



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SISTEMA EM FLUXO MULTICOMUTADO EXPLORANDO A
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA E REAGENTE SÓLIDO NA
DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE UREIA EM
LEITE**

Julyana Cosme Rodrigues

Recife
agosto/2019

Julyana Cosme Rodrigues*

**SISTEMA EM FLUXO MULTICOMUTADO EXPLORANDO A
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA E REAGENTE SÓLIDO NA
DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE UREIA EM
LEITE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: André Fernando Lavorante

Coorientador: Wagner Eduardo da Silva

*** Bolsista FACEPE**

Recife

agosto/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R696s Rodrigues, Julyana Cosme
Sistema em fluxo multicomutado explorando a imobilização de
Enzima e reagente sólido na determinação espectrofotométrica de
Ureia em leite / Julyana Cosme Rodrigues. – 2019.
61 f. : il.

Orientador(a): André Fernando Lavorante.

Coorientador(a): Wagner Eduardo da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Química, Recife,
BR-PE, 2019.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Análise por injeção de fluxo 2. Leite 3. Ureia
4. Espectrofotometria I. Lavorante, André Fernando, orient. II. Silva,
Wagner Eduardo da, coorient. III. Título

CDD 540

Julyana Cosme Rodrigues

**SISTEMA EM FLUXO MULTICOMUTADO EXPLORANDO A
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA E REAGENTE SÓLIDO NA
DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE UREIA EM
LEITE**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

13/08/2019

Prof. Dr. André Fernando Lavorante (DQ- UFRPE) - **Orientador**

Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva (DQ - UFRPE) - **Coorientador**

Prof.^a Dr.^a Maria José de Filgueiras Gomes(DQ - UFRPE)- **Examinador externo**

Prof. Dr. Jandyson Machado dos Santos(DQ - UFRPE) - **Examinador interno**

Aos meus pais,

Risomar de Melo e Ivone Cosme

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proteger, guiar e abençoar. Por me proporcionar cada momento vivido, e me presentear com cada uma dessas pessoas citadas.

Aos meus pais, Ivone Cosme e Risomar de Melo, pela paciência, educação, respeito, e amor que me oferecem. E pelo incentivo aos estudos.

Ao meu noivo, Thales Walmir, por todo apoio, amor, paciência, companheirismo, amizade, e também por me ajudar a evoluir como ser humano.

A minha irmã pela inspiração que vem se tornando e pela amizade de sempre.

Ao meu amigo, Caio Bruno, nossa amizade foi além dos limites do nosso bairro e se tornou parceria de trabalho. Que seja para sempre!

A minha companheira de luta, Joicy Bianca, por todos os minutos que me dedicou e me ensinou.

Ao meu amigo da URFPE, Rodrigo Avelino, por cada momento que vivemos juntos e por sempre me ajudar.

Ao meu orientador, prof^o André Lavorante, pela orientação, disponibilidade, paciência e dedicação ao nosso trabalho.

Ao meu coorientador, Wagner Silva, pela paciência e orientação prestada durante essa jornada.

Aos meus amigos de sala de aula e luta, Raphaela Souza, Manoely Duarte, Driely Oliveira, Aldiceia, Mauriceia, Leonardo e Marcilio.

Aos meus amigos de laboratório (Arthur Araujo, Nathany de Paula, Larissa Mayara, Amanda Jordão, Carolina, Nayara Coelho, Rene Gomes, Thayna, José Ailtom, Vitor, Gabriela, Gabriel e Romulo) por cada conversa e momento compartilhado.

A CAPES, CNPQ e FACEPE pelos investimentos financeiros aos projetos que participei durante a minha vida acadêmica.

RESUMO

RODRIGUES, J.C. **SISTEMA EM FLUXO MULTICOMUTADO EXPLORANDO A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA E REAGENTE SÓLIDO NA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE UREIA EM LEITE**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Química. Programa de pós-graduação em química. Recife, 2019.

A detecção de ureia em concentrações acima de 14 mg dL^{-1} admite-se a possibilidade de ocorrência de fraudes no leite, o que não é possível de ser verificado através do método oficial, pois detecta apenas nitrogênio total. Neste trabalho, é proposto um sistema de análise em fluxo multicomutado para a determinação espectrofotométrica de ureia em leite de vaca empregando a enzima urease imobilizada em celulose bacteriana e o reagente sólido, MOF (metal-organic framework) como reagente colorimétrico. Na caracterização da MOF, os resultados de FTIR evidenciaram a presença dos grupos característicos da MOF-Cu²⁺ contendo íons carboxilatos como ligante. O procedimento analítico proposto foi baseado na reação de hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease, produzindo NH₄⁺, que reage com o MOF-Cu²⁺ formando do tetraminocobre (II), monitorado em 450nm. O sistema proposto é composto de duas minibombas solenoides, uma válvula solenoide de três vias, uma coluna confeccionada em polimetil-metacrilato (PMMA) composta por duas partes iguais, separadas por discos de sílica, onde ocorre a reação enzimática e, posteriormente, a reação colorimétrica e um espectrofotômetro. O controle do sistema foi desenvolvido empregando a programação de linguagem C, por meio de uma placa de arduino® UNO. Após a otimização do sistema, obteve-se respostas lineares entre 1,0 e 50,0 mg dL⁻¹ de ureia (R = 0,997, n = 11) com limites de detecção e quantificação estimados em 0,082 mg dL⁻¹ e 0,272 mg dL⁻¹ respectivamente, frequência analítica de 7 determinações por hora, consumo de solução de amostra de 0,8 mL, totalizando 1,4 mL de resíduo final, respectivamente. Estudos de potenciais interferentes demonstraram a seletividade do método proposto. Posteriormente, amostras de leite UHT, leite em pó e composto lácteo foram adquiridas nos mercados locais da região metropolitana do Recife e analisadas empregando o sistema proposto. Testes de adição e recuperação foram realizados para validação do procedimento, obtendo-se variação entre 90 e 103 %, demonstrando a eficiência do método proposto na detecção de ureia em amostras de leite. Comparado os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de referência (KIT Ureia CE) e, aplicando o teste F (precisão) e o teste t(exatidão), os resultados não apresentaram diferença significativa ao nível 95% de confiança. O sistema proposto apresentou-se robusto com uma estrutura de fácil implementação e operação viabilizando sua aplicação em análises de rotina.

Palavras Chave: Análise em fluxo, Multicomutação, Espectrofotometria UV-VIS, Leite, Ureia.

ABSTRACT

RODRIGUES, J.C. **MULTICOMMUTED FLOW SYSTEM EXPLORING ENZYME IMMOBILIZATION AND SOLID REAGENT AT SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF UREA IN MILK.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Química. Programa de pós-graduação em química. Recife, 2019.

Detection of urea in excess of the permitted concentrations is possible with the possibility of milk fraud, which is not possible through the official method. In this work, we propose a multicommutated flow analysis system for the spectrophotometric determination of urea in milk using the urease enzyme immobilized in bacterial cellulose and the solid reagent, MOF (metal-organic framework) as colorimetric reagent. In the characterization of the MOF, the FTIR results showed the presence of the characteristic groups of MOF-Cu⁺² containing carboxylate ions as ligand. The proposed analytical procedure was based on the urea hydrolysis reaction catalyzed by urease, producing NH⁴⁺, which reacts with MOF-Cu⁺² forming tetramino copper (II), monitored at 450nm. The proposed system consists of two solenoid mini-pumps, a three-way solenoid valve, a column made of polymethyl methacrylate (PMMA) composed of two equal parts, separated by silica discs, where the enzymatic reaction occurs and, later, the colorimetric reaction and a multichannel (UV / VIS) spectrophotometer, model USB 4000 (Ocean Optics®). System control was developed using C language programming through an arduino® UNO board. After system optimization, linear responses were obtained between 1.0 and 50.0 mg dL⁻¹ urea (R = 0.997, n = 11) with estimated detection and quantitation limits of 0.082 mg dL⁻¹ and 0.272 mg dL⁻¹ respectively, analytical frequency of 7 determinations per hour, 0.8 mL sample solution consumption, totaling 1.4 mL of residue, respectively. Potential interfering studies have shown the selectivity of the proposed method. Subsequently, samples of UHT milk, milk powder and milk compost were purchased from local markets in the metropolitan region of Recife and analyzed using the proposed system. Addition and recovery tests were performed to validate the procedure, obtaining variation between 90 and 103%, demonstrating the efficiency of the proposed method in detecting urea in milk samples. Comparing the results obtained by the proposed method and the reference method (KIT Urea CE) and applying the F test (precision) and the t test (accuracy), the results showed no significant difference at the 95% confidence level. The proposed system was robust with a structure of easy implementation and operation enabling its application in routine analysis.

Keywords: flow analysis, multicommutation, spectrophotometry UV-VIS, milk, urea.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Leite.....	3
2.1.2. Adulteração em leite	4
2.1.3. Adulteração em leite com adição ureia	6
2.1.4. Detecção de nitrogênio em leite.....	6
2.2. Imobilização de enzima.....	7
2.2.1. Celulose.....	8
2.3. Reagente Sólido (MOF)	9
2.4. Análise em fluxo e multicomutação.....	12
2.5. Determinação de ureia empregando o sistema de análise em fluxo	14
3 OBJETIVOS	17
3.1. Geral.....	17
3.2. Específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Soluções.....	18
4.1.1. Solução estoque	18
4.1.2. Soluções de trabalho	18
4.1.3. Amostras.....	18
4.1.4. Preparo da amostra	18
4.2. Extração da urease.....	19
4.2.1. Teste com a enzima.....	19

4.2.2. Imobilização da enzima.....	19
4.3. Síntese e caracterização do polímero de coordenação MOF-Cu ²⁺	20
4.4. Descrição geral do sistema em fluxo.....	21
4.5. Sistema de controle	22
4.6. Método em fluxo proposto para determinação espectrofotométrica de ureia em leite.....	22
4.7. Método de referência utilizado (kit ureia CE - LabTest).....	23
4.8. Avaliação do sistema em fluxo proposto	24
4.8.1. Estudo do pH	24
4.8.2. Estudo do tempo da reação	24
4.8.3. Estudo de razão volumétrica.....	24
4.8.4. Estudo da seletividade	25
4.8.5. Estudo da exatidão	25
4.8.6. Figuras de mérito.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. Aspectos gerais para o desenvolvimento do método proposto	27
5.2. Caracterização da MOF-Cu ⁺²	30
5.3. Avaliação do sistema em fluxo proposto	31
5.3.1. Estudo do pH.....	31
5.3.2. Estudo do volume da amostra.....	32
5.3.3. Estudo do tempo.....	32
5.4. Figuras de mérito	34
5.5. Estudo da seletividade	37
5.6. Estudo da exatidão	37
5.7. Análise das amostras.....	39
6 CONCLUSÃO.....	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acionamento das válvulas do sistema proposto.

