Essas normas exigem controle rigoroso em todas as etapas da produção, visando garantir a qualidade do leite e a segurança dos consumidores.

O Relatório Técnico nº 53 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)[13] estabelece que a ureia não é aprovada como aditivo alimentar no Brasil. No entanto, o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA), da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua 41ª sessão realizada em 1993, permitiu uma concentração máxima de 3,0% (m/*V*) (30 mg mL^{-1}) sem preocupações toxicológicas[14].

Um parâmetro essencial que indica a qualidade nutricional dos animais produtores de leite é o Nitrogênio Uréico do Leite (MUN), que quantifica a ureia presente no leite, geralmente expressa em mg dL^{-1}. É importante destacar que parte dessa ureia pode ser proveniente do ciclo metabólico do nitrogênio presente na dieta dos bovinos. Coelho et al.[14] reportaram valores ideais de MUN entre 10 mg dL^{-1} e 18 mg dL^{-1} (0,1 mg mL^{-1} – 0,18 mg mL^{-1}). Valores fora dessa faixa indicam manejo nutricional inadequado, como deficiência ou excesso de proteína na dieta, ou ainda possíveis indícios de adulteração. Valores elevados, acima de 60 mg dL^{-1} (0,6 mg mL^{-1}), estão associados a teores proteicos reduzidos, o que pode comprometer o rendimento e a qualidade do produto[15]. Além do MUN, Walstra e Jennes[16] relataram que na composição do leite existe uma fração de compostos nitrogenados não proteicos (NPN), como ureia, creatina e creatinina, responsáveis por aproximadamente 5% do nitrogênio total presente na matriz.

A União Europeia também estabelece regulamentações rigorosas para assegurar a qualidade do leite e seus derivados. O Regulamento (UE) 605/2010 determina que todo o processo produtivo esteja incluído em um programa de identificação e registro, contendo informações desde o nascimento do animal até o consumo do produto final[17]. Isso inclui padrões de qualidade do leite, proibindo a adição de substâncias estranhas à matriz original. Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) define os padrões de qualidade do leite por meio da

Pasteurized Milk Ordinance (PMO), que estabelece critérios como contagem de microrganismos, resíduos de antibióticos e temperatura de armazenamento. A regulamentação abrange as etapas de produção, processamento e distribuição de leite e derivados[18].

Os métodos analíticos tradicionais e avançados para avaliação da qualidade do leite baseiam-se na quantificação de nitrogênio, titulação, cromatografia e espectrofotometria, além do uso de biossensores[19-21]. Tais abordagens envolvem equipamentos específicos, robustos e não portáteis, exigem analistas treinados e qualificados, e elevam o custo por análise.

O método Kjeldahl é estabelecido pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC)[22] como o procedimento oficial para a determinação do teor de nitrogênio orgânico em matrizes alimentares, como o leite bovino. Trata-se de um método complexo, demorado, composto por diversas etapas e de execução delicada. De forma simplificada, o método utiliza digestão ácida para liberar o nitrogênio orgânico ligado, retendo-o na forma de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) dissolvido em ácido sulfúrico (H_2SO_4). Em seguida, realiza-se a destilação com hidróxido de sódio (NaOH), liberando amônia (NH_3), que é fixada em solução de ácido bórico (H_3BO_3). Por fim, a solução é titulada com ácido clorídrico padronizado e um indicador apropriado para quantificação do nitrogênio presente[23].

Diante disso, o desenvolvimento de dispositivos simples, portáteis e acessíveis, com facilidade de uso, aquisição de dados e resultados precisos e exatos, comparáveis aos métodos de referência, é essencial para a inovação nas análises químicas aplicadas ao controle de qualidade. Dispositivos portáteis de análise química vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer respostas analíticas simples, rápidas, confiáveis e reprodutíveis, especialmente em amostras de produtos perecíveis como o leite[24].

Suarez et al.[25] relataram a quantificação de ureia em leite por meio da reação enzimática catalisada por urease, que controla a hidrólise do analito. O método fotométrico otimizado com LED demonstrou ser eficaz para a determinação de ureia, e os valores descritos como LOD e LOQ, foram $1,8 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e LOQ de $8,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} ($1,1 \times 10^{-5}$ e $4,8 \times 10^{-5}$), respectivamente. As taxas de recuperação variaram entre 95,6% e 105% e faixa de linearidade descrita é de $1,0 \times 10^{-3}$ a $3,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} (6,0 x 10^{-5} a 1,8 x 10^{-3} mg mL^{-1}). Um teste t pareado confirmou a confiabilidade do

método para leite bovino e caprino com nível de confiança de 95%. Devido à sua portabilidade, facilidade de uso e baixo custo, o método pode representar uma solução acessível para pequenos produtores rurais no monitoramento da qualidade do rebanho. Contudo, as principais limitações do método enzimático incluem a necessidade de monitoramento constante da atividade da urease, controle de pH e formação de amônia, além do risco de desnaturação da enzima urease.

Gonçalves et al.[26] determinaram a concentração de ureia em diferentes tipos de leite (integral, semidesnatado e desnatado) por meio de hidrólise enzimática com urease. Utilizando imagens digitais capturadas com smartphone, os valores de intensidade de cor foram medidos e analisados utilizando software digital (PhotoMetrix®). A variação de pH foi monitorada em função do indicador ácido-base vermelho de fenol (550 nm), uma vez que a hidrólise enzimática libera amônia, elevando o pH e permitindo a análise. Os resultados apresentaram faixa linear de 2,0 a 25 mg L^{-1} (2,0 x 10^{-3} a 2,5 x 10^{-2} mg mL^{-1}), com coeficiente de determinação (R^2) de 0,996, limite de detecção (LOD) de 5,0 x 10^{-4} mg mL^{-1} e limite de quantificação (LOQ) de 1,5 x 10^{-3} mg mL^{-1}. As taxas de recuperação (Rec%) variaram entre 95% e 112%, com baixo consumo de amostra e reagentes. No entanto, os autores relataram desvantagens como saturação do canal de medição (G) devido à concentração do vermelho de fenol, limitações quanto à quantidade de urease, tempo de hidrólise e dependência da reação em relação ao pH (especificidade limitada e variabilidade). A hidrólise também é mascarada pela capacidade tamponante da amostra e pelo efeito matriz. Além disso, foram observadas variações significativas (0,9%–14,8%) para o mesmo tipo de leite ao comparar o método proposto com aquele descrito na norma ISO 9622:2013.

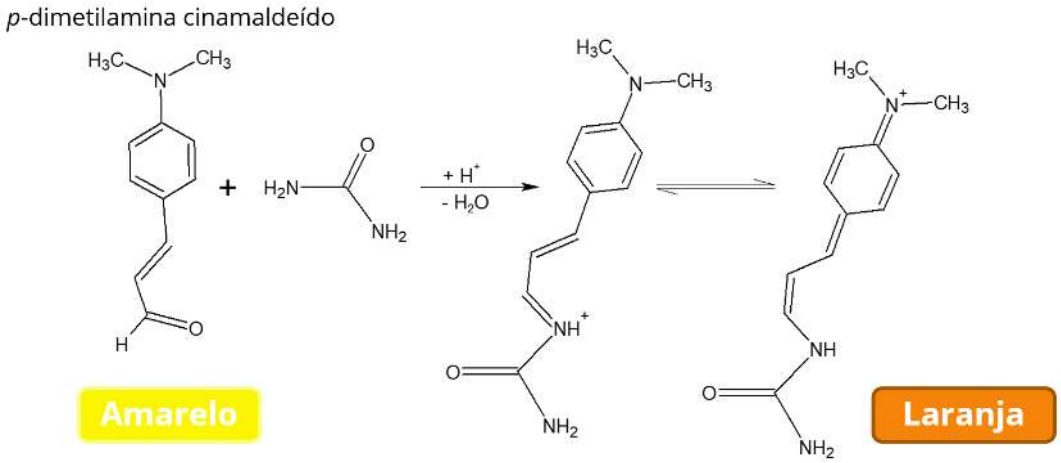
Trivedi et al.[27] reportaram o desenvolvimento de um biossensor baseado em eletrodo sensível ao íon NH_4^+, fabricado por meio da tecnologia de membrana de dupla matriz. A enzima urease foi imobilizada sobre a membrana sensível ao íon utilizando uma matriz polimérica composta por poli(carbamoil sulfonato) (PCS) e polietilenimina (PEI). O método desenvolvido apresentou limite de detecção (LOD) de 2,5 × 10^{-5} mol L^{-1}, inclinação média de 51,7 ± 0,5 mV/decade e os autores descreveram a supressão das interferências de íons Na^+ e K^+, comumente presentes em fluidos biológicos como sangue e leite, os quais podem interfeir a precisão da detecção de ureia por eletrodos sensíveis ao íon NH_4^+.

Patari et al.[28] investigaram reações da ureia com dois reagentes cromogênicos derivatizantes: p-dimetilamina benzaldeído (p-DMAB) e p-dimetilamina cinamaldeído (p-DAC). O produto da reação com ureia é um composto colorimétrico que apresenta absorção na região visível do espectro (amarelo/laranja). Para avaliar a seletividade do método, foram analisados sete adulterantes em amostras de leite: detergente, sabão, amido, peróxido de hidrogênio, bicarbonato de sódio, sal e ureia. O método requer de 1 a 2 mL de amostra para detecção dos adulterantes. A análise para ureia demonstrou linearidade para concentrações entre 0,05 e 1% (*V/V*), taxa de recuperação de 106,2% e coeficiente de determinação de 0,940. O método de detecção colorimétrica mostrou-se eficaz, com interferência inferior a 10% entre os adulterantes. O dispositivo manteve leituras estáveis de intensidade de cor por mais de 30 minutos, reafirmando a confiabilidade do método para triagem rápida de adulterações em leite.

Gigante[29] descreveu a reação em que o grupo carbonila presente na estrutura do p-DAC condensa-se com o grupo amino protonado da ureia, formando um sal de imínio. As aminas possuem um par de elétrons livres provenientes do átomo de nitrogênio em sua cadeia, o que as torna agentes redutores e, teoricamente, favoráveis para forte interação com espécies receptoras de elétrons, assim como o p-DAC. Essa reação é utilizada spot tests, géis, sensores e dispositivos impressos em 3D[11,24,30,31].

A identificação da ureia a partir do reagente cromogênico p-DAC é possível por se tratar de uma reação colorimétrica em meio ácido. Há a condensação do grupo amino protonado da ureia com o grupo carbonila presente na estrutura do p-DAC, formando um sal de imínio (Figura 1)[29]. O p-DAC é um composto de coloração amarela que, na presença de ureia, torna-se alaranjado.

Figura 1 – Mecanismo de reação da ureia com o reagente derivatizante p-DAC.



Fonte: Adaptado de Gigante (2011).

O agente cromogênico p-DAC também é aplicado em estudos de outros compostos, como no desenvolvimento de metodologias analíticas para triagem de sulfonamidas. Ruy[32] relatou o uso em amostras de urina e leite bovino, com detecção espectrofotométrica. O método desenvolvido demonstrou rapidez, baixo consumo de reagentes e taxas de recuperação entre 57% e 68%, consideradas satisfatórias, uma vez que o estudo visava fornecer uma resposta binária (presença/ausência) para sulfonamidas no leite. As curvas analíticas obtidas para os diferentes compostos estudados apresentaram linearidade na faixa de 0,2 a 4,0 mg L^{-1}, com coeficientes de determinação superiores a 0,998.