Tabela 2. Coeficientes Lineares (A) e Angulares (B) e de Correlação (R), adquiridos através de curvas analíticas no sistema em fluxo realizadas em dias diferentes.

Tabela 3. Figuras de mérito do sistema de análise em fluxo proposto para determinação de ureia em leite.

Tabela 4. Comparação do método proposto com outros métodos para determinação de ureia.

Tabela 5: Resultados dos possíveis interferentes na reação com a MOF-Cu²⁺

Tabela 6: Teste de adição e recuperação para determinação de ureia em leite, aplicando o sistema em fluxo proposto.

Tabela 7. Comparativo entre o sistema proposto e o kit ureia CE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Métodos de imobilização de enzimas

Figura 2: Representação da MOF em três dimensões diferentes.

Figura 3: Classificação dos métodos de análise em fluxo.

Figura 4: Diagrama do sistema em fluxo.

Figura 5: teste da atividade enzimática. (A) com o sistema apenas contendo a enzima, em 1,3 e 5 min. de reação. (B) com o sistema proposto completo com os respectivos tempos de 1,3 e 5 min.

Figura 6: Espectro do produto da reação entre a hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease e a MOF-Cu²⁺. (Esquerdo). Banda de absorção da reação entre o CINH₄ e a MOF-Cu²⁺ levando a formação do [Cu(NH₃)₄]Cl₂ (direito).

Figura 7: Espectro do ácido oxálico, e Espectro da MOF-Cu²⁺ na região do infravermelho respectivamente.

Figura 9: Estudo do pH empregando solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹.

Figura 10: Estudo da influência do volume da amostra (ureia) 25mg dL⁻¹.

Figura 11: Estudo da influência do tempo reacional da enzima imobilizada (urease), concentração 25 mg dL⁻¹ de ureia.

Figura 12: Estudo da influência do tempo reacional do reagente sólido (MOF-Cu²⁺), concentração 25 mg dL⁻¹ de ureia.

Figura 13: Curva analítica com concentrações de 1 – 50 mg dL⁻¹ de ureia.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABLV	Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CFA	Continuous Flow Analysis
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FIA	Flow Injection Analysis
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UHT	Ultra High Temperature
USB	Universal Serial Bus
USP	Universidade de São Paulo
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

1. INTRODUÇÃO

O leite está presente na alimentação dos seres humanos desde os primeiros dias de vida até a fase adulta, pois é um alimento rico em proteínas, minerais e vitaminas. O seu uso está relacionado ao combate de doenças como osteoporose, artrite, artrose. De acordo com o artigo 475 do RIISPOA, “leite é denominado, sem outra especificação, o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta” (Brasil, 1978). Este alimento é produzido nas glândulas mamárias através de controle hormonal e seus componentes são produzidos nas células secretoras e alguns são adicionados ao leite diretamente a partir do sangue e do epitélio glandular. (Gonzalez, 2001). O leite é composto de cerca de cem mil constituintes distintos (Silva, 1997). Os mais citados e conhecidos são a gordura, as proteínas como caseína e albumina, glicídios como lactose, minerais, vitaminas e a água (NOYHOUSER et al., 2009).

Como o leite é um alimento essencial na nutrição humana, ele pode sofrer adulterações, durante o processo de ordenha, transporte, armazenamento e industrialização, até a chegada ao consumidor final. Essas adulterações podem ser classificadas como adulteração sanitária - adição de substâncias com a finalidade de mascarar deficiências do produto, podendo tais substâncias causarem mal à saúde, e adulteração econômica - adição de substâncias que não causam mal à saúde, mas aumentam o volume de leite. (A.B.L.V., 2007). Essas fraudes têm por objetivo de aumentar o lucro com a venda do produto (Pires, 2000). São inúmeras as substâncias utilizadas nas fraudes, como água – para o aumento do volume do leite, os reconstituintes – composto pelo soro do queijo, ureia, melanina, utilizados para recompor o teor de proteína do leite e mascarar adição de água. (Velloso, 2003), os conservantes – ácido salicílico, água oxigenada são algumas das substâncias adicionadas para inibir a proliferação de microrganismos no produto. (Tronco, 2010). Redutoras de acidez - hidróxido de sódio. (RODRIGUES, 2011).

A ureia é uma substância muito utilizada em fraldas, por ser de baixo custo e encontrada na urina do animal. É usada com o objetivo tanto para mascarar a “aguagem” do produto, pois apresenta a densidade próxima a do leite, quanto o teor proteico, devido ao fato de ser uma substância rica em nitrogênio.

Diante desses fatos, a concentração permitida dessa substância no leite varia entre 20 mg dL⁻¹ e 70 mg dL⁻¹, esta faixa de concentração é normal, pois é considerada

como oriunda da alimentação das vacas. Valores acima pode ser classificado como leite fraudado. (FSSAI, 2012). Efeitos da ureia acima da concentração permitida pode causar indigestão, acidez, úlceras, cancros e disfunções do rim. (TRIVEDI et al., 2009).

O método oficial, Kjeldahl, utilizado para detectar o teor proteico do leite é baseado no procedimento semi/micro-Kjeldahl, os quais detectam nitrogênio total, onde ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio por meio da digestão com ácido sulfúrico e, posterior, destilação com liberação da amônia, que é coletada em solução ácida e, em seguida, titulada (Brasil, 2006). Porém, este método não distingue o nitrogênio proteico de não proteico. Nessa perspectiva, é proposto o desenvolvimento de um procedimento analítico em fluxo explorando a imobilização da enzima urease em celulose bacteriana e de reagente sólido (MOF-Cu²⁺) para determinação espectrofotométrica de ureia em leite. Neste sentido, pretendeu-se a construção de um módulo de análise compacto e robusto minimizando o consumo de reagentes e geração de efluentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite

Por ser um alimento que se encontra presente na dieta humana desde a infância, é considerado de suma importância devido ao seu elevado valor nutritivo, sendo fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas (Souza et al., 2009). O leite é considerado uma suspensão por apresentar certa quantidade de células epiteliais e leucócitos (Bacila, 2003). É gerado no úbere (glândula mamária do animal), seus constituintes são oriundos das células secretoras, do sangue e também do epitélio glandular (Gonzalez, 2001). Segundo a agência de informação EMBRAPA agronegócio do leite, a água é o principal constituinte do leite, representando 87% de sua composição, o restante é composto por elementos sólidos, sendo os principais, lipídios, carboidratos (lactose, glicose e a galactose), proteínas (albumina: α e β ; caseínas: α_1 , α_2 , β , γ e k; imunoglobulinas e proteose-peptonas), sais minerais (cálcio, magnésio e fósforo), vitaminas (A, D, E e K), e enzimas (peroxidases, catalase e fosfatase) (Gonzalez, 2001). Porém, a composição pode sofrer mudanças devido os diversos fatores como a alimentação da vaca, doenças, período de lactação, ordenhas, condições de estocagem, transporte e ocorrência de adulterações. As características físico-químicas do leite devem estar de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado contido na Instrução Normativa nº 62 do MAPA, que determina que o leite integral deve atender os parâmetros mínimos de gordura de 3 g/100 g, densidade relativa a 15 °C variando entre 1,028 e 1,034, acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100 mL, teor mínimo do extrato seco desengordurado de 8,4 g/100 g, índice crioscópico entre - 0,512 °C e -0,53 °C e teor mínimo de proteína de 2,9 g / 100 g (BRASIL, 2011).

O leite fresco possui sabor levemente pronunciado, devido à relação entre lactose e cloretos, apresentando-se como doce e salgado, não ácido e não amargo, podendo haver variações devido a fatores como a ocorrência de infecção e a alimentação do animal. A cor branca é devido a dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A acidez é devido a caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. O aumento da acidez é determinado pela transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a chamada acidez desenvolvida do leite. O pH varia entre 6,6 e 6,8, a 25 °C. Porém, pode apresentar um pH levemente alcalino

devido aos animais apresentam infecção do tipo mamite. (Silva, 1997). A densidade do leite tem valor médio de 1,032 g/mL. O alto teor de gordura presente no leite leva a uma menor densidade em relação ao leite com baixo teor de gordura, devido ao aumento do extrato seco desengordurado que acompanha o aumento no teor de gordura. O ponto de congelamento do leite sofre influência de diversos fatores relacionados com o animal, o ambiente e o processamento industrial. Em um leite que possui 12,5% de extrato seco (4,75% de lactose e 0,1% de cloretos), o ponto de congelamento aproximado deve ser -0,531 °C, devido a diminuição do ponto de congelamento causado pela lactose (-0,296 °C), pelos sais (-0,119 °C) e por outros constituintes dissolvidos (ureia, dióxido de carbono). A presença de substâncias dissolvidas no leite pode levar ao aumento do ponto de ebulição, tornando-o levemente maior que o da água. As temperaturas médias de ebulição, ao nível do mar, situam-se entre 100 e 101 °C. A viscosidade do leite é devido à presença de proteínas e lipídios cuja a viscosidade é maior que a água, podendo sofrer alterações com o processamento industrial. Em média, a condutividade do leite varia entre 4,61 mS/cm a 4,92 mS/cm. Fatores como a ação de micro-organismos, fase de lactação, intervalo entre as ordenhas, alimentação, genética do animal e fraudes do produto, podem causar alterações nesses parâmetros físico-químicos do leite (OLIVEIRA, 2010).

2.1.2. Adulteração em leite

O leite vem sendo alvo de um grande número adulterações, estas são realizadas com vários objetivos, dentre eles o mais objetivado é aumentar o lucro. Algumas substâncias utilizadas são: a água, soro de leite, neutralizantes, reconstituintes de densidade e crioscopia. (Kartheeh, 2011). A prática de fraude em leite pode trazer grandes consequências, como alterar a qualidade dos produtos, reduzir o tempo de vida de prateleira, diminuir o valor nutricional e coloca a saúde dos consumidores em risco pela possível presença de determinadas substâncias prejudiciais à saúde humana. (CORTEZ, 2010).

A adição de água ao leite tem por finalidade o aumento do volume do produto, gerando assim maior rendimento, porém modifica as características físico-químicas dele. Com o objetivo de mascarar a adição de água no leite (aguagem), são utilizadas algumas substâncias chamadas de reconstituintes, que quando adicionadas recuperam

a densidade e o ponto de congelamento do produto fraudado. Algumas das substâncias e misturas são os cloretos, urina de gado, açúcares, etanol, amido modificado, dextrina e soro de leite (Velloso, 2003). A adulteração por adição de soro ao leite fluido é uma das mais praticadas. O soro utilizado neste tipo de fraude é um subproduto da fabricação do queijo. A finalidade dessa fraude visa o lucro e a quantidade de proteína, aumentando falsamente o volume de leite (Carvalho, 2013). A legislação brasileira, e de todos os países desenvolvidos, proíbe a adição de soro de queijo ao leite de consumo. Com a adição dessa substância o produto vendido deverá ser rotulado de "bebida láctea" e não poderia ser considerado leite (tipo A, B, C, esterilizado, etc.) (DRACZ, 1996).

Os conservantes empregados para impedir a proliferação dos microrganismos no leite que levariam a diminuição do tempo de vida útil do produto em prateleira. Dentre as substâncias mais empregadas estão o peróxido de hidrogênio, ácido bórico, ácido salicílico, dicromato de potássio, formaldeído, cloro e hipoclorito (TRONCO, 2010). Substâncias básicas como o bicarbonato de sódio e o hidróxido de sódio são adicionados para recompor o pH natural do leite (pH 6,4 a 6,8), o ácido láctico, um dos elementos que compõe o leite, diminui o pH levando a formação do chamado "leite azedo". A adição dessas substâncias neutralizam o pH do produto. (RODRIGUES, 2011).

Várias substâncias podem aumentar o teor de proteína do leite, como a melamina, ureia, soro do leite. O principal objetivo desta fraude é o aumento do valor na venda do produto. Na china em 2008, milhares de crianças foram hospitalizadas devido a intoxicação pela melamina adicionada no leite (Xin, 2008; Tunick, 2009). Como o leite diluído apresenta uma concentração proteica menor, a melamina é adicionada para que a diminuição do teor de proteínas não seja detectada, uma vez que a adição fraudulenta dessa substância mascara a adulteração, alterando os níveis de nitrogênio e distorcendo os resultados da análise de proteína bruta (ESCOBAR, 2010).

Segundo a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos, a ureia é o produto mais susceptível a ser empregado no mascaramento do teor de proteína do leite. A partir de concentrações acima de 70 mg dL⁻¹ a ureia tem efeitos prejudiciais à saúde humana, podendo causar indigestão, insuficiência renal, obstrução do trato urinário, hemorragia gastrointestinal e câncer (NIKOLELI, 2010).

2.1.3. Adulteração de leite com adição de ureia

O consumo de leite fraudado com ureia, em doses baixas, causa pouca toxicidade para os seres humanos, porém representa danos nutricionais, uma vez que está é também utilizada para mascarar a quantidade de proteína no leite (Anvisa, 2013). A ureia é utilizada para disfarçar a aguagem do leite e sua densidade, podendo ser de origem animal (urina), ou antropogênica, (formol). Como a urina tem densidade muito próxima à do leite, a alteração é muito difícil de ser detectada. (BEHMER, 1987).

A ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), classificada como amida é uma substância encontrada na urina dos mamíferos como produto natural do metabolismo de proteínas e aminoácidos (arginina, citrulina e ornitina). Como é encontrada naturalmente no leite em baixa concentração, é amplamente usado em fraudes por causa do seu baixo custo (Wu e Zhang, 2013). Em relação ao teor de nitrogênio proteico e não proteico encontrado no leite, a parte proteica 80% é formada pela caseína e 20% pelas proteínas do soro. E a não proteica, o nitrogênio ureico encontra-se entre 30% e 50% do total, sendo o restante formado, principalmente, pela creatinina, ácido úrico, aminoácidos e amônia. (ROSELER, 1993; BRODERICK E CLAYTON, 1997).

2.1.4. Detecção de nitrogênio em leite

Uma das fraudes no leite envolve a adição de substâncias ricas em nitrogênio com a finalidade de aumentar o teor de proteína. Esse tipo de adulteração é muito usual porque o método oficial determina o teor de nitrogênio total, assim não distingue o nitrogênio proteico (NP) do não proteico (NNP). A ureia, o soro do leite e a melamina são os principais adulterantes neste tipo de fraude.

Segundo a instrução normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, os métodos oficiais para a determinação de proteína do leite são o semi e o micro-Kjeldahl. Os quais baseiam-se na transformação do nitrogênio da amostra em amônio através da digestão com ácido sulfúrico e, posterior, destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada com NaOH.

Métodos analíticos baseados nas técnicas de cromatografia líquida e gasosa, HPLC e GC, (He et al., 2014); espectroscopias NIR e MID de infravermelho (Jha et al. 2015); Raman (Zhang et al. 2010) e detecção espectrofotométrica (Zou et al. 2014) tem

sido desenvolvidas para a detecção de ureia em amostras de leite. Porém, empregam preparo de amostra longos e utilizam quantidade de reagente grande.

2.2. Imobilização de enzima

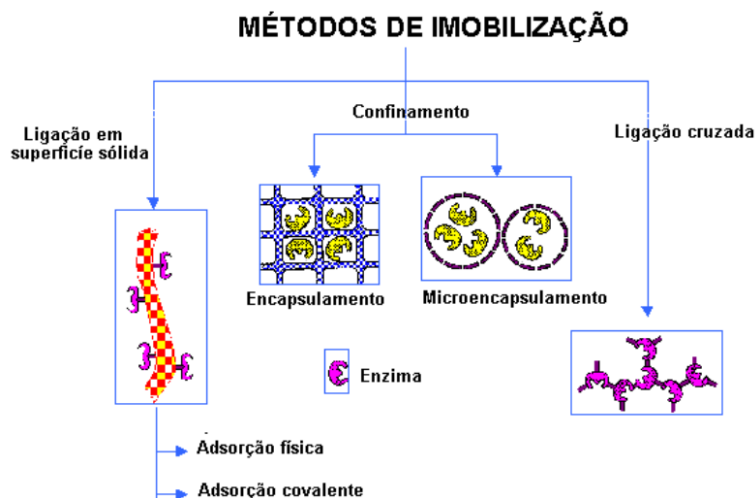
Uma enzima imobilizada pode ser definida como uma enzima que está fisicamente confinada em uma certa região definida, enquanto mantém sua atividade catalítica (ZHAO et al., 2015).

Na reação enzimática, que ocorre na presença de enzima, a mesma se comporta como um catalisador diminuindo assim o tempo reacional quando comparada a uma reação não catalisada. Porém, é necessário o controle da temperatura e pH do meio para que as enzimas não sofram desnaturação e perca a sua atividade catalítica (SOLOMONS, 1996 E VOET; VOET, 2006).

O número de trabalhos utilizando enzimas imobilizadas tem crescido devido ao fato de que elas apresentam uma maior estabilidade, maior eficiência e menor custo, quando comparadas com enzimas em solução (Taylor, 1986). As técnicas de imobilização são de grande importância, pois proporciona o reaproveitamento da enzima, aumenta sua estabilidade, reduz os custos, e em alguns casos pode aumentara atividade enzimática. Porém esses fatores dependem da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização.

As imobilizações podem ser: adsorção – interações físicas entre a enzima e o material de suporte; aprisionamento – a enzima fica retida no interior do material utilizado e esses possibilita a interação com o reagente devido a porosidade; ligação covalente – a enzima se liga ao material de suporte por ligação covalente; e ligação química covalente cruzada – uma ligação intermediada por um agente mediador entre a enzima e o suporte. (FATIBELLO-FILHO, 1992).

Figura 1: Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: – Enzimologia Industrial. M.A.Z. Coelho.

A imobilização por ligação cruzada é a mais utilizada na análise em fluxo, onde se tem a sílica modificada, como material de apoio, ligada covalentemente a um agente bi ou multifuncional, como o gluteraldeído por exemplo, que se liga a enzima (DALLAVACHIA, 2004; MATEO ET AL., 2007 E BLIBECH ET AL., 2011).

A celulose bacteriana também pode ser utilizada como suporte físico no processo de imobilização de enzimas, e este tipo de imobilização é classificado como do tipo natural, através de ligações covalentes entre a enzima e a celulose. Porém é preciso adicionar um grupo espaçador (grupo glicina, epóxi, anidrido succínico) entre a matriz e a enzima, diminuindo o impedimento estérico entre elas. Após a adição do grupo espaçador na celulose, a mesma é chamada de funcionalizada, e está pronta para imobilizar a enzima (LIU; CHEN, 2016).

2.2.1. Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$), é responsável pela estrutura das paredes celulares das plantas, e pode ser produzida por vários organismos, como fungos, algas e bactérias. É um polímero formado por uma cadeia linear não ramificada de moléculas de glicose formado por ligações do tipo $\beta(1-4)$ glicosídica (ROSS et al., 1991).

A celulose bacteriana (CB) possui a mesma fórmula química que a celulose vegetal, porém suas fibras apresentam propriedades distintas como a alta resistência

mecânica e à tração, a possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos. A CB apresenta maior pureza, maior cristalinidade, grande poder de absorção de água, além de um baixo grau de polimerização e biocompatibilidade. (DONINI et al., 2010).