Luiz et al.[33] utilizaram a interação entre p-DAC e bumetanida (composto que contém grupo sulfonamida) em meio ácido, com o objetivo de detectar *doping* esportivo por meio da análise de urina humana. A reação produz um composto colorido, analisado por imagens digitais e pelo padrão RGB, após aplicação das amostras em papel filtro qualitativo. A curva analítica obtida apresentou linearidade entre 2,5 e 49,8 mg L^{-1} e R^2 de 0,993. Além disso, o método demonstrou vantagens como portabilidade, alta sensibilidade, repetibilidade e taxas de recuperação entre 94% e 105%. Os resultados indicam que o dispositivo analítico pode ser utilizado para a determinação de bumetanida em urina com boa repetibilidade.

1.2 Impressão 3D

O baixo custo e a maior flexibilidade de design proporcionados pela prototipagem via manufatura aditiva viabilizam o desenvolvimento de dispositivos analíticos mais eficientes. Isso se deve, principalmente, à possibilidade de ajustes e

modificações rápidas ao longo do projeto, tornando a impressão 3D cada vez mais presente nos estudos de química analítica. Diversos trabalhos têm sido publicados descrevendo sua aplicação[34-37].

Dispositivos fabricados por meio de extrusão de material são construídos a partir da conversão de um modelo virtual, desenvolvido em software de desenho assistido por computador (CAD), em um sinal compatível com impressoras 3D. A técnica mais empregada para a produção de objetos físicos com a utilização de polímeros é a modelagem por deposição fundida (FDM), também conhecida como fabricação por filamento fundido (FFF). Esse método utiliza filamentos termoplásticos que são fundidos no bico extrusor da impressora e depositados camada por camada. O sistema da impressora 3D incorpora microcontroladores para controlar o processo de impressão, e o objeto é formado sobre uma plataforma de construção resfriada, permitindo sua solidificação.

A utilização de tecnologias como microcontroladores ESP/Arduino e componentes eletrônicos, como LEDs, fotorresistores e resistores, combinada à manufatura aditiva, possibilita o desenvolvimento de dispositivos portáteis e de baixo custo para análises químicas, oferecendo respostas rápidas e precisas[24].

Baumgartner[38] apresentou um dispositivo para espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), compatível com espectrômetros de bancada disponíveis comercialmente. O módulo foi impresso utilizando FDM com filamento de ácido poliláctico (PLA). O custo total do sistema variou entre €360 e €600, variando junto aos recursos disponíveis no local de análise. Este valor foi estimado como aproximadamente 50 vezes menor ao de uma unidade comercial equivalente. O sistema proposto demonstrou alto potencial para aplicações que exigem elevado rendimento analítico ou manipulação de amostras complexas e potencialmente biológicas. Os testes foram realizados com amostras de *Escherichia coli* e albumina sérica bovina. Os resultados indicaram baixos níveis de ruído e curva analítica linear na faixa de concentração de 2,0 a 10,0 mg mL^{-1}, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,999.

Nandeshwar et al.[24] desenvolveram um sensor para quantificação de ureia em amostras de leite. A reação envolve o sobrenadante e o reagente colorimétrico p-DMAB, sendo a intensidade da cor proporcional à quantidade de cromógeno formado. O sistema de detecção óptica é composto por componentes eletrônicos de baixo

custo, incluindo LED azul, fotodiodo, amplificador de sinal, módulo *Bluetooth* e o microcontrolador Raspberry Pi RP2020. Os dados são transmitidos sem fio para um smartphone, onde são analisados e processados. O sensor apresentou linearidade em três conjuntos de amostras triplicadas, com R^2 de 0,720 para a faixa de concentração de 0,1 a 0,7 mg mL^{-1}. Melhorias futuras incluem a otimização da preparação da amostra, automação do fluxo de trabalho e integração de sensores para detecção de outros adulterantes no mesmo dispositivo.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a aplicação de um fotômetro fabricado por manufatura aditiva (impressão 3D) para a determinação de ureia em amostras de leite UHT (Ultra High Temperature), com diferentes composições e lotes.

Para tal, como objetivos específicos, avaliar as condições ideais para a reação da ureia com o reagente p-DAC e investigar a influência de substâncias na análise do analito. Os resultados foram comparados estatisticamente aos obtidos com equipamentos de referência, como o espectrofotômetro e o sistema HPLC-UV-Vis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento deste trabalho pode ser separado em duas etapas, sendo a primeira delas a metodologia desenvolvida para preparo das amostras, tanto o pré-tratamento da matriz analisada, quanto a construção do fotômetro impresso. A segunda etapa refere-se às análises realizadas e a comparação estatística entre os resultados obtidos nos equipamentos utilizados.

3.1 Materiais, reagentes e soluções

Foi utilizado papel filtro de celulose qualitativo (Unifil – 80 g m^{-2}) como suporte sólido para separação entre sobrenadante e precipitado das amostras de leite. Todos os reagentes empregados eram de grau analítico e foram utilizados sem qualquer etapa prévia de purificação. A ureia (≥ 99%) foi adquirida da Synth, o cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (≥ 99%) da Neon, o 4-dimetilamina cinamaldeído (p-DAC) (≥ 99,9%) da Sigma-Aldrich e o ácido clorídrico (HCl) (≥ 99,9%) também da Neon. A solução cromogênica foi composta por uma mistura de p-DAC na concentração de 3,0% (m/*V*) em ácido clorídrico 0,50 mol L^{-1}, utilizando etanol e água como solventes.

3.2 Amostras e pré-tratamento com *salting-out*

Foram utilizadas diferentes amostras de leite bovino UHT (*Ultra-High Temperature*), adquiridas em mercado local, com datas de validade e lotes variados, para avaliar o desempenho do método analítico proposto. As amostras de leite foram classificadas conforme o teor de gordura: leite integral (3,0% de gordura) e leite desnatado (0,5% de gordura).

A precipitação de proteínas do leite (caseína) foi testada utilizando diferentes sais, tais como $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, NaCl e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, em três concentrações (10, 20 e 30% m/*V*). A quantidade necessária de sal foi pesada e adicionada a 40 mL de leite (isento de ureia). A solução foi agitada por aproximadamente 2 minutos em agitador tipo Vortex, com o objetivo de aumentar a força iônica e induzir a precipitação. Em seguida, foram adicionados 400 µL de HCl (6,0 mol L^{-1}), equivalentes a 100 µL por 10 mL de leite. A solução foi então centrifugada a 9000 rpm por 9 minutos e filtrada utilizando papel filtro qualitativo (80 g m^{-2}), para separar o soro do leite das proteínas e da gordura. As condições acima descritas são as desenvolvidas e que apresentaram melhor desempenho na separação de fases e, consequentemente, melhores sinais analíticos.

3.3 Preparo e análise das amostras

O filtrado translúcido definido como o soro do leite foi utilizado na reação derivatizada com o reagente p-DAC. Após o procedimento de preparo da amostra descrito anteriormente, foram testados diferentes volumes do reagente derivatizante cromogênico p-DAC a 3,0% (m/*V*), dissolvido em solução de HCl 0,5 mol L^{-1} em etanol. Esta solução tem coloração amarela. Em balão volumétrico de 10 mL, foram adicionados aproximadamente 9,0 mL de soro de leite juntamente com 70 µL do reagente p-DAC, posteriormente atingindo o menisco com soro. Na presença de ureia, formou-se uma solução de coloração alaranjada; na ausência, a coloração permaneceu amarelada, como mostra a Figura 2. A absorbância foi medida utilizando espectrofotômetro UV-Vis (modelo UV 1800 da Shimadzu) a 530 nm.

Figura 2 – Reação colorimétrica da ureia (diferentes concentrações), derivaização com solução de p-DAC 3,0% m/V em 0,5 mol L^{-1} HCl/EtOH.

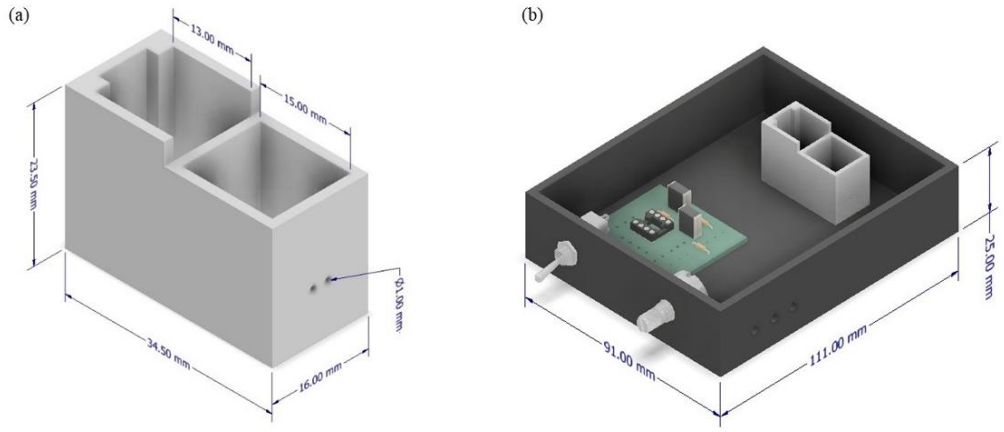


Fonte: Autoria própria, 2024.

3.4 Fotômetro 3D-impresso

O dispositivo fotométrico é composto por partes imprimíveis em 3D, um circuito eletrônico, uma placa microcontroladora, uma cubeta descartável, um LED como fonte de luz e um fotodiodo como detector óptico. Todas as partes impressas (estrutura, tampa, cobertura e base da cubeta) foram projetadas utilizando o software Autodesk Inventor Professional 2024® e impressas em uma impressora Creality K1C, com filamento de ABS, temperatura de extrusão de 260 °C, temperatura da mesa de impressão de 100 °C, velocidade de impressão de 270 mm s^{-1} e altura de camada de 0,20 mm (Figura 3).

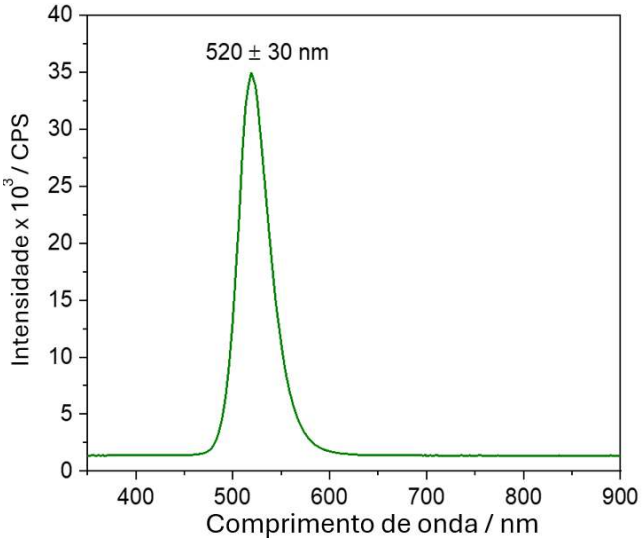
Figura 3 – Detalhes da estrutura do fotômetro impresso **(a)** Suporte para cubeta; **(b)** Caixa inferior do dispositivo.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Como fonte de luz, foi utilizado LED verde de alto brilho (5 mm de diâmetro), com faixa de emissão de 520 ± 30 nm, determinada por espectrômetro modelo Ocean Optics Red Tide USB 650 (Figura 4). Um fotodiodo BPW34, alinhado a 180° em relação à fonte de luz, foi utilizado como detector. Para amplificar a baixa corrente gerada pelo fotodiodo, foi necessário o uso de um circuito amplificador de transimpedância.

Figura 4 – Espectro de emissão da fonte de luz utilizada (LED verde de alto brilho).