A CB é produzida por diversos gêneros de bactérias, sendo o gênero *Komagataeibacter* (reclassificado, 2013) foi o primeiro a ser documentado por Adrian Brown em 1886. Sendo, atualmente, um organismo modelo de estudos sobre celulose. Este microrganismo pode ser encontrado em frutas e vegetais, são não patógenos, Gram-negativos, aeróbicos, e produzem celulose em forma de película na interface líquido-ar. (KLEMM et al., 2011; IYER et al., 2010; WATANABE et al., 1998).

Outras bactérias podem produzir celulose, como a *Agrobacterium tumefaciens*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Achromobacter Sarcina*. (Czaja, 2006). A CB é um biopolímero flexível, constituído por fibras mais finas e poros menores do que as da celulose vegetal. Muitas aplicações já são conhecidas, tais como, a imobilização da enzima lipase em celulose e nanocristais de celulose bacteriana através de ligação covalente (Brisola, 2018), a imobilização da enzima lipase B da levedura *Candida antartica* imobilizada em micropartículas de titanossilicato lamelar AM-1 e celulose bacteriana (SILVA, 2012).

2.3. Reagente sólido (MOF)

No ano de 1954 o conceito de estruturas cristalinas inorgânicas foi utilizado por Wells, onde os íons metálicos, atuando como nós, ligam-se entre si através de um espaçador, tais como as moléculas orgânicas multidentadas dos polímeros de coordenação (DANTAS et al., 2014).

Porém só em 1994 e o termo “Metal Organic Framework” surgiu na literatura de periódicos. Um grande avanço no estudo dos polímeros de coordenação ocorreu quando começou a se desenvolver materiais com porosidade permanente, estáveis térmica e quimicamente, e sem a presença de moléculas visitantes (DANTAS et al., 2014).

Os MOFs (metal-organic framework), são chamados de polímeros de coordenação (Arstad, 2008). Segundo a IUPAC são como “uma rede de coordenação com ligantes orgânicos contendo cavidades potencialmente vazias” (Batten et. al.,

2013). São compostos que constituem uma classe de materiais cristalinos porosos, compostos de ligações contendo metais, conectados por pontes de ligantes orgânicos e com ligações fortes de coordenação. Possuem estruturas geométrica e cristalina bem definidas (LI et al., 2011).

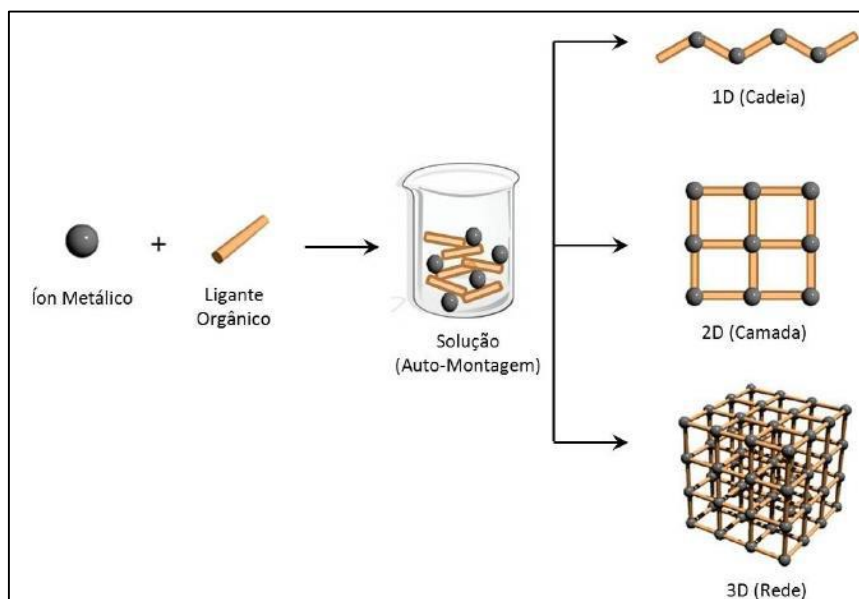
Na síntese de MOFs é utilizado como fonte metálica, o sal solúvel do metal precursor, com o respectivo ligante orgânico, um ácido carboxílico ou moléculas imidazólicas. Os parâmetros decisivos avaliados na síntese são o pH do meio, proporção entre os reagentes e tempo e temperatura final da reação. Dentre as principais metodologias sintéticas estão os processos de difusão de solventes; hidrotermal; microondas; eletroquímica e ionotermal. Preferencialmente, opta-se pelas sínteses hidrotermais, devido sua praticidade e não-contato com solventes orgânicos voláteis e potencialmente tóxicos (ALBUQUERQUE, 2015).

Essas redes de compostos são tridimensionais formada por ligação com metal e pontes com grupos de ligantes orgânicos. As estruturas metal-orgânicas podem ser projetadas de forma sistemática baseada na mudança de natureza do ligante orgânico, bem como a forma de ligação das estruturas para formar uma rede. Esta adaptabilidade dos MOFs é a característica fundamental que os distingue dos demais tradicionais materiais porosos (SABOUNI; KAZEMIAN; SOHRAB, 2014).

Os polímeros de coordenação (PCPs) são considerados os precursores dos MOFs, segundo estudos de Hoskins e Robson (Janiak e Vieth, 2010). Xing (2009), Robson e seus colaboradores, em 1990, sintetizaram uma estrutura porosa $[Cu(C_6H_4CN)_4]^+$ na qual ânions poderiam ser reversivelmente inseridos e retirados dos poros. Esta adaptabilidade notável dos MOFs é a característica fundamental que os distingue dos demais tradicionais materiais porosos, como por exemplo, as zeólitas (SABOUNI; KAZEMIAN; SOHRAB, 2014).

As redes de coordenação têm estrutura de uma, duas ou três dimensões (figura 2), são estruturas cristalinas ou amorfas bem definidas, contendo diversidade estrutural, estabilidade térmica, alta área superficial, com grande interesse para o desenvolvimento tecnológico e aplicação em diversas áreas.

Figura 2: Representação da MOF em três dimensões diferentes



Fonte: Sumida et al, 2011.

Durante o planejamento de uma MOF observa-se a flexibilidade do ligante, sua funcionalização e seu comprimento (distância entre os sítios de coordenação), devido à possibilidade de variação das propriedades térmicas e mecânicas da mesma.

Durante a última década, um grande número de pesquisa tem sido realizada sobre MOFs e o número de publicações vem aumentando devido a suas diversas aplicações em várias áreas do conhecimento científico como armazenamento ou separação de gases, catálise, magnetismo, luminescência e “drug delivery”, entre outras (ROWSELL E YAGHI,2004; GANGU et al., 2016).

O emprego de reagentes sólidos é explorado em vários segmentos, como adsorventes de CO₂ para reduzir os impactos no efeito estufa na atmosfera, utilizando NH₂-MIL-53(Al). (Philippi, 2017), como adsorvente para extração de Hidrocarboneto Policíclico Aromático em amostras aquosas (Vilhena, 2014) e também um sistema em fluxo para determinação de açúcar redutor em água de coco e sucos, utilizando o composto de coordenação cobre (II) - 4,4'-bipiridina. Porém existem poucos trabalhos na área de química analítica que utilizam reagentes sólidos. Essa proposta de usar o reagente sólido permite uma melhora no sinal analítico, o sistema proposto torna-se simples e operacional sendo bastante versátil (BELIAN et al, 2015).

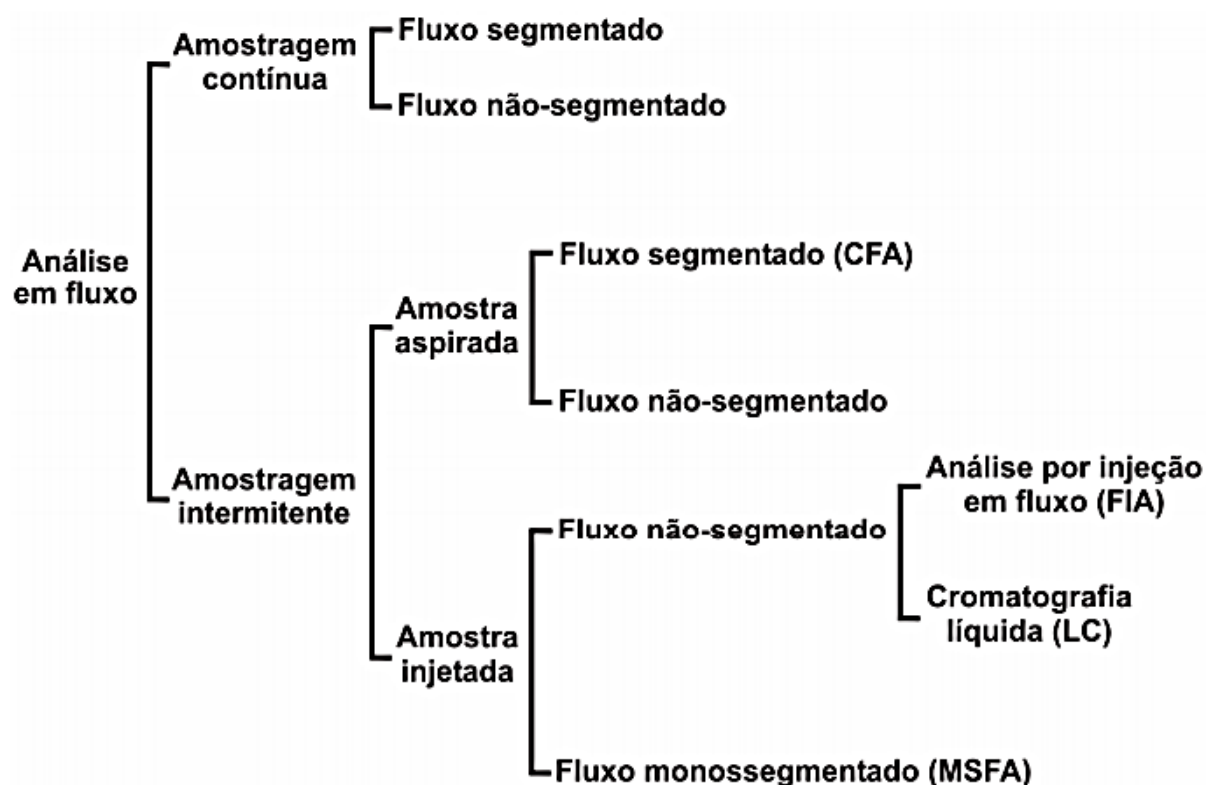
2.4. Análise em fluxo e multicomutação

Análise em fluxo (*Flow Injection Analysis* – FIA) é um processo que teve início em 1957, o qual se possibilita o desenvolvimento de procedimentos analíticos com alta produtividade, empregando equipamentos de baixo custo. O sistema de análise em fluxo é geralmente dividido em quatro partes: propulsão dos fluídos, injeção da amostra, reação e detecção (REIS, 1989).

Diferentemente dos métodos clássicos de análise, onde são utilizados as variadas vidrarias e grandes quantidades de soluções de reagentes e amostras, o sistema de análise em fluxo permite o mesmo estudo, porém utiliza um volume menor de reagentes gerando assim uma quantidade pequena de rejeitos, e um menor custo.

Esta ferramenta analítica consiste na introdução de solução de reagente e de amostra em um fluido carregador que a transporta em direção ao detector, onde pode ocorrer durante o transporte adição de reagentes, reações químicas, tratamentos de concentração, de diluição e de separação. A solução carregadora pode ser uma solução inerte a amostra ou até mesmo um reagente. Esta técnica foi implantada no Brasil em 1976 por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) (Ruzicka, 1976). O sinal analítico de um sistema de análise por injeção em fluxo apresenta-se na forma de pico. O gráfico resultante do registro do sinal analítico em um sistema FIA recebe o nome de diagrama. (CENA/USP) (RUZICKA, 1976).

Os sistemas automáticos de análise em fluxo tem sido alvo de muitas pesquisas devido, principalmente, à alta frequência analítica e ao emprego de microquantidades de reagentes. A grande aceitação desse processo de análise química se deve a grande versatilidade, podendo ser disposto de várias formas, proporcionando também rapidez, diminuição de reagentes e uma redução significativa na geração de efluentes. De acordo com o tipo de fluxo, o sistema pode ser definido como segmentado ou não segmentado. Na Figura 3, é apresentado a classificação dos métodos de análise em fluxo de acordo com o tipo de amostragem.



Fonte: Adaptado de Zagatto, 1999.

O sistema de análise em fluxo apresenta uma alta frequência de amostragem, este fato é devido as medidas em um estado não-estacionário, com dispersão controlada, e com curto tempo de reação. Na otimização do consumo dos reagentes deve-se levar em consideração a estequiometria da reação e o número de ciclos de amostragem. A otimização desses parâmetros permite obter resultados mais precisos. (MCKELVIE, 2008).

No sistema FIA, inicialmente, eram utilizadas seringas com agulhas hipodérmicas para injeção das soluções de amostras. Dessa maneira ocorria um problema em relação a um aumento brusco da pressão hidrodinâmica do sistema e a reprodutibilidade das medidas, influenciando consideravelmente na precisão dos resultados. (Ruzicka, 2008). Na busca de controlar este problema, Bergamin e colaboradores desenvolveram um injetor proporcional. Com este dispositivo a reprodutibilidade não depende da habilidade do operador, pois não ocorre variação da pressão do sistema. Neste caso, ocorre uma comutação entre a posição de amostragem

e a posição de injeção através de um acionamento manual. Na posição de injeção a alça de amostragem é colocada na posição de inserção e a amostra entra no percurso analítico indo até o detector. (BERGAMIN, 1978; REIS, 1989).

O uso de outro dispositivo também ajudou bastante na utilização do sistema FIA, a válvula de seis vias ou válvula rotativa hexagonal. Este dispositivo combinado à bomba peristáltica auxilia na injeção da amostra no percurso. O desempenho da válvula de seis vias ocorre em duas posições, uma ocorre a inserção da solução da amostra e reagente no percurso analítico e a outra, o transporte da zona de amostragem para o detector. Este tipo de válvula é estável e reproduzível, porém, devido a sua configuração fixa limita sua aplicação. Outros tipos de válvulas foram utilizados em sistemas FIA e permitiram mais flexibilidade ao sistema, tais como, a válvula solenoide, de três vias e de estrangulamento, que através de um computador podem ser incluídas em tempos diferentes no sistema maior gerenciamento das soluções. (REIS, 1993).

As vantagens do sistema FIA são: o consumo de reagentes reduzido, o uso de poucas vidrarias, uma vez que a análise acontece dentro do percurso analítico. Redução do custo de análise, já que não necessita de equipamentos de alto custo. Alta produtividade, devido a frequência analítica alta, reduzindo o tempo de análise e a baixa participação do analista. (MCKELVIE, 2008).

Análise em fluxo multicomutado, (Multicommutation Flow Analysis - MFA) foi proposta por Reis na década de 90, sendo considerada uma ferramenta analítica que consiste na inserção de soluções de amostra, de reagentes num percurso analítico numa sequência pré-determinada e controlada por computador, onde de forma alternada ou simultâneas soluções são inseridas no percurso analítico formando a zona de amostragem, a qual é transportada em direção ao detector, proporcionando melhor condição de mistura das soluções (REIS, 1994).

2.5. Determinação de ureia empregando sistema de análise em fluxo

Adulteração do leite com produtos químicos sintéticos é uma séria preocupação com a saúde humana. A ureia por ser uma substância já encontrada no leite devido a alimentação do animal, e de baixo custo, é facilmente utilizada como adulterante. Vários procedimentos para determinar a ureia em diferentes matrizes foram propostas

empregando condutométrica (Rezende, 2008), potenciométrica (Silva et al, 2000) e detecção espectrofotométrica (LUCA, 2001).

Como a determinação espectrofotométrica de ureia em plasma de sangue através de um sistema em fluxo empregando a enzima urease de feijão das espécies *Canavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* quebradas em pedaços definidos (0,5 – 1,0 mm) e colocadas em minicolunas para catalisar a hidrólise da ureia. O sistema em fluxo empregado utilizou dois reagentes (solução de salicilato e solução de hipoclorito sódio) que eram inseridos através de um injetor comutador, apenas a amostra passava pela minicoluna e no ponto de confluência os reagentes se misturavam e eram levados ao banho-maria com temperatura controlada para depois passar pelo detector. (Luca, 2001). Este trabalho demonstrou bons resultados, contudo o tempo de uso da urease é bastante curto, de apenas uma semana e o tempo de condicionamento na minicoluna é consideravelmente grande de 2h.

Suarez e colaboradores propuseram um sistema em fluxo multicomutado utilizando a enzima urease de “feijão de porco” (*Canavalia ensiformis*), os fragmentos de até 350µm foram imobilizados com glutaraldeído para detecção de ureia em leite. O sistema em fluxo foi construído em cerâmica com entrada e saída fixas. Composto por quatro entradas 2 reagentes, o hipoclorito e uma solução de salicilato e de nitroprussiato em meio alcalino, a solução carregadora (água demonizada) e a amostra. A concentração de ureia foi monitorada usando a reação de Berthelot. (Suarez et al, 2010). Neste trabalho a própria semente é imobilizada, portanto a imobilização tem um tempo de uso menor do que quando é extraída a enzima e depois imobilizada.

No sistema proposto por De Faria e colaboradores, a fonte de urease é utilizada na sua forma natural, o que diminui a quantidade de análises por ciclo do sistema, foi desenvolvido um sistema de injeção de fluxo condutométrico para determinar a ureia em soro humano usando a enzima urease naturalmente imobilizada. Durante o sistema os íons de amônio produzidos durante a reação enzimática eram convertidos em NH_3 após a adição de um reagente alcalino. A concentração de ureia era proporcional ao aumento no condutância. (DE FARIA et al, 1991).

Um sistema de injeção sequencial foi proposto por Silva e colaboradores para determinação potenciométrica de ureia em um eletrodo tubular seletivo para amônio foi empregado para avaliar a concentração de amônio produzida pela hidrólise enzimática da ureia a partir do extrato bruto de farelo de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* DC)

(Silva et al, 2000). No sistema empregado a enzima utilizada não é imobilizada, o que compete a não utilização da mesma em várias análises.

Os trabalhos acadêmicos em análise em fluxo encontrados na literatura que tem como objetivo a determinação de concentrações de ureia em leite e derivados não utilizam reagentes sólidos, como o reagente MOF-Cu²⁺ que é utilizado na detecção de ureia neste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um procedimento analítico baseado em um sistema em fluxo multicomutado e na imobilização de enzima e de reagente sólido para determinação espectrofotométrica de ureia em leite de vaca.

3.2 Específicos

1. Sintetizar e caracterizar o reagente sólido, (MOF – *Metal Organic Framework*, a base de Cu^{2+});
2. Extrair a enzima urease a partir da semente de melancia;
3. Imobilizar a enzima em celulose;
4. Desenvolver uma programação com Arduino para controle do módulo de análise e aquisição de dados;
5. Otimizar parâmetros químicos e físicos do sistema em fluxo proposto;
6. Realizar análise de interferentes;
7. Realizar teste de adição e recuperação;
8. Determinar as amostras de leite de vaca reais e comparar com método de referência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Soluções

Para o preparo de todas as soluções utilizadas neste trabalho foi utilizada água deionizada empregando o sistema Mili-Q (Milipore®), reagentes de alto grau analítico e vidrarias calibradas.

4.1.1. Solução estoque

A solução estoque de ureia foi preparada a partir do sal (Sigma Aldrich®) com pureza de 99,98%. Foi pesado 50g do reagente e dissolvido em 100mL do tampão fosfato com pH de 6,5. Obtendo a concentração final de 500mg dL⁻¹.