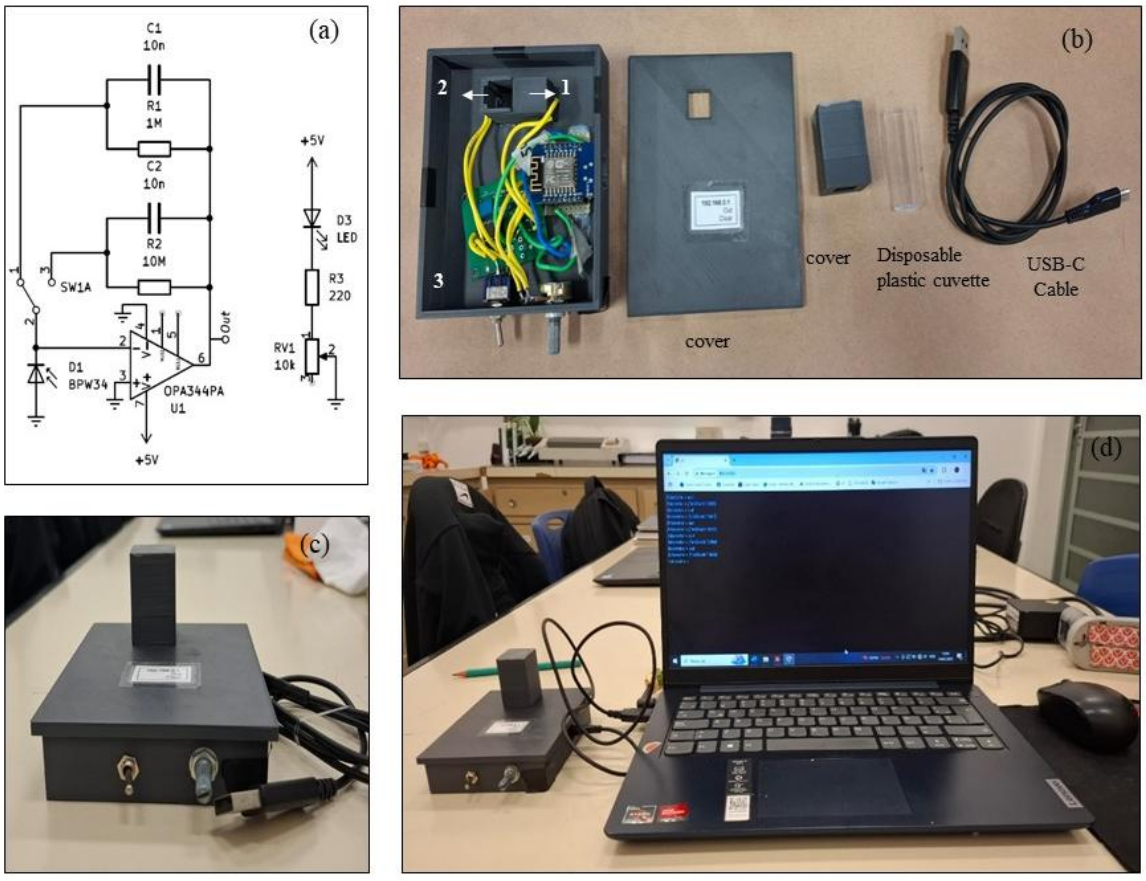
Fonte: Autoria própria, 2025.

Um esquema eletrônico, elaborado no software KiCAD®, é apresentado na Figura 5a. O dispositivo é composto por três partes principais: um compartimento fechado menor contendo a fonte de LED e o fotodetector (1 – Figura 5b); um segundo

compartimento, com base inferior, para encaixe da cubeta de poliestireno (PS), alinhando o feixe de radiação e os compartimentos de detecção (2 – Figura 5b). Um pequeno orifício de 1,0 mm foi criado entre o compartimento da cubeta e o da fonte de irradiação (Figura 3), responsável por atenuar e focalizar o feixe de luz antes de atingir a cubeta. O terceiro compartimento, abriga o circuito eletrônico, a placa microcontroladora e os fios (3 – Figura 5b). A tampa menor foi adicionada para vedar a cubeta, evitando interferência da luz externa durante a análise, além da tampa superior, a qual permite o fechamento do dispositivo (Figuras 5b e 5c).

Para operar o dispositivo, pode-se utilizar uma fonte de alimentação de 5,0 V e 1 A ou uma porta USB de computador, conforme ilustrado na Figura 5d. O sinal analógico gerado na análise é convertido em sinal digital e registrado por um microcontrolador, utilizando programação em C++. Antes da apresentação do resultado, aplica-se uma média móvel aos sinais registrados e realiza-se a conversão de bits para milivolts.

Figura 5 – Detalhes do circuito elétrico e dos compartimentos do fotômetro impresso.



Fonte: Autoria própria, 2024.

O valor de absorbância para as medidas fotométricas foi determinado pela equação abaixo, onde $S_{amostra}$ e S_{branco} correspondem aos sinais de voltagem em milivolts obtidos para as amostras e o branco, respectivamente.

$$\text{Absorbância} = -\log\left(\frac{S_{amostra}}{S_{\text{branco}}}\right)$$

3.5 Caracterização térmica

A caracterização por Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) foi realizada em equipamento de modelo TA Instruments SDT 2960, em atmosfera de N_2 com taxa de fluxo de 10 °C min⁻¹, empregando N_2 como gás de arraste. A amostra foi aquecida na faixa de temperatura de 30 a 600 °C. As análises de TG e DTA em solução foram conduzidas em cadinhos de Al_2O_3 com volume de 90 µL. Foram analisadas amostras sólidas de ureia e cloreto de cálcio dihidratado, soluções de ureia em água e em amostras de leite, após procedimento de salting-out.

3.6 Quantificação do analito

A ureia foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis, a partir da análise de sua reação com o composto colorido p-DAC. O produto formado apresenta absorção máxima em 530 nm. Já no dispositivo proposto, as medições ocorram no comprimento de onda da fonte LED verde de alto brilho, com faixa de emissão de 520 ± 30 nm.

Também foi utilizado um método cromatográfico por HPLC-UV-Vis para a quantificação da ureia, com a mesma reação colorimétrica, utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-20AT acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis) (SPD-M20A). O espectro de absorção da ureia derivatizada foi previamente obtido para determinação do comprimento de onda de absorção máxima do complexo em 530 nm. Para as análises cromatográficas foi utilizada uma coluna de fase reversa Eclipse Plus C-18 (100 mm × 4,60 mm), 5 µm Zorbax, com coluna de proteção (pré-coluna de 4,0 mm × 3,0 mm × 50 mm). Os parâmetros operacionais incluíram vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e temperatura do forno de 30 °C. O método de gradiente linear foi utilizado para a eluição da ureia, com fase móvel composta por acetonitrila (ACN) e ácido fórmico (FA) a 0,1%, variando a porcentagem de ACN de 10% para 70% nos primeiros 7 minutos, mantendo-se em 70% até 9 minutos. Após esse período, as condições iniciais foram restabelecidas (10% ACN), totalizando um tempo de análise de 13 minutos.

O procedimento de determinação de ureia por HPLC foi desenvolvido utilizando a mesma metodologia de preparo de amostras para todos os experimentos. No entanto, foi realizada uma diluição 1:2 do soro de leite em água, seguida da derivatização com p-DAC nas mesmas condições. Posteriormente, a solução foi filtrada com filtro de seringa de Nylon de 0,46 µm para evitar precipitação na coluna cromatográfica, e 20 µL da solução foram injetados conforme a metodologia desenvolvida para quantificação de ureia. A quantificação foi determinada pela relação entre a área do pico cromatográfico com tempo de retenção de 3,82 ± 0,02 minutos, correspondente à formação do composto colorido da reação.

3.7 Avaliação das figuras de mérito

A validação das figuras de mérito foi realizada com base nas diretrizes estabelecidas por órgãos reguladores[39,40]. A precisão do método foi determinada por meio da repetibilidade, sob as mesmas condições operacionais (equipamento, analista e reagentes). A seletividade foi avaliada comparando-se a quantificação da amostra com o branco.

Os limites de detecção (LOD, 3×DP/inclinação) e de quantificação (LOQ, 10×DP/inclinação), sendo DP o desvio padrão do intercepto, foram determinados a partir da relação entre a concentração de ureia no leite e a absorbância obtida por espectrofotometria, fotômetro impresso em 3D e HPLC-UV-Vis. Da mesma forma, a linearidade foi avaliada por meio da preparação de soluções com diferentes concentrações de ureia (3,0 mg mL^{-1} a 40 mg mL^{-1}), analisando-se a relação entre concentração e sinal analítico (absorbância ou área), utilizando pelo menos seis pontos de concentração.

A recuperação (Rec%) como porcentagem, é calculada como descrito abaixo. A avaliação foi realizada em duas concentrações da curva de calibração: 17 mg mL^{-1} (média) e 28 mg mL^{-1} (alta), em triplicata. Os valores de desvio padrão relativo (%CV) inferiores a 5% são considerados como ideais.

$$\text{Recuperação (Rec \%)} = \frac{\text{Concentração}_{\text{recuperada (experimental)}}}{\text{Concentração}_{\text{inicial}}} \text{ x } 100\%$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação das amostras com salting-out

Na escolha do sal a ser utilizado para a precipitação de proteínas do leite integral UHT, foram testados os sais: Cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$); Cloreto de sódio (NaCl) e Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) em concentrações de 10, 20 e 30% m/*V*, conforme o procedimento descrito nos itens 3.2 e 3.3.

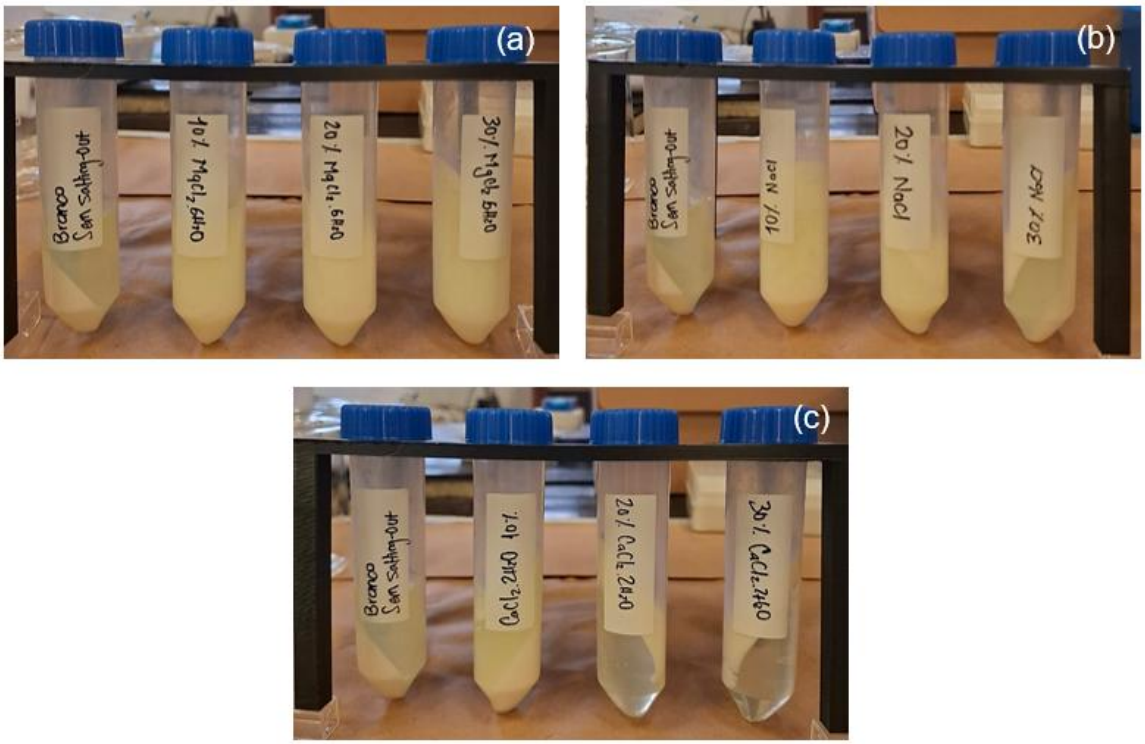
Os resultados mostraram que, ao utilizar o sal $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ em diferentes concentrações, não se obteve precipitação satisfatória, resultando em uma solução turva e esbranquiçada. Após derivatização com p-DAC, o produto da reação apresentou coloração amarela, acompanhada de precipitados que interferiram na medição de absorbância, dificultando a análise, como mostra a Figura 6a.