4.1.2. Solução de trabalho

A partir de uma solução de estoque foi preparado a solução de trabalho com concentração com concentrações de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50mg dL⁻¹ de ureia

4.1.3. Amostras

As amostras de leite UHT integral, semidesnatado, desnatado, composto lacto, e leite em pó foram compradas em supermercados da região metropolitana do Recife. As amostras de leite em pó foram preparadas dissolvendo-se 11g do leite em 100mL de água deionizada. (wolfschoon-Pombo, 1984).

4.1.4. Preparo da amostra

O preparo das amostras para análise foi realizado a partir da adição de 2mL de ácido tricloroacético 25% a 5mL da amostra. Em seguida foi centrifugado a 4000 rpm/

15min, para a precipitação das proteínas. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro quantitativo de porosidade de 125 mm (Unifil®). Em seguida, as amostras de leite foram levadas para análise.

4.2. Extração da urease

Para a determinação de ureia foi utilizado um catalisador, a urease, na hidrólise da ureia com a geração de íons $\text{NH}_4^+ + \text{CO}_2 + \text{OH}^-$. Para a extração de urease de extratos vegetais (*Citrullus lanatus*) foi empregada, a metodologia descrita por Fatibello e colaboradores, 2002, a qual consiste na homogeneização das sementes de melancia (anteriormente secas em temperatura ambiente) em solução de tampão fosfato e glicerol.

Foram pesados 25g da semente, anteriormente lavadas com água deionizada e seca a temperatura ambiente, foram triturados no liquidificador com 100mL de tampão fosfato de potássio 0,1M e pH 6,5 com 2,5mL de glicerol. Em seguida foi filtrado em gaze e centrifugado 1800 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi armazenado em refrigeração a 4°C.

4.2.1. Teste com a enzima

Foram elaborados testes com a urease para garantir sua atividade, inicialmente com o sistema apenas contendo a enzima imobilizada foi realizado testes analisando uma amostra de ureia com concentração conhecida de 25mg dL^{-1} nos tempos 1 á 5 min, e foi observado o sinal analítico em relação a esta reação. E em seguida o mesmo teste foi realizado com o sistema completo, com a MOF- Cu^{+2} .

4.2.2. Imobilização da enzima

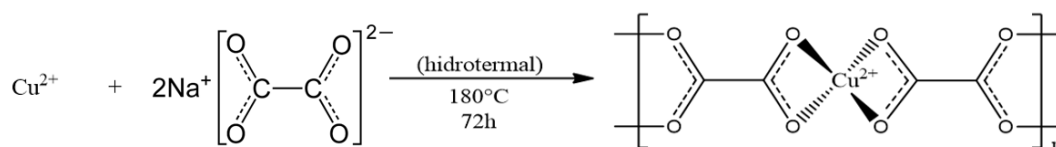
Para a ativação da celulose com acoplamento gluteraldeído pesou-se 1g de celulose bacteriana em pó, em seguida, o pó foi suspenso em 1,5mL de NaOH 1M e 0,2 ml de 1,4-butanodiol diglicidido éter. A mistura foi agitada por 2horas a 60°C. O produto foi lavado com água destilada. Em seguida, foram misturados 0,5mL de água destilada e 0,5mL de amônia 30% (v/v) e agitada por 2 horas a 60°C. O produto foi lavado com água destilada. Na sequência, a celulose foi misturada com 1mL da solução aquosa 25% (p/v) de gluteraldeído por 2 horas, depois lavada com água destilada.

Em seguida após a ativação da celulose, a mesma foi utilizada para a imobilização da urease. Para tanto, foi adicionado a 1g celulose uma suspensão de 3mL de urease (0,1%) em fosfato de sódio 5mM com pH 4,5 e 25°C durante 1 hora. Após a imobilização os derivados foram lavados com água destilada e filtrados em papel de filtro quantitativo de porosidade 125mm (Unifil®).

4.3. Síntese e caracterização do polímero de coordenação MOF-Cu²⁺

Para esta síntese da MOF-Cu²⁺ foi realizado uma reação hidrotermal, onde foram utilizados os seguintes reagentes: nitrato de cobre (II) diidratado, oxalato de sódio e 5mL de água destilada. Em seguida foram homogeneizados e levados para mufla com temperatura de 180°C e pressão controlada durante 72 horas. Após o tempo de reação o produto foi lavado com água deionizada e centrifugado, onde o precipitado foi levado a refrigeração e seco no liofilizador.

O esquema a seguir mostra a reação hidrotermal da MOF-Cu²⁺, onde o metal irá formar uma rede de compostos de coordenação com ligantes oxalatos.



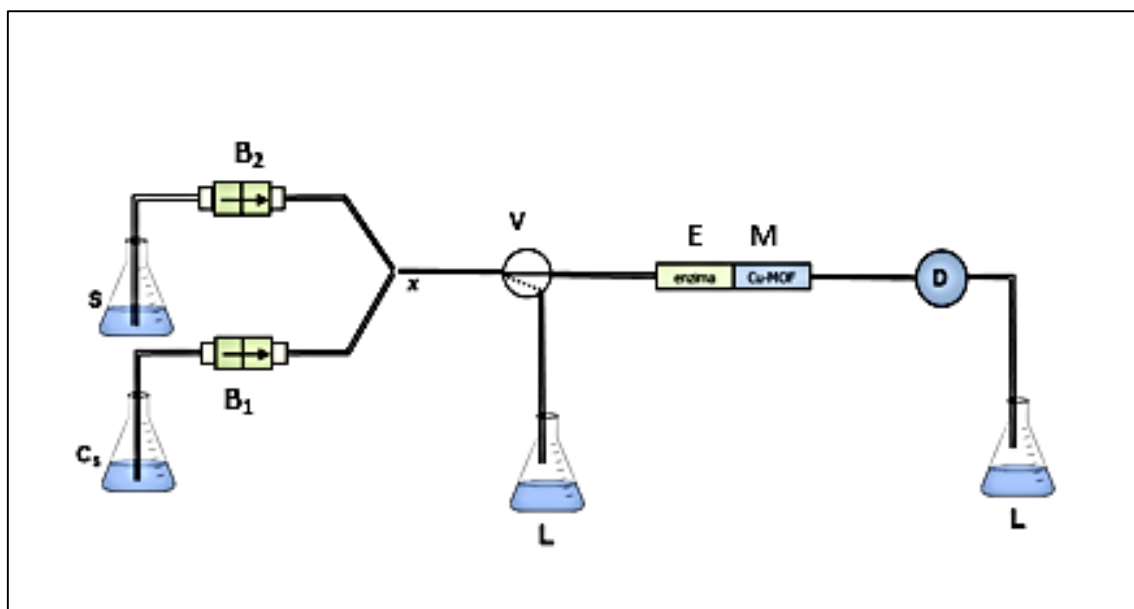
Esquema 02: Rota sintética, em condições hidrotermal, para obtenção da (Cu²⁺ - MOF).

A caracterização da MOF-Cu²⁺ foi realizada empregando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros vibracionais no infravermelho foram realizados a partir da técnica de pastilha KBr. O equipamento utilizado foi espectrofotômetro com transformada de Fourier, VARIAN®, modelo 600, abrangendo a região de 4000 - 400 cm⁻¹ com resolução espectral de 4cm⁻¹.

4.4. Descrição geral do sistema em fluxo

O sistema em fluxo é composto por duas minibombas solenoides (Bio-chem), onde B_1 transporta a amostra (S) e B_2 transporta a solução tampão fosfato de pH 6,5 (C_s). Uma válvula solenoide de três vias (V) (Nresearch®) foi posicionada para o controle da passagem das soluções, onde ora a solução de amostra e solução tampão passa continuamente no percurso até chegar na minicoluna e, posteriormente, a detecção, ora é desviada para o primeiro descarte (L) (etapa utilizada para a troca de solução de amostra e limpeza). A minicoluna é de PMMA composta por duas partes de volumes iguais (0,36mL), onde se encontram a enzima imobilizada (urease) (E) e o reagente sólido (MOF-Cu²⁺) (M), que ficam separados por um disco de sílica. Após o tempo de reação com a enzima, a solução de amostra entra em contato com a MOF, e em seguida a solução de amostra é transportada até o detector (D), um espectrofotômetro multicanal (UV/VIS) tipo CCD modelo USB 4000 (Ocean Optics) UV-Vis para detecção e, em seguida, descartada no segundo descarte (L). Na Figura 4 é apresentado o diagrama do sistema em fluxo proposto para a determinação de ureia em amostras de leite.

Figura 4: Diagrama do sistema em fluxo.



4.5. Sistema de controle

O controle do sistema em fluxo foi realizado por um microcomputador notebook (Acer®) através de uma placa de programação Arduino uno (ATmega328), a qual permite o controle das variáveis do sistema, proporcionando o estudo da otimização do método, as etapas de lavagem e a obtenção dos dados.

Tabela 1: Acionamento das válvulas do sistema proposto.

	B₁	B₂	V₁	Pulsos (ms)	Ciclos
Enchimento do percurso analítico	0	1	0	140	1
Amostragem	1	1	0	80	1
Detecção	0	1	0	120	1
Limpeza	0	1	1	150	3

As minibombas e as válvulas são acionados conforme ilustra a tabela 1, onde o número 1 corresponde a minibomba ou válvula ligada e o 0 (zero) indica minibombas ou válvula desligada. A análise é iniciada com a etapa de enchimento do percurso analítico, o acionamento ocorre com B₁; B₂; que corresponde ao bombeamento da solução da amostra e do tampão fosfato de potássio, durante 200milissegundos, nesta etapa os fluidos são direcionados para a coluna de reação (enzima / MOF-Cu⁺²). Em seguida, com apenas a minibomba B₂ acionada o produto da reação da minicoluna passa para a cela (cubeta), onde permanece até a detecção do sinal analítico. Na etapa de limpeza ocorrem o esvaziamento e a lavagem com o próprio tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹e pH 6,5. Os resíduos gerados nesta etapa são direcionados para os dois lixos. O tempo total de uma análise é de 8 minutos.

4.6. Método em fluxo proposto para determinação espectrofotométrica de ureia em leite

Foi preparada uma solução estoque de concentração final de 500mg dL^{-1} de ureia e através de diluição obteve-se uma solução trabalho com concentrações variando entre 1 e 50mg dL^{-1} .

Inicialmente, o percurso é preenchido com solução tampão fosfato $0,1\text{M}$ de pH $6,5$ até o segundo descarte. Em seguida realizou-se a inserção da solução de amostra com 80 pulsos ($0,36\text{ mL}$), levando ao preenchimento da primeira parte da minicoluna onde está localizada a enzima. Neste momento, ocorre o primeiro tempo de parada para a reação catalítica de hidrólise da ureia, otimizado em 4 minutos. Posteriormente, a zona de amostragem é deslocada até a segunda parte da minicoluna, onde ocorre o segundo tempo de parada para reação colorimétrica com o reagente sólido MOF – Cu^{+2} , otimizado em 4 minutos. Em seguida, o produto da reação chega à sela de detecção gerando sinal com monitoramento da absorção em 450nm empregando UV-vis modelo USB4000 (Ocean optics®). A fonte de radiação usada pelo modelo LS⁻¹ (Ocean optics®) possui uma lâmpada de tungstênio-halogênio e alimentação por uma fonte de 12V .

Para o cálculo das concentrações de ureia nas amostras de leite, os resultados de absorbâncias foram aplicados na curva analítica obtida pelas soluções de referência (absorbância versus concentração de ureia) gerando resultados de concentração expressos em mg dL^{-1} .

4.7. Método de referência utilizado (kit ureia CE - LabTest)

Para a avaliação da exatidão do método proposto, empregou-se um kit ureia CE – Lab Test®. O kit mostrou-se seguro ao ser utilizado por Magalhães (2003) em amostras de leite.

O kit consiste em quatro soluções, solução tampão fosfato 10 mmolL^{-1} e urease $\geq 268\text{KUL}^{-1}$), solução tampão estoque (tampão fosfato 100 /L , pH $6,9$; salicilato de sódio 312 mmolL^{-1} e nitroprussiato de sódio $16,8\text{ mmolL}^{-1}$), solução oxidante (hidróxido de sódio $2,8\text{ molL}^{-1}$ e hipoclorito de sódio 121 mmolL^{-1}) e solução de referência (azida sódica $7,7\text{ mmolL}^{-1}$). De acordo com as instruções do próprio teste, alguns reagentes precisaram ser diluídos nas proporções necessárias, menos o padrão.

Em três tubos de ensaio o branco contendo 1 mL de oxidante de uso, o teste contendo 0,01 da amostra e 1,0mL de urease tamponada e 1 mL de oxidante de uso, e o padrão contendo 0,01 mL do padrão, 1,0mL de urease tamponada e 1 mL de oxidante de uso.

Os tubos foram agitados e levados a aquecimento com temperatura controlada de 37°C durante 5 min. em seguida foi realizada a leitura no espectrofotômetro uv-vis. Os cálculos para obter a concentração de ureia foram realizados como descrito na equação abaixo:

$$\text{mg/mL} = \frac{\text{Absorbância teste} * 70}{\text{Absorbância Padrão}}$$

4.8. Avaliação do sistema em fluxo proposto

4.8.1. Estudo do pH

No estudo do pH para otimização do sistema foram utilizadas soluções tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e variou-se pH entre 5,5 e 8. Foram observados os sinais analíticos com absorvância de 450 nm e o que demonstrou melhor intensidade do sinal foi o escolhido para ser utilizado no sistema.

4.8.2. Estudo do tempo da reação

Para o estudo do tempo de reação foi realizado de forma univariado, mantendo-se fixo o tempo do reagente sólido em 1min e variando o tempo da reação da hidrólise da ureia entre 1min e 10min. Após a observação do sinal analítico com maior intensidade em 450nm em relação ao tempo da reação de hidrólise foi fixado o tempo com a intensidade maior e variou-se o tempo de reação com o reagente sólido também entre 1min e 10min. Novamente foi-se considerado o tempo em que o sinal apresentou maior intensidade.

4.8.3. Estudo de razão volumétrica

Para o estudo do volume da solução de amostra empregou-se uma solução de referência na concentração de 25 mg dL⁻¹ de ureia. Para tanto, foi fixado as condições estabelecidas anteriormente para tempo de reação na presença da urease e do reagente

sólido, respectivamente e variou-se o volume entre 20 µL à 120µL. Foram realizadas leituras em triplicata com absorvância em 450nm. O volume que demonstrou maior intensidade do sinal analítico foi selecionado para a continuidade da otimização do sistema proposto.

4.8.4. Estudo da seletividade

As substâncias selecionadas como potenciais interferentes no método proposto foram: a Cisteína; a cistina; o Triptofano; a lactose; a tiamina (vitamina B1); a cianocobalamina (vitamina B12). A seleção dessas substâncias é devido a sua concentração no leite, ou por apresentar em sua estrutura grupos nitrogenados. Para a execução do estudo foram preparadas soluções ureia 25mg dL⁻¹ e variou-se a concentração dos potenciais interferentes até causar efeito na intensidade da absorvância de ± 5 (Amatatongchai, 2015).

4.8.5. Estudo da exatidão

No teste adição e recuperação foram analisados 5 tipos de leites diferentes, o UHT tipo integral, UHT tipo desnatado, UHT tipo semidesnatado, UHT tipo zero lactose, e leite em pó. Para tanto foram adicionadas concentrações conhecidas de 10 mg dL⁻¹ e 25 mg dL⁻¹ de ureia as amostras de leite. Em seguida foi realizado o preparo das amostras já relatados no item 4.1.4. Posteriormente, foram analisadas no sistema proposto de acordo com as variáveis otimizadas e os resultados obtidos foram processados aplicando-se a equação matemática:

$$R\% = \{(C_{\text{amos + adicionado}}) / (C_{\text{amos}} + C_{\text{adicionado}})\} * 100$$

Onde o R% é a porcentagem de recuperação; C_{amos} é a concentração da amostra; C_{adicionado} é a concentração de ureia conhecida que foi adicionada; C_{amos + adicionado} é a concentração da amostra com adição da ureia.

4.8.6.Figuras de mérito

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos a partir das equações Eq. (1) e Eq. (2), respectivamente:

$$LD = \frac{(3,3 * sA)}{B} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$LQ = \frac{(10 * sA)}{B} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde sA é o desvio padrão do coeficiente linear, e B é o coeficiente angular. (Ribani, 2004; Gonzales, 2007).

A precisão do mérito foi calculada a partir do desvio padrão relativo (DPR), obtido a partir de 20 determinações consecutivas a partir da solução de referência 25mg dL^{-1} , calculado a partir da equação (3). Onde s é o desvio padrão e X o valor médio de absorbância.

$$DPR = \frac{(s * 100)}{(X \text{ média})} \quad \text{Eq. (3)}$$

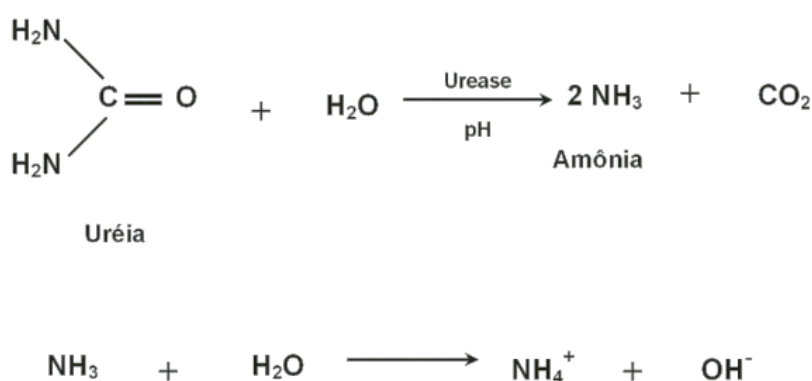
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

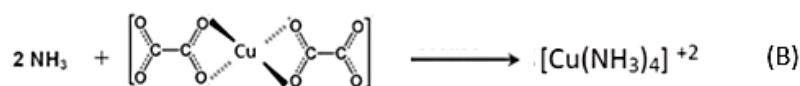
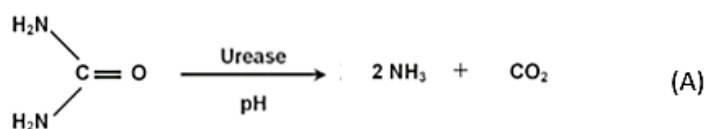
5.1. Aspectos gerais para o desenvolvimento do método proposto

As minibombas utilizadas no sistema proposto foram calibradas com água, ambas apresentando vazão de 0,01mL por pulso. As massas da enzima e do MOF-Cu²⁺, inicialmente, utilizadas foram de uma proporção 1:4, porém depois da otimização do sistema observou-se que essa proporção não apresentava nenhuma alteração no sinal analítico, portanto optou-se por utilizar a mesma quantidade de massa para ambas. As condições iniciais do sistema foram o tempo de reação de 10 min tanto na presença da enzima, quanto na presença do reagente sólido, volume de solução de referência de ureia de 0,63mL e solução tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,5.

A reação proposta neste trabalho consiste na reação da hidrólise enzimática da ureia catalisada pela urease, que produz amônia e CO₂ que, em meio aquoso forma íons amônio (esquema 1). Os íons amônio reagem com o composto de coordenação à base de cobre Cu²⁺ (esquema 2) formando o complexo [Cu(NH₃)₄]²⁺ que é monitorado em 450 nm.

Esquema 01: Reação de decomposição da ureia.