Para o NaCl nas concentrações de 10% e 20% m/*V*, a solução permaneceu turva, sem precipitação completa. Na concentração de 30% m/*V*, observou-se a separação entre proteínas e soro, porém com supersaturação após a precipitação, evidenciada pela formação de cristais de NaCl no soro do leite, que, após derivatização com p-DAC, resultaram em uma solução esbranquiçada-amarelada, causando inteferência na medição de absorbância (Figura 6b).

Ao utilizar $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ nas concentrações de 10 e 20% m/*V*, não foi observada precipitação completa das proteínas, gerando uma solução levemente turva, o que pode dificultar a análise e contribuir para erros experimentais. O melhor resultado foi obtido com $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ a 30% m/*V*, que proporcionou uma solução límpida, sem supersaturação e com estabilidade mantida após derivatização com p-DAC, representado na Figura 6c. Além disso, observou-se que, ao utilizar a maior concentração de cloreto de cálcio em diferentes tipos de leite UHT (com variações no teor de gordura), o mesmo resultado foi obtido, garantindo a reprodutibilidade da primeira etapa do preparo da amostra.

Todos os sais foram comparados com a precipitação realizada apenas com HCl (6,0 mol L^{-1}), utilizando 200 µL para 20 mL de leite (sem salting-out). Observou-se uma solução levemente límpida, porém esbranquiçada, o que pode representar interferências e problemas na medição de absorbância.

Figura 6 – Diferentes sais cloreto e seus efeitos de *salting-out* na matriz estudada, além do teste de acidificação do pH – primeiros tubos à esquerda **(a)** $MgCl_2.6H_2O$; **(b)** NaCl; **(c)** $CaCl_2.6H_2O$.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Diversos autores relatam a influência do efeito desestabilizante da adição de sais sobre a coagulação, precipitação e estabilidade das caseínas (α, β e κ) em amostras de leite, afetadas por temperatura, pH, concentração proteica e salina. Bauland et al.[41] avaliaram o papel dos cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} nas micelas de caseína durante a coagulação enzimática do leite bovino, em pH 6,6 e concentração de sal de 10 mmol L^{-1} ($CaCl_2$ e $MgCl_2$). Os resultados mostraram que o $CaCl_2$ (Ca^{2+}) segue o mecanismo de troca na forma precipitada como $CaHPO_4$, enquanto o $MgCl_2$ (Mg^{2+}) interage com a micela de caseína na forma ligada (caseinato de cálcio), alterando a cinética de hidrólise da κ-caseína e complexando-se com citrato ($MgHPO_4$-citrato). A adição de cátions ligados ($MgCl_2$) reduz as repulsões eletrostáticas entre as caseínas, enquanto a modificação do pH e o aumento da concentração iônica de Ca^{2+} promovem a agregação das micelas. O papel principal na coagulação enzimática e hidrólise da κ-caseína é atribuído à presença de Ca^{2+} coloidal, que afeta tanto a cinética de hidrólise quanto as propriedades físico-químicas do leite.

Rose e Tessier[42] relataram o efeito do $CaCl_2$ na formação de ligações cruzadas entre micelas de caseinato com cálcio (caseinato de cálcio) em pH 6,7, sem necessidade de controle de temperatura. Thomar et al.[42] observaram a sedimentação

de caseína na presença de $CaCl_2$, associada à interação atrativa entre as caseínas, levando à formação de espécies proteicas densas, que sedimentam durante a centrifugação. Por outro lado, a adição de NaCl promoveu a dissociação desses domínios, aumentando a solubilidade das caseínas sem precipitação. Os agregados de micelas de caseína são mantidos por $CaHPO_4$ coloidal, que pode ser removido pela diminuição do pH, se aproximando do ponto isoelétrico e, portanto, promovendo a precipitação. A presença de íons Ca^{2+} influencia significativamente as propriedades das suspensões de caseinato, reduzindo a carga líquida das proteínas, diminuindo as interações eletrostáticas repulsivas entre partículas, modificando as propriedades reológicas da suspensão e alterando a viscosidade. Isso pode levar à formação de suspensões turvas e à precipitação de domínios proteicos mais densos, influenciados pela concentração de sal utilizada.

Thomar et al.[43] também avaliaram que a adição de NaCl tem efeito menos pronunciado na precipitação promovida por $CaCl_2$, causando desidratação das caseínas, afetando a turbidez e as propriedades emulsificantes, além de promover interação atrativa entre pequenas partículas de caseinato, exigindo altas concentrações de Na^+ para deslocar até 50% dos íons cálcio ligados às caseínas.

Portanto, era esperada uma precipitação eficiente da caseína no leite em pH 4,0 após adição do sal $CaCl_2$, favorecendo a hidrólise, a interação de cargas eletrostáticas, variações estruturais e hidrofobicidade, promovendo alterações proteína-proteína que resultam no aumento do tamanho das micelas proteicas, gerando micelização e agregação[41-45].

A hidrólise altera significativamente o comportamento térmico da caseína e da ureia, facilitando sua decomposição em temperaturas mais baixas, além de modificar seus perfis térmicos analisados por caracterização termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA).

4.2 Caracterização térmica

Ao verificar a hidrólise da caseína no leite pelo efeito da adição de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, pode-se evidenciar a alteração de sua estrutura pela quebra das cadeias peptídicas[46,47], cujos picos de degradação térmica podem estar associados à perda de água, degradação peptídica e queima de resíduos carbonáceos. Esse estudo visa investigar as perdas de massa do analito em questão, frente à adição de cloreto de cálcio para precipitação das caseínas do leite.

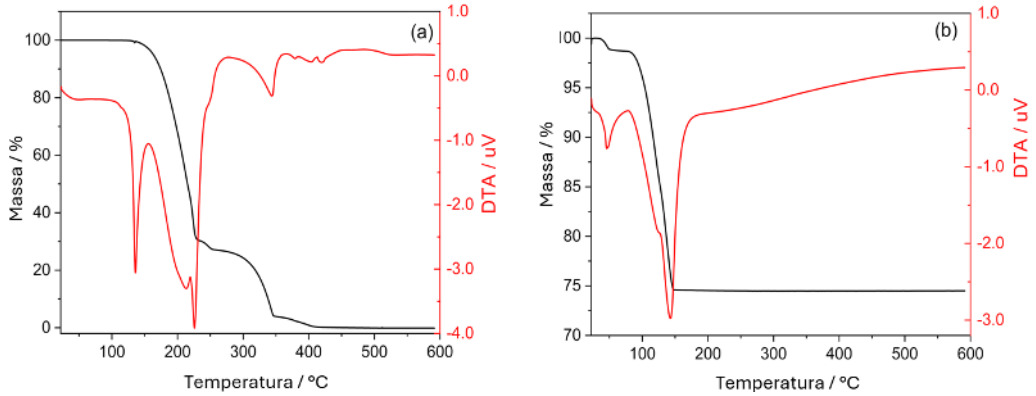
A DTA pode revelar picos endotérmicos correspondentes à desnaturação de moléculas, bem como picos exotérmicos relacionados à decomposição. No caso da ureia, a decomposição resulta na formação de amônia e CO_2, que influenciam a curva TG. A curva da DTA exibe picos endotérmicos característicos da fusão e decomposição térmica da ureia[48].

4.2.1 Reagentes sólidos

A análise termogravimétrica (TG) da ureia sólida revelou quatro estágios simultâneos de perda de massa (%), com cada estágio se encerrando à medida que o próximo se inicia, conforme mostrado na Figura 7a. A primeira perda corresponde à decomposição da ureia entre 145,0 °C e 228,1 °C, onde ocorre a maior perda de massa (68,7%). Entre 228,1 °C e 254,2 °C, observa-se uma perda menor (4,1%). O terceiro estágio, de 254,2 °C a 345,9 °C, resultou em perda de 22,9%, seguido por uma perda de 4,2% entre 345,9 °C e 412,0 °C, levando à decomposição total. A análise térmica diferencial (DTA) indica que os mesmos quatro eventos, indicando picos endotérmicos. Em 136,0 °C, observa-se um pico associado à fusão, sem perda de massa. Os segundo e terceiro eventos estão relacionados às reações de decomposição até 226,5 °C[48]. Entre 343,5 °C e 422,7 °C, eventos endotérmicos adicionais estão associados à decomposição térmica de HNCO e NH_3, que ocorrem na ausência de água.

A análise TG do $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ sólido mostrou dois estágios de perda de massa. O primeiro ocorre até 51,5 °C, com perda de 1,2%, associada à liberação de água. O segundo estágio, entre 83,2 °C e 147,3 °C, resulta em perda de 24%, também relacionada ao processo de desidratação (Figura 7b). A perda total de massa para essa amostra foi de 25,2%. A DTA revelou dois eventos endotérmicos correspondentes a essas perdas de água, consistentes com os achados relatados por Barreneche et al.[50].

Figura 7 – TG e DTA no estado sólido: **(a)** ureia; **(b)** $CaCl_2.6H_2O$.



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.2.2 Ureia em solução

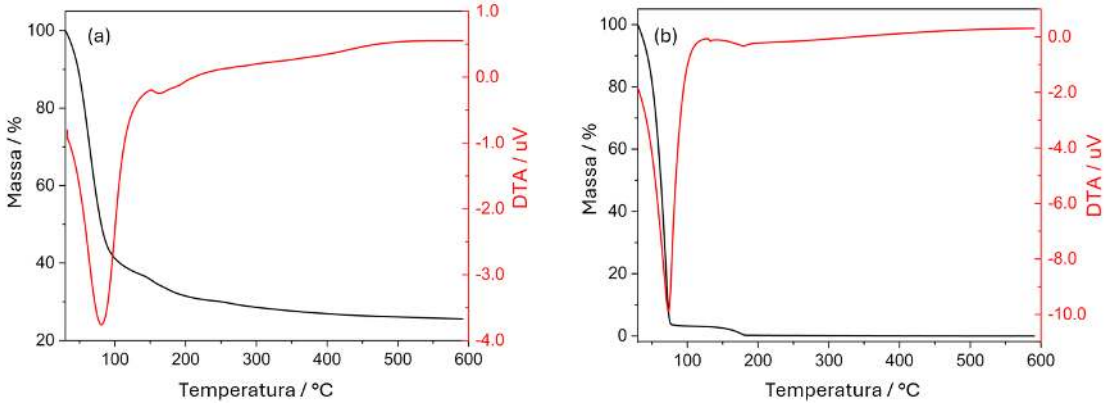
O comportamento da ureia (20 mg mL^{-1}) em solução aquosa e em soro de leite diferiu após o processo de salting-out. A Figura 8a mostra a análise TG de solução de ureia em água, que apresenta dois estágios de perda de massa (%). O primeiro ocorreu entre 29,5 °C e 74,5 °C, resultando na maior perda de massa (95,9%), relacionada à decomposição térmica. O segundo estágio ocorreu entre 123,1 °C e 178,5 °C, com perda de 3,63%, atribuída à decomposição térmica de HCO_3^-, totalizando perda de 99,5%. A DTA mostrou dois eventos endotérmicos, o primeiro em 73,9 °C e o segundo em 176,2 °C, associados à decomposição da ureia em NH_3, HCO_3^- e outros produtos (H_2O, CO_2). Resultados semelhantes foram descritos por Ebrahimian et al.[51].

A Figura 8b apresenta a análise TG da ureia (20 mg mL^{-1}) em soro de leite integral, após o procedimento de precipitação com $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (30% m/*V*) e HCl (6,0 mol L^{-1}). Foram observados três estágios de perda de massa: o primeiro entre 30,0 °C e 106,1 °C, com perda de 59,4%; o segundo, de 107,3 °C a 188,7 °C, com perda de 8,65%; e o terceiro, de 189,2 °C a 600 °C, com perda de 6,2%, todos relacionados à decomposição térmica da ureia, totalizando perda de 74,3%. A DTA mostrou dois eventos endotérmicos em 71,8 °C e 158,5 °C, associados à decomposição da ureia em NH_3 e HCO_3^-. Após 158,5 °C, não foram observados novos eventos.

As perdas de massa indicam a decomposição de gordura, proteínas, vitaminas, sais e lactose presentes no soro de leite. O aquecimento a 40 °C, causado pela adição de 30% (m/*V*) de cloreto de cálcio, resulta em uma degradação média de aproximadamente 3,9% da massa de ureia. Esse valor é baixo, quando comparado

às perdas acima descritas. Possibilitando o uso e aplicação dessa metodologia para promover a precipitação eficiente de proteínas[52].

Figura 8 – TG e DTA de ureia (20 mg mL⁻¹) em: **(a)** água; **(b)** soro de leite integral.



Fonte: Autoria própria, 2024.

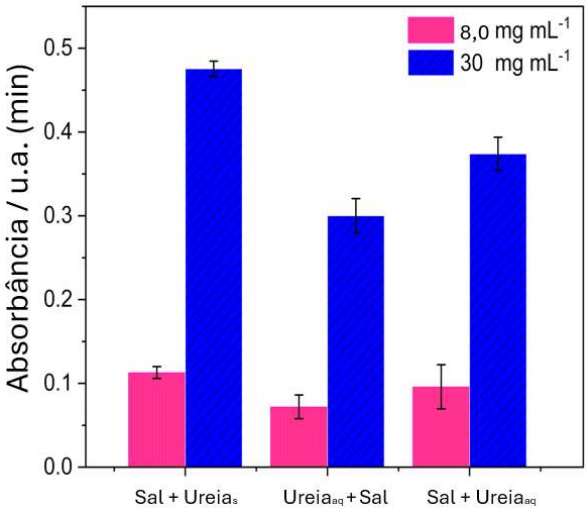
4.2.3 Hidrólise da ureia

Para determinar a perda de ureia por hidrólise, a reação foi testada utilizando diferentes procedimentos de adição de ureia em duas concentrações: 8,0 mg mL⁻¹ e 30 mg mL⁻¹. O primeiro procedimento consistiu na adição conjunta de sal + ureia (ambos sólidos). O segundo, denominado Ureia(aq) + Sal, foi preparado a partir de uma solução aquosa de ureia a 500 mg mL⁻¹, adicionada ao leite integral antes da precipitação com sal. No terceiro procedimento, Sal + $Ureia_{(aq)}$, a solução aquosa de ureia foi adicionada após a precipitação, ou seja, diretamente ao soro do leite.

O maior valor de absorbância (0,475 ± 0,009) foi observado para a adição combinada de sal e ureia (ambos sólidos) na concentração de 30 mg mL⁻¹, seguido pela adição da solução aquosa de ureia após a precipitação, que resultou em uma redução de 21,0% no sinal (0,374 ± 0,020). A adição da solução aquosa antes da precipitação levou a uma perda de aproximadamente 36,8% (0,300 ± 0,020) (Figura 9).

Para a concentração de ureia de 8,0 mg mL⁻¹, o sinal permaneceu mais estável entre os diferentes procedimentos, com uma leve diferença entre Sal + $Ureia_{(s)}$ (0,113 ± 0,007) e Sal + $Ureia_{(aq)}$ (0,096 ± 0,026), representando uma perda de 15,0%. A adição da solução aquosa antes da precipitação apresentou maior perda, de 36,2% (0,072 ± 0,014).

Figura 9 – Comparação de sinal entre diferentes procedimentos de adição de ureia nas amostras.



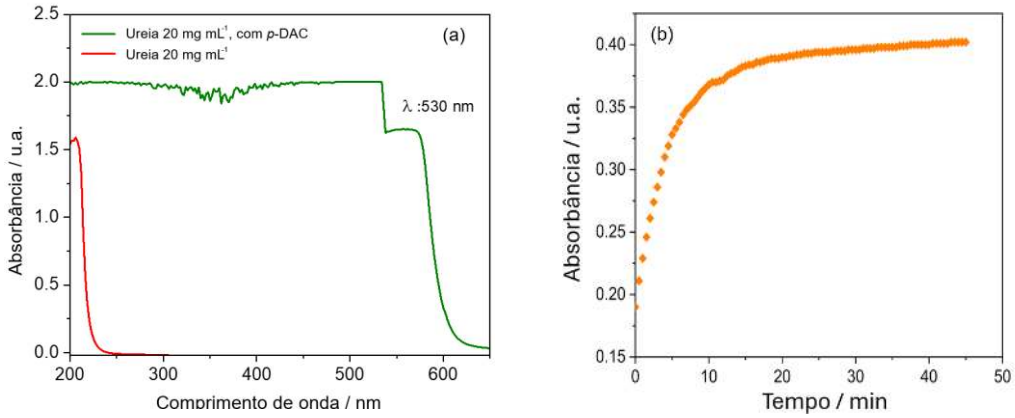
Fonte: Autoria própria, 2024.

4.3 Cinética e estabilidade da reação estudada

4.3.1 Cinética, estabilidade e Tempo de reação

A partir do espectro de absorbância da ureia derivatizada previamente obtido (Figura 10a), a estabilidade óptica da reação foi monitorada imediatamente após a adição do reagente cromogênico ao longo do tempo, a partir do acompanhamento cinético da resposta analítica (absorbância) em 530 nm, realizada a cada 0,5 minuto, com tempo total de 45 minutos, utilizando o espectrofotômetro. A reação colorimétrica demonstrou que o produto formado apresenta um aumento rápido na absorbância nos primeiros 20 minutos, seguido por um valor estável por pelo menos 45 minutos, como pode ser observado na Figura 10b. Dessa forma, o tempo de 30 minutos foi selecionado para garantir a máxima absorbância, bem como boa repetibilidade das análises.

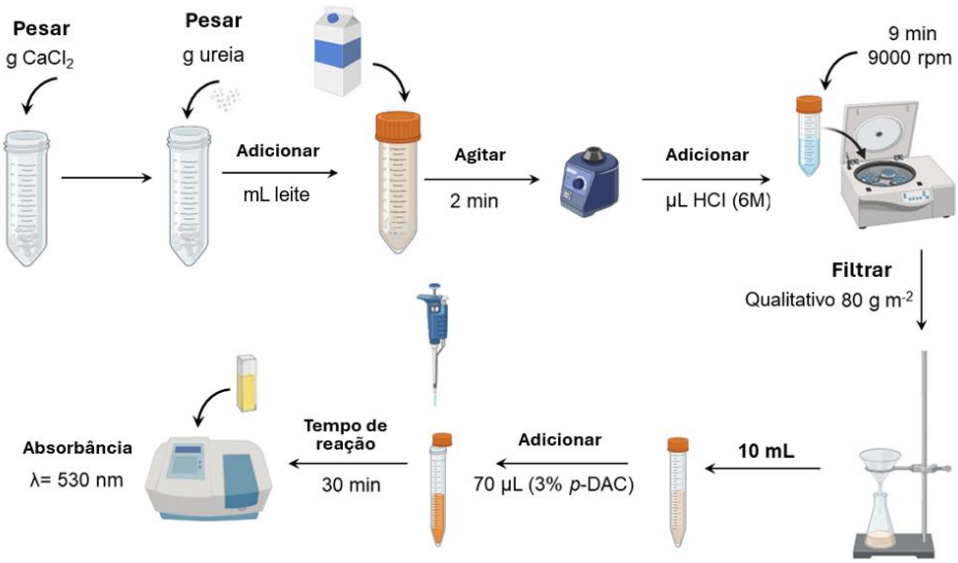
Figura 10 – (a) Espectros de absorbância soluções de ureia: derivatizada e não derivatizada **(b)** Cinética da reação colorimétrica proposta.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A partir do exposto acima, foi definido como procedimento padrão de preparo da amostra: a adição de ureia e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, seguida da adição de 40 mL de leite e, posteriormente, da adição de HCl (6,0 mol L^{-1}), na proporção de 100 µL para cada 10 mL de leite, com o objetivo de ajustar o pH entre 3,5 e 4,0. Após agitação em agitador Vórtex por aproximadamente 1,0 minuto, a solução foi centrifugada por 9 minutos a 9000 rpm e, em seguida, filtrada com filtro de celulose qualitativo. Foram coletados 10 mL de soro de leite, aos quais foram adicionados 70 µL de p-DAC (3,0% em Etanol/HCl 0,5 mol L^{-1}). Após 30 minutos de reação, a absorbância foi medida. Todo o procedimento de preparo da amostra está ilustrado na Figura 11 a seguir.

Figura 11 – Esquema da metodologia de preparo de amostra proposta.



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.4 Análise no dispositivo impresso

Os valores obtidos a partir do fotômetro impresso em 3D eram inversamente proporcionais às concentrações de ureia analisados, medida que a concentração de ureia na solução aumenta, os valores de tensão registrados pelo microcontrolador diminuem, com base na redução dos valores de corrente elétrica gerados pelo fotodiodo.

Durante a leitura do branco, a luz incidente sobre o fotodiodo é máxima, gerando uma corrente elétrica elevada que é convertida em uma tensão maior pelo circuito amplificador (3300 mV). Assim, o menor valor de tensão registrado (800 mV) corresponde à maior concentração de ureia. A determinação da absorbância foi calculada conforme a Equação 2.

4.5 Curvas analíticas e figuras de mérito

Considerando o limite de ureia no leite que indica a qualidade nutricional dos animais e o seu respectivo teor proteico como 60 mg dL^{-1} (0,6 mg mL^{-1})[14], no presente trabalho, foi utilizada uma faixa de trabalho de 3,0 mg mL^{-1} a 40 mg mL^{-1}, na qual a concentração mínima é cinco vezes superior àquela capaz de comprometer a qualidade do produto, sem apresentar qualquer risco toxicológico. Dessa forma, simulando uma adulteração por acréscimo de ureia nas amostras de leite.

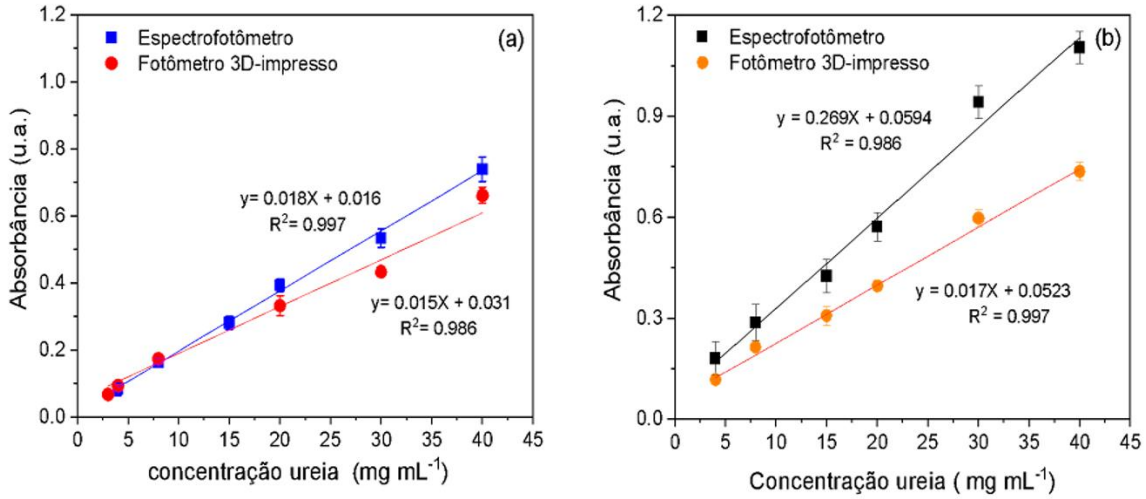
4.5.1 Curvas analíticas da ureia

As curvas analíticas foram obtidas utilizando espectrofotômetro e fotômetro impresso em 3D, aplicados em amostras de leites UHT integral (3,0% de gordura) e desnatado (0,5% de gordura). A Figura 12a mostra as curvas analíticas obtidas para o leite UHT integral, enquanto a Figura 12b são do leite UHT desnatado.

Os resultados demonstraram boa linearidade (R^2 de 0,986 e 0,997), faixa de concentração entre 3,0 mg mL^{-1} e 40 mg mL^{-1}, e limites de quantificação (LOQ) de 3,0 mg mL^{-1} e 4,0 mg mL^{-1} para o espectrofotômetro e o fotômetro impresso, respectivamente. O fotômetro impresso em 3D apresentou menor sensibilidade em comparação à curva de inclinação obtida com o espectrofotômetro (Figura 12a-b). Contudo, é relevante destacar que o dispositivo demonstrou linearidade adequada, com resultados diretamente relacionados à concentração do analito na amostra, apresentando precisão com variação inferior a 0,04%, mesmo diante de uma matriz complexa como o leite.

O leite desnatado apresentou maior valor de absorção desde a primeira concentração (3,0 mg mL^{-1}), bem como maior inclinação da curva analítica, tanto para o espectrofotômetro quanto para o fotômetro impresso (Figura 12b). Dessa forma, observa-se que as características da tabela nutricional, especialmente o teor de gorduras totais, podem influenciar a interação entre ureia e p-DAC.

Figura 12 – Curvas analíticas nos equipamentos utilizados: **(a)** Leite Integral; **(b)** Leite Desnatado.



Fonte: Autoria própria, 2025.

4.5.2 Figuras de Mérito

A determinação das figuras de mérito, que dizem respeito aos parâmetros de confiabilidade do método, também foi realizada em amostras de leites UHT integral (3,0% de gordura) e desnatado (0,5% de gordura).

A determinação da média de recuperação (Rec%) em concentrações médias e altas resultou em valores entre 86,9% e 105%, com coeficiente de variação (%CV) variando de 0,01% a 5,38%. Ou seja, pode-se observar que a metodologia proposta apresentou melhores resultados para amostras de leite integral, considerando os dados expostos. Valores entre 80% e 120% são considerados aceitáveis para testes de recuperação, conforme descrito nas diretrizes de validação de resultados[39,40]. Já a respeito dos coeficientes de variação, 5,38% pode ser considerado razoável, principalmente pela recuperação média estar próxima dos 100%.

Para a avaliação da precisão intra-dia e inter-dia, foram utilizadas amostras com concentração de 30 mg mL^{-1}. Os resultados apresentaram valores de precisão intra-dia entre 3,39% e 4,67%, demonstrando precisão aceitável de acordo com as diretrizes de validação[39,40]. A precisão inter-dia foi comparada em três dias distintos,

com variação entre 1,43% e 2,97%. Os menores valores obtidos, especialmente pelo fotômetro impresso em 3D, evidenciam a repetibilidade do método proposto, sendo adequado para a determinação de ureia em amostras de leite. Todos os resultados estão resumidos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Figuras de mérito do fotômetro impresso e espectrofotômetro (método de referência) para a determinação de ureia em leite integral (3,0% gordura).

Amostra de leite (tipo)		**Integral (3,0% de gordura)**	
Equipamento		**Espectrofotômetro**	**3D-Fotômetro**
LOQ (mg mL^{-1})		3,0	4,0
Faixa Linear (mg mL^{-1})		3,0 - 40	4,0 - 40
Curva Analítica		y = 0,018 x + 0,016	y = 0,015 x + 0,031
R²		0,997	0,986
Recuperação Média de Spike ± %CV	**Rec $_{média}$**	101 ± 3,20	105 ± 3,30
	Rec $_{alta}$	86,9 ± 2,00	105 ± 0,01
Precisão Intra-dia (% CV)		4,45	3,79
Precisão Inter-dia (% CV)		1,43	1,47

Fonte: Autoria própria, 2025.

Tabela 2 – Figuras de mérito do fotômetro impresso e espectrofotômetro (método de referência) para a determinação de ureia em leite desnatado (0,5% gordura).

Amostra de leite (tipo)		**Desnatado (0,5% de gordura)**	
Equipamento		**Espectrofotômetro**	**3D-Fotômetro**
LOQ (mg mL^{-1})		4,0	4,0
Faixa Linear (mg mL^{-1})		4,0 - 40	4,0 - 40
Curva Analítica		y = 0,027 x + 0,059	y = 0,017 x + 0,052
R²		0,986	0,997
Recuperação Média de Spike ± %CV	**Rec $_{média}$**	87,7 ± 3,51	97,6 ± 5,38
	Rec $_{alta}$	103 ± 1,40	101 ± 3,99
Precisão Intra-dia (% CV)		4,67	3,39
Precisão Inter-dia (% CV)		2,97	1,54

Fonte: Autoria própria, 2025.

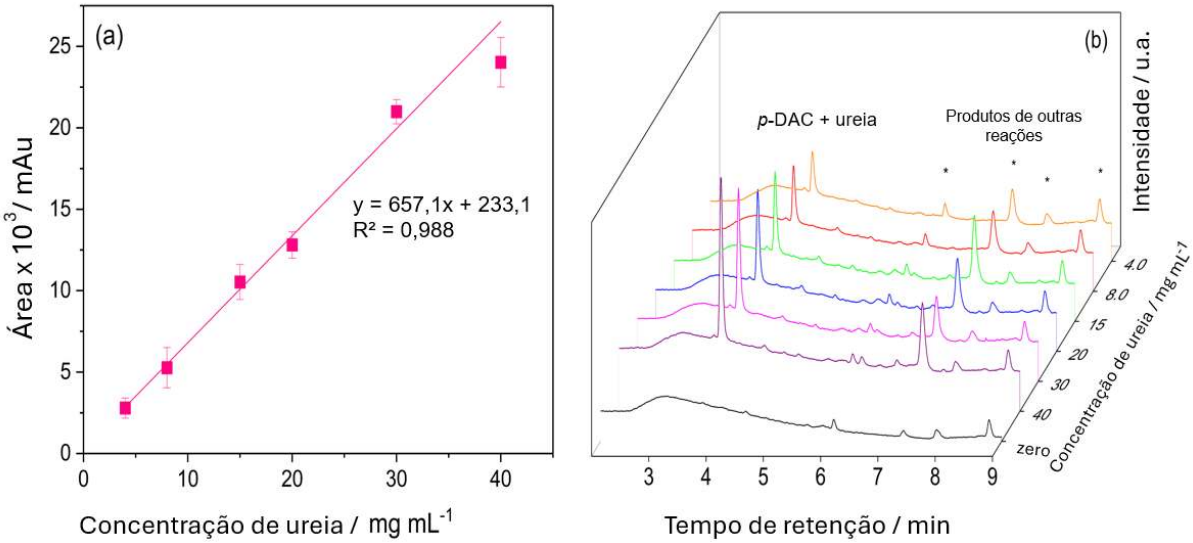
4.6 Quantificação da ureia em HPLC-UV-Vis

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis (HPLC-UV-Vis) foi utilizada como um dos métodos de referência e comparativo ao fotômetro impresso em 3D, em amostras de leite integral (3,0% de gordura).

Os resultados demonstraram linearidade com coeficiente de determinação (R^2) de 0,988, limite de quantificação (LOQ) de 3,0 mg mL^{-1} e faixa de trabalho entre 3,0 e 40 mg mL^{-1} (Figura 13a). O pico cromatográfico observado a partir da derivatização

da ureia com p-DAC apresentou fator de cauda (TF) de 1,5 e altura de pico de 5%, em conformidade com os regulamentos da Farmacopeia dos EUA[53], com tempo de retenção (t_R) de 3,82 ± 0,02 min, sendo que a área do pico aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de ureia. Quando o branco foi analisado, solução composta por soro de leite com p-DAC, não se observou pico no cromatograma nesse tempo de retenção (Figura 13b), demonstrando a seletividade do método.

Figura 13 – (a) Curva analítica do leite UHT integral obtida em HPLC-UV-Vis**; (b)** Cromatogramas da curva analítica de ureia em leite integral.



Fonte: Autoria própria, 2025.

De forma semelhante ao espectrofotômetro e ao fotômetro impresso em 3D, as figuras de mérito para o HPLC-UV-Vis foram determinadas, com valores de recuperação média e alta de 93,8% e 91,8%, respectivamente, e valores de CV% de 5,65% e 5,20%, em conformidade com as diretrizes de validação[39,40,54]. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com o espectrofotômetro e o fotômetro impresso em 3D (87% e 105%), se diferenciando em relação aos valores menores de CV% destes dois últimos equipamentos, entre 0,01% e 3,30% (Tabela 3).

As precisões intra e inter-dia foram baixas, com valores de 0,96% e 1,43%, respectivamente. Os baixos valores de %CV junto da variação dos valores de recuperação (%Rec) próximos a 5,0% indicam a repetibilidade do método, evidenciada, principalmente, pela concordância entre as medições obtidas com o espectrofotômetro e o fotômetro impresso em 3D para a mesma amostra de leite integral (3,0% de gordura)[39,40]. Esse fato demonstra que o método desenvolvido

também é preciso e exato, fornecendo resultados consistentes mesmo diante de variações operacionais (operador, equipamento, dia de análise, lote e marca do leite).

Tabela 3 – Figuras de mérito da quantificação da ureia do HPLC-UV-Vis (método de referência) para a determinação de ureia em leite integral (3,0% gordura).

Amostra de leite (tipo)		**Integral (3,0% de gordura)**
LOQ (mg mL^{-1})		3,0
Faixa Linear (mg mL^{-1})		3,0 - 40
Curva Analítica		y = 657,1 x + 233
R²		0,988
Recuperação Média de Spike ± %CV	**Rec $_{média}$**	93,8 ± 5,65
	Rec $_{alta}$	91,8 ± 5,20
Precisão Intra-dia (% CV)		0,96
Precisão Inter-dia (% CV)		1,43

Fonte: Autoria própria, 2025.

4.7 Determinação de ureia em diferentes tipos de leite

A determinação de ureia foi realizada em diferentes amostras de leite, todas contendo a mesma concentração de ureia (30 mg mL^{-1}). A quantificação foi conduzida separadamente, considerando o teor de gordura de cada amostra.

O leite integral, com maior teor lipídico, foi quantificado com base em suas curvas analíticas, construída em cada um dos equipamentos utilizados (espectrofotômetro, fotômetro impresso e HPLC-UV-Vis). Por sua vez, a curva analítica obtida para o leite desnatado (0,5% de gordura) foi utilizada para quantificar o leite semidesnatado (1,0% de gordura) e o leite zero lactose (1,0% de gordura), os quais apresentam teor lipídico semelhante (Tabela 4).

Os resultados demonstraram que o leite integral UHT foi o que apresentou melhor ajuste ao método proposto, tanto para o fotômetro impresso em 3D quanto para os equipamentos de referência, com concentrações variando entre 28,0 e 30,0 mg mL^{-1} e valores de %CV entre 1,70% e 2,47% (Tabela 4).

Para as amostras de leite desnatado, semidesnatado e zero lactose, observou-se que o fotômetro 3D-impresso apresentou valores menores de concentração, porém próximos entre si, de 23,3 a 24,4 mg mL^{-1} em comparação com 28,8 mg mL^{-1} obtidos pelo leite integral. E coeficientes de variação %CV entre 2,30 e 4,60%. Dessa forma, demonstrando menor sensibilidade e precisão nas amostras de leite com menor teor lipídico (desnatado, semidesnatado e zero lactose), além de maior variação nos

resultados (≤ 4,60%), quando comparado ao espectrofotômetro (≤ 3,29%) e ao HPLC-UV-Vis (≤ 2,47%).

No entanto, todos os valores de %CV permanecem abaixo de 5,00%, indicando que os resultados foram consistentes, repetíveis e aceitáveis, conforme os critérios definidos pelas diretrizes[39,40,54]. O fotômetro impresso em 3D se mostrou preciso, reprodutível, portátil e de baixo custo, alcançando valores de precisão comparáveis aos métodos de referência na determinação de ureia em amostras de leite, com resultados exatos.

Tabela 4 – Quantificação de ureia na concentração de 30 mg mL^{-1} utilizando 3D-impresso fotômetro, espectrofotômetro e HPLC-UV-Vis em diferentes tipos de leite.

Amostra de leite (% gordura)	**30 mg mL^{-1} de ureia ± %CV**		
	3D-fotômetro	**Espectrofotômetro**	**HPLC-UV-Vis**
Integral (3,0%)	28,0 ± 2,30	29,0 ± 1,70	30,0 ± 2,47
Desnatado (0,5%)	23,3 ± 4,00	28,9 ± 2,20	27,9 ± 1,70
Semi-desnatado (1,0%)	23,3 ± 4,60	25,0 ± 3,29	30,8 ± 2,10
Zero lactose (1,0%)	24,4 ± 2,65	24,9 ± 2,51	29,8 ± 0,11

Fonte: Autoria própria, 2025.

4.8 Análise estatística: ANOVA, teste-t, teste-F e comparação entre fotômetro impresso, espectrofotômetro e HPLC-UV-Vis

Os resultados da análise de variância (ANOVA) demonstraram que as curvas analíticas para as diferentes amostras de leite estão ajustadas, uma vez que os valores de F calculados são superiores aos críticos ($F_{calc} > F_{significância}$) (Tabela 5 e Tabela 6). Dessa forma, os modelos matemáticos ajustados descrevem adequadamente a concentração do analito obtida em cada equipamento. Além disso, os resultados obtidos pelos três equipamentos distintos foram comparados em pares para verificar a existência de variância entre as médias dos sinais analíticos, utilizando os testes t e F com 95% de confiança.

Os resultados de recuperação (Rec%) em concentrações média e alta (17 e 28 mg mL^{-1}) (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3) foram utilizados para os testes de hipótese e valores de significância, com base na hipótese nula (não há diferença entre os dois grupos) e nas hipóteses alternativas (existe diferença entre os grupos ou associação entre as variáveis), por meio dos testes F e t em amostras de leite integral e desnatado, bem como na comparação entre os equipamentos utilizados para a

quantificação de ureia (fotômetro impresso em 3D, espectrofotômetro e HPLC-UV-Vis).

O teste t pareado (95%) em amostras de leite integral (3,0% de gordura), para a comparação entre o fotômetro impresso em 3D e o espectrofotômetro, resultou em um valor de p bilateral de 0,81, superior ao p-valor pré-determinado, conhecido como $\alpha = 0,05$. O teste F para comparação de significância resultou em um valor de p unilateral de 0,17, também superior a $\alpha = 0,05$, confirmando que as variâncias são equivalentes. O teste t não pareado para as médias dos mesmos valores, assumindo variâncias equivalentes, resultou em um valor de p bilateral igual a 0,86, superior a $\alpha = 0,05$, descritos na Tabela 5. Com base nesses testes estatísticos, pode-se afirmar que a hipótese nula é verdadeira, sendo o valor de p a probabilidade de se obter um resultado igual ao observado nos dados.

A comparação estatística entre os resultados obtidos com o fotômetro impresso em 3D e o HPLC-UV-Vis foi realizada da mesma forma, em amostras de leite integral. O teste t (95%) foi aplicado aos pares de médias das seis concentrações, com o mesmo nível de confiança, resultando em um valor de p bilateral de 0,63, superior a $\alpha = 0,05$, evidenciando variâncias equivalentes. O teste F para análise das variâncias foi realizado, resultando em um valor de p unilateral de 0,39, também superior a $\alpha = 0,05$, confirmando a equivalência das variâncias (Tabela 5). Por fim, o teste t não pareado, assumindo variâncias iguais, resultou em um valor de p bilateral de 0,79, superior a $\alpha = 0,05$. Portanto, não há diferença significativa entre as variáveis de concentração obtidas com o fotômetro impresso em 3D e o HPLC-UV-Vis.

Na comparação estatística das amostras de leite desnatado entre o fotômetro impresso em 3D e o espectrofotômetro, o teste t (95%) apresentou valor de p bilateral de 0,97, superior a 0,05. O teste F mostrou valor de p unilateral de 0,42, também superior a $\alpha = 0,05$, confirmando que as variâncias são equivalentes entre os valores obtidos nos dois equipamentos na determinação de ureia em amostras de leite desnatado (Tabela 6).

Tabela 5 – Análise estatística da metodologia para detecção de ureia nos três equipamentos utilizados: ANOVA e teste F para o leite integral (3,0% gordura).

Amostra de leite (tipo)	**Integral (3,0% de gordura)**		
Parâmetro \ **Equipamento**	**Espectrofotômetro**	**3D-Fotômetro**	**HPLC-UV-Vis**
$F_{calculado}$	2012	250	558
$F_{significância}$	$9{,}62 \times 10^{-21}$	$3{,}47 \times 10^{-11}$	$7{,}23 \times 10^{-14}$
Número de observações	20	18	17
Desvio padrão	0,024	0,046	1370
Resultados análise estatística	**3D-Fotômetro / Espectrofotômetro**	**3D-Fotômetro / HPLC-UV-Vis**	
Teste t	$p_b = 0{,}81 > 0{,}05$	$p_b = 0{,}63 > 0{,}05$	
Teste F	$p = 0{,}17 > 0{,}05$	$p = 0{,}39 > 0{,}05$	

Fonte: Autoria própria, 2025.

Tabela 6 – Análise estatística da metodologia para detecção de ureia nos três equipamentos utilizados: ANOVA e teste F para o leite desnatado (0,5% gordura).

Amostra de leite (tipo)	**Desnatado (0,5% de gordura)**	
Parâmetro \ **Equipamento**	**Espectrofotômetro**	**3D-Fotômetro**
$F_{calculado}$	372	408
$F_{significância}$	$1{,}68 \times 10^{-12}$	$8{,}14 \times 10^{-13}$
Número de observações	17	17
Desvio padrão	0,072	0,042
Resultados análise estatística	**3D-Fotômetro / Espectrofotômetro**	
Teste t	$p_b = 0{,}97 > 0{,}05$	
Teste F	$p = 0{,}42 > 0{,}05$	

Fonte: Autoria própria, 2025.

Com base nos resultados estatísticos obtidos por meio da ANOVA, teste t e teste F, foi possível verificar que o fotômetro impresso em 3D apresenta precisão comparável à de equipamentos robustos, como o espectrofotômetro e o HPLC-UV-Vis, não havendo diferenças significativas entre os valores obtidos.

Esses resultados demonstram que o fotômetro impresso em 3D é um dispositivo portátil, de baixo custo, preciso e de alto desempenho, semelhante a instrumentos analíticos mais sofisticados e caros, sendo adequado para a determinação de ureia em amostras de leite, especialmente em locais de difícil acesso ou com infraestrutura limitada, possibilitando seu uso por pessoas em geral.

5. CONCLUSÃO

A reação de derivatização utilizando p-DAC para a determinação de ureia em amostras de leite, realizada com o fotômetro impresso em 3D, mostrou-se estável, fornecendo resultados precisos, exatos e confiáveis, comparáveis aos obtidos por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência, em diferentes tipos de leite. Da mesma forma, o método desenvolvido para o preparo das amostras, baseado no efeito salting-out promovido pelo sal $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ em meio ácido, foi essencial para a remoção de interferentes e concomitantes da amostra, permitindo a obtenção de uma solução límpida e, consequentemente, uma derivatização bem-sucedida com p-DAC.

Os métodos de quantificação de ureia em leite não apresentaram falhas de ajuste durante a validação, tanto no dispositivo desenvolvido quanto nos equipamentos de referência, os quais apresentaram curvas analíticas de calibração dentro de faixas lineares de trabalho semelhantes. Os valores de recuperação e repetibilidade estiveram em conformidade com as diretrizes de validação. Os testes estatísticos permitiram demonstrar que os resultados obtidos com o fotômetro impresso em 3D são semelhantes aos obtidos por espectrofotometria ou cromatografia líquida de alta eficiência, mesmo diante de uma matriz analítica complexa.

O dispositivo desenvolvido é uma solução inovadora e acessível, destacando-se pela portabilidade e baixo custo de produção (aproximadamente US$ 26), facilidade de reprodução e montagem, acessibilidade dos componentes eletrônicos e portabilidade para uso em ambientes externos ou locais com infraestrutura limitada. Adicionalmente, o sistema apresentou resultados precisos e exatos em ampla faixa de concentração, comparáveis aos obtidos com equipamentos comerciais de alto custo. Essa abordagem permite ampla exploração, não apenas para amostras de leite, mas também para diversos tipos de matrizes. Reforçando seu potencial de aplicação no acesso a tecnologias analíticas, oferecendo benefícios significativos para áreas como educação, indústria e agronegócio.

Como possíveis perspectivas futuras, tem-se o aprofundamento do estudo da reação descrita, explorando os produtos formados e os mecanismos de reação, podendo ser descrita de maneira mais precisa e assertiva. Fazendo uso dessas novas descobertas possibilitadas pela tecnologia proposta neste trabalho.

REFERÊNCIAS

[1] Basaran, B.; Özçifçi, Z.; Akcay, H. T.; Aytan, Ü. Microplastics in Branded Milk: Dietary Exposure and Risk Assessment. *Journal of Food Composition and Analysis* 2023, 123, 105611. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105611.

[2] Vannessa Souza Carvalho, V.; Rodrigues Mariano, J. A.; Oliveira, H. J. B. de; Vieira Da Silva, D. FRAUDES NO LEITE: TIPOS E PRINCIPAIS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE RESULTADOS. *Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro* 2024, 9 (1). https://doi.org/10.61164/rmnm.v9i1.2831.

[3] Martin, N. H.; Torres-Frenzel, P.; Wiedmann, M. Invited Review: Controlling Dairy Product Spoilage to Reduce Food Loss and Waste. *J Dairy Sci* 2021, 104 (2), 1251–1261. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130.

[4] Müller, T.; Rempel, C. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil – parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia* 2021, 9 (3), 122–129.

[5] Vissers, M. M. M.; Driehuis, F. On-Farm Hygienic Milk Production. In *Milk Processing and Quality Management*; John Wiley & Sons, Ltd, 2008; pp 1–22. https://doi.org/10.1002/9781444301649.ch1.

[6] Rodríguez-Díaz, J. M.; Calahorrano-Moreno, M. B.; Ordoñez-Bailon, J. J.; Baquerizo-Crespo, R. J.; Dueñas-Rivadeneira, A. A.; Maria, M. C. Contaminants in the Cow's Milk We Consume? Pasteurization and Other Technologies in the Elimination of Contaminants. *F1000Research*. F1000 Research Ltd 2022. https://doi.org/10.12688/f1000research.108779.1.

[7] Azad, T.; Ahmed, S. Common Milk Adulteration and Their Detection Techniques. *International Journal of Food Contamination*. BioMed Central Ltd. 2016. https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3.

[8] Ionescu, A.-D.; Cîrîc, A. I.; Begea, M. A Review of Milk Frauds and Adulterations from a Technological Perspective. *Applied Sciences* 2023, 13 (17). https://doi.org/10.3390/app13179821.

[9] Rodrigues, J. C.; Bezerra, C. S.; Lima, L. M. A.; Neves, D. D.; Paim, A. P. S.; Silva, W. E.; Lavorante, A. F. A Multicommuted System Using Bacterial Cellulose for Urease Immobilization and Copper (II)-MOF Colorimetric Sensor for Urea Spectrophotometric Determination in Milk. *Food Chem* 2024, 460, 140454. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140454.

[10] ANVISA. Esclarecimentos Sobre Os Riscos à Saúde Das Substâncias Ureia e Formol e Sua Adição Ao Leite. *Informe Técnico* No 53; 2013.

[11] Toledo, P. R. A. B.; Toci, A. T.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Fast and Simple Method for Identification of Adulteration of Cow's Milk with Urea Using Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Analytical Methods* 2017, 9 (45), 6357–6364. https://doi.org/10.1039/c7ay02354e.

[12] MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 39, DE 8 DE AGOSTO DE 2018 -. In Regras sobre definições, exigências, especificações, garantias, registro de produto, autorizações, embalagem, rotulagem, documentos fiscais, propaganda e tolerâncias dos fertilizantes minerais destinados; Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2018; p 49.

[13] MAPA. Esclarecimentos Sobre Os Riscos à Saúde Das Substâncias Ureia e Formol e Sua Adição Ao Leite. In *Informe Técnico No 53-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*; 2013; pp 1–4.

[14] FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs. CAC/RCP 41; Geneva, 1993.

[15] Guimarães, R.; Luiz, J.; Ribeiro, G.; Thierry, P.; Lúcio, R. T.; Gonçalves, C.; Duarte, F.; Luís, F.; Barioni, G.; Bueno, G.; Júnior, M. Uréia Na Alimentação de Vacas Leiteiras; Planaltina-DF, 2007.

[16] Coelho, K. O.; Valadão, L. dos R.; Nicolau, E. S.; Neves, R. B. S. Monitoramento Do Nitrogênio Uréico No Leite: Nutrição Animal, Qualidade Ambiental e Do Leite. *Alimentos e Alimentação Animal* 2021, 1, 68–80. https://doi.org/10.37885/210906099.

[17] Walstra, P.; Jenness, R.; Badings, H. T. *Dairy Chemistry and Physics*; John Wiley & Sons, Ltd: New York, 1984.

[18] UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) n.º 605/2010 da Comissão, de 2 de julho de 2010. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 175, 10 jul. 2010, p. 1.

[19] EUA – DEPARTAMENTO DE SAÚDE E SERVIÇOS HUMANOS. *Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance: 2015 revision* [revisão de 2015]. Public Health Service, Food and Drug Administration, Washington, D.C., 2015.

[20] Joolaei Ahranjani, P.; Kamine, D.; Zahra, E.; and Joolaei Ahranjani, P. A Systematic Review of Spectroscopic Techniques for Detecting Milk Adulteration. *Crit Rev Anal Chem* 2025, 1–32. https://doi.org/10.1080/10408347.2025.2477535.

[21] Warakaulle, S.; Mohamed, H.; Ranasinghe, M.; Shah, I.; Yanyang, X.; Chen, G.; Ayyash, M. M.; Vincent, D.; Kamal-Eldin, A. Advancement of Milk Protein Analysis: From Determination of Total Proteins to Their Identification and Quantification by Proteomic Approaches. *Journal of Food Composition and Analysis* 2024, 126, 105854. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105854.

[22] LATIMER, G. W. Jr. (ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 22. edição. Oxford: Oxford University Press, 2023.

[23] Sáez-Plaza, P.; Michałowski, T.; Navas, M. J.; Asuero, A. G.; Wybraniec, S. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Crit Rev Anal Chem* 2013, 43 (4), 178–223. https://doi.org/10.1080/10408347.2012.751786.

[24] Nandeshwar, R.; Mandal, P.; Tallur, S. Portable and Low-Cost Colorimetric Sensor for Detection of Urea in Milk Samples. *IEEE Sens J* 2023, 23 (14), 16287–16292. https://doi.org/10.1109/JSEN.2023.3282810.

[25] Suarez, W. T.; de Alvarenga Junior, B. R.; de Oliveira Krambeck Franco, M.; Gabriel, W. L.; de Oliveira, D. M.; dos Santos, V. B. In Situ Determination of Urea in Milk Employing a Portable and Low-Cost LED Photometer. *Food Anal Methods* 2018, 11 (4), 1149–1154. https://doi.org/10.1007/s12161-017-1087-8.

[26] Gonçalves, I. C.; Fernandes, G. M.; Rocha, F. R. P. Exploiting Digital Images and Videos for Urea Determination in Milk Based on Enzymatic Hydrolysis Monitoring. *Journal of Food Composition and Analysis* 2024, 125, 105745. https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2023.105745.

[27] Trivedi, U. B.; Lakshminarayana, D.; Kothari, I. L.; Patel, N. G.; Kapse, H. N.; Makhija, K. K.; Patel, P. B.; Panchal, C. J. Potentiometric Biosensor for Urea Determination in Milk. *Sens Actuators B Chem* 2009, 140 (1), 260–266. https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.04.022.

[28] Patari, S.; Datta, P.; Mahapatra, P. S. 3D Paper-Based Milk Adulteration Detection Device. *Sci Rep* 2022, 12 (1), 13657. https://doi.org/10.1038/s41598-022-17851-3.

[29] Gigante, A. C. Desenvolvimento de Método Limpo Para a Determinação de Ureia. Universidade Estadual Paulista, Dissertação de Mestrado em Química - PPG, 2011.

[30] Cross, S. N.; Quinteros, E.; Roberts, M. Surface Modification for the Collection and Identification of Fingerprints and Colorimetric Detection of Urea Nitrate. *J Forensic Sci* 2015, 60 (1), 193–196. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12558.

[31] Phonchai, A.; Rattana, S.; Thongprajukaew, K. A Portable Sol-Gel Urea Colorimetric Method for the Determination of Urea in Feedstuffs. *Food Chem* 2020, 319, 126545. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126545.

[32] Ruy, M. R. S. Desenvolvimento de Sistemas de Screening Utilizando Procedimentos Em Fluxo Para Monitoramento de Sulfonamidas Em Urina e Produtos de Origem Animal; Araraquara, 2010.

[33] Luiz, V. H. M.; Lima, L. S.; Rossini, E. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Paper Platform for Determination of Bumetanide in Human Urine Samples to Detect Doping in Sports Using Digital Image Analysis. *Microchemical Journal* 2019, 147 (March), 43–48. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.006.

[34] Agrawaal, H.; Thompson, J. E. Additive Manufacturing (3D Printing) for Analytical Chemistry. *Talanta Open* 2021, 3 (January), 100036. https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100036.

[35] Nesterenko, P. N. 3D Printing in Analytical Chemistry: Current State and Future. *Pure and Applied Chemistry* 2020, 92 (8), 1341–1355. https://doi.org/10.1515/pac-2020-0206.

[36] Wang, L.; Pumera, M. Recent Advances of 3D Printing in Analytical Chemistry: Focus on Microfluidic, Separation, and Extraction Devices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2021, 135, 116151. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116151.

[37] Lamarca, R. S.; Silva, J. P.; Varoni dos Santos, J. P.; Ayala-Durán, S. C.; Lima Gomes, P. C. F. de. Modular 3D-Printed Fluorometer/Photometer for Determination of Iron(II), Caffeine, and Ciprofloxacin in Pharmaceutical Samples. *RSC Adv* 2023, 13 (18), 12050–12058. https://doi.org/10.1039/d3ra01281f.

[38] Baumgartner, B.; Freitag, S.; Lendl, B. 3D Printing for Low-Cost and Versatile Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy. *Anal Chem* 2020, 92 (7), 4736–4741. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04043.

[39] Boqué, R.; Maroto, A.; Riu, J.; Rius, F. X. Validation of Analytical Methods. *Grasas y Aceites* 2002, 53 (6), 128–143. https://doi.org/10.1021/ac00257a001.

[40] INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. Revisão 09.; 2020.

[41] Bauland, J.; Famelart, M. H.; Bouhallab, S.; Jeantet, R.; Roustel, S.; Faiveley, M.; Croguennec, T. Addition of Calcium and Magnesium Chlorides as Simple Means of Varying Bound and Precipitated Minerals in Casein Micelle: Effect on Enzymatic Coagulation. *J Dairy Sci* 2020, 103 (11), 9923–9935. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18749.

[42] Rose, D.; Tessier, H. Effect of Various Salts on the Coagulation of Casein. *J Dairy Sci* 1959, 42 (6), 989–997. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90682-4.

[43] Thomar, P.; Benyahia, L.; Durand, D.; Nicolai, T. The Influence of Adding Monovalent Salt on the Rheology of Concentrated Sodium Caseinate Suspensions and the Solubility of Calcium Caseinate. *Int Dairy J* 2014, 37 (1), 48–54. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.02.007.

[44] Duarte, Â. J.; Carreira, R. L.; Junqueira, R. G.; Coelho, J. V.; Silvestre, M. P. C. Propriedades Emulsionantes E Solubilidade Da Caseína Bovina: 2. Efeito Da Adição De I. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 1998, 18 (3), 303–308. https://doi.org/10.1590/s0101-20611998000300009.

[45] Wu, K. Y.; Yang, T. X.; Li, Q. Y. The Effects of PH and NaCl Concentration on the Structure of β-Casein from Buffalo Milk. *Food Sci Nutr* 2021, 9 (5), 2436–2445. https://doi.org/10.1002/fsn3.2157.

[46] Purevsuren, B.; Davaajav, Y. Thermal Analysis of Casein. *J Therm Anal Calorim* 2001, 65 (1), 147–152. https://doi.org/10.1023/A:1011532819792.

[47] Siroëić, A. P.; Krehula, L. K.; Katanëić, Z.; Hrnjak-Murgić, Z. Characterization of Casein Fractions - Comparison of Commercial Casein and Casein Extracted from Cow's Milk. *Chem Biochem Eng Q* 2016, 30 (4), 501–509. https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2311.

[48] Zhu, N.; Qian, F.; Xu, X.; Wang, M.; Teng, Q. Thermogravimetric Experiment of Urea at Constant Temperatures. *Materials* 2021, 14 (20), 1–12. https://doi.org/10.3390/ma14206190.

[49] Jones, J. M.; Rollinson, A. N. Thermogravimetric Evolved Gas Analysis of Urea and Urea Solutions with Nickel Alumina Catalyst. *Thermochim Acta* 2013, 565, 39–45. https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.04.034.

[50] Barreneche, C.; Fernández, A. I.; Cabeza, L. F.; Cuypers, R. Thermophysical Characterization of Sorption TCM. *Energy Procedia* 2014, 48 (December), 273–279. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.02.032.

[51] Ebrahimian, V.; Nicolle, A.; Habchi, C. Detailed Modeling of the Evaporation and Thermal Decomposition of Urea-Water Solution in SCR Systems. *AIChE Journal* 2012, 58 (7), 1998–2009. https://doi.org/10.1002/aic.12736.

[52] Lin, L.; Wong, M.; Deeth, H. C.; Oh, H. E. Calcium-Induced Skim Milk Gels Using Different Calcium Salts. *Food Chem* 2018, 245, 97–103. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.10.081.

[53] U.S. Pharmacopoeia. In *Chromatography*; SO Coversheet version 2, Ed.; 2021; p G-20.

[54] ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC No 166 de 24 de Julho de 2017, Brasília - DF, 2017.