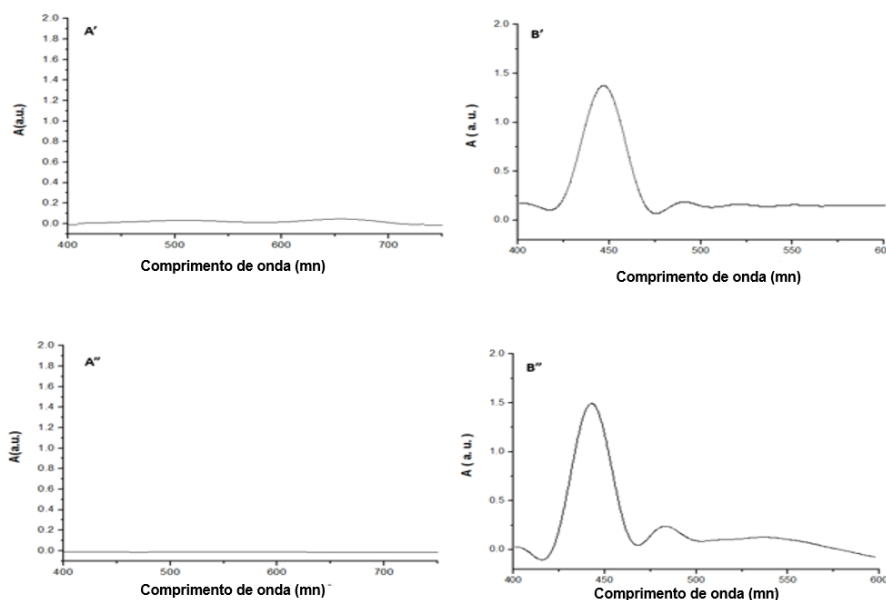


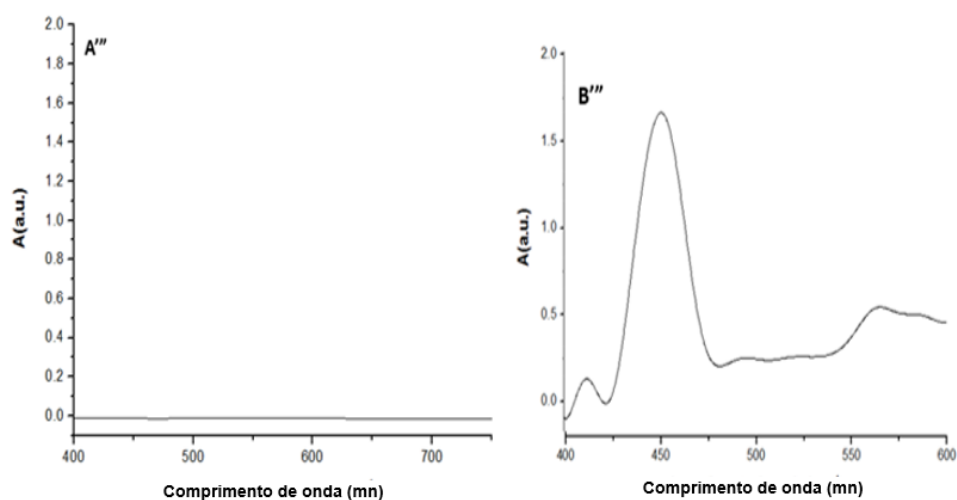


Esquema 02: Reações que ocorrem dentro da coluna. (A) reação enzimática, (B) reação colorimétrica com a (Cu^{2+} - MOF).

Para avaliar a atividade da enzima foram realizados testes, onde no sistema continha apenas a urease imobilizada e foi adicionado ureia 25mg dL^{-1} como indicam as imagens de “A”, onde A’, A” e A''' correspondem a 1min, 2min. e 5min. de reação. A presença do íon amônio não foi detectada no espectrofotômetro, porem foi possível observar uma mudança no pH da solução que inicialmente apresentou um pH de 6,4 e ao final da reação no sistema seu pH foi alterado para 8, o que indica a presença dos íons amônio em solução. As imagens de “B” indicam o sinal analítico observado quando o sistema está completo (enzima + MOF), e mostra que a intensidade do sinal varia de acordo com o tempo de reação. B’, B” e B''' correspondem a 1min, 2min. e 5min. de reação.

Figura 5: Teste da atividade enzimática. (A) com o sistema apenas contendo a enzima, em 1,3 e 5min. de reação. (B) com o sistema proposto completo com os respectivos tempos de 1 à 5min





O sinal analítico observado na imagem 6 (Esq.), do método proposto, é coerente ao sinal da figura 6 (Dir.), e correspondem ao sinal da reação do produto da hidrólise da ureia com a MOF-Cu^{2+} (Esq.), e a reação de NH_4Cl e a MOF-Cu^{2+} (Dir.) a qual corresponde a formação do $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_2$. Com absorção em 450nm.

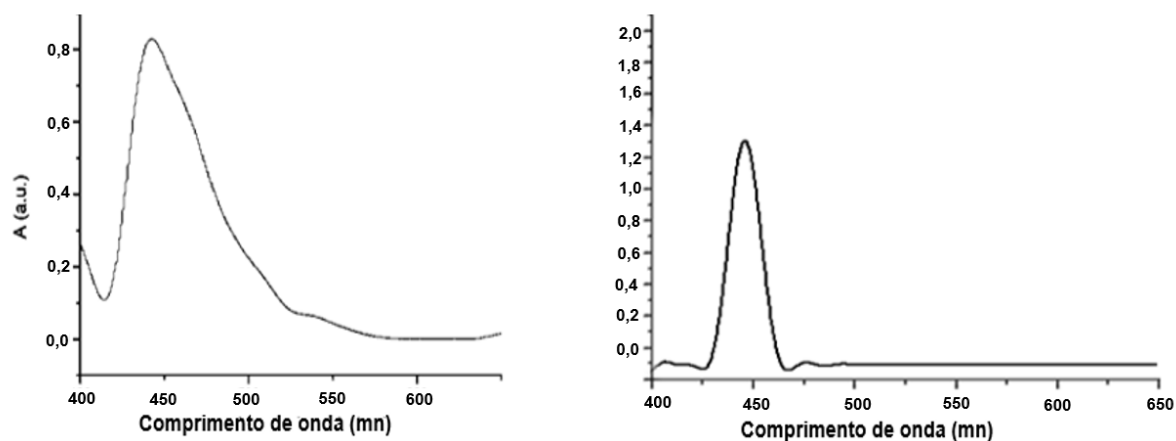


Figura 6: Espectro do produto da reação entre a hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease e a MOF-Cu^{2+} . (esquerdo). Banda de absorção da reação entre o NH_4Cl e a MOF-Cu^{2+} levando a formação do $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_2$ (direito).

5.2. Caracterização da MOF-Cu⁺²

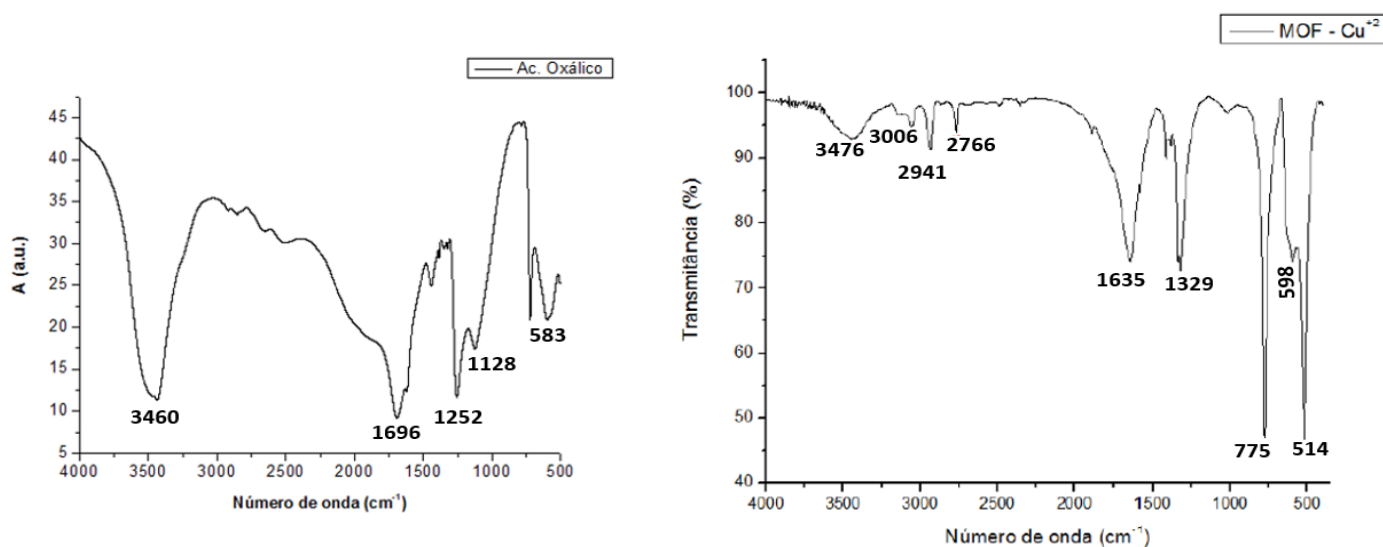
Para a elucidação estrutural do composto formado fez-se uso da técnica espectroscópica de infravermelho. Na Figura 7 são apresentados os espectros do ácido oxálico, e do composto de coordenação formado após a síntese hidrotermal.

Na Figura 7 observa-se em 1695 cm⁻¹ a presença da banda de intensidade forte referente a carbonila, em 4382 cm⁻¹ exibe a banda de OH do ácido e também da água. E em 1257 cm⁻¹ apresenta a banda de CO.

Ao lado pode-se observar as banda de carboxilato em 1635 cm⁻¹, e da ligação CO em 1329 cm⁻¹, em 3476 cm⁻¹ banda de OH, entre 3065 cm⁻¹ e 2766 cm⁻¹ apresenta bandas características de carbonos sp² e sp³, e as bandas em 598 cm⁻¹ e 514 cm⁻¹ correspondem ao alongamento Cu-O. Nota-se o deslocamento das frequências por causa da coordenação, onde é possível atribuir com picos a estrutura da fórmula mínima proposta.

Os espectros obtidos demonstraram grupos característicos da MOF-Cu⁺² contendo íons carboxilatos como ligante. E o deslocamento e estreitamento da carbonila confirmam a coordenação, como também a banda característica de carbono sp³.

Figura 7: Espectro do ácido oxálico, e Espectro da MOF-Cu²⁺ na região do infravermelho respectivamente.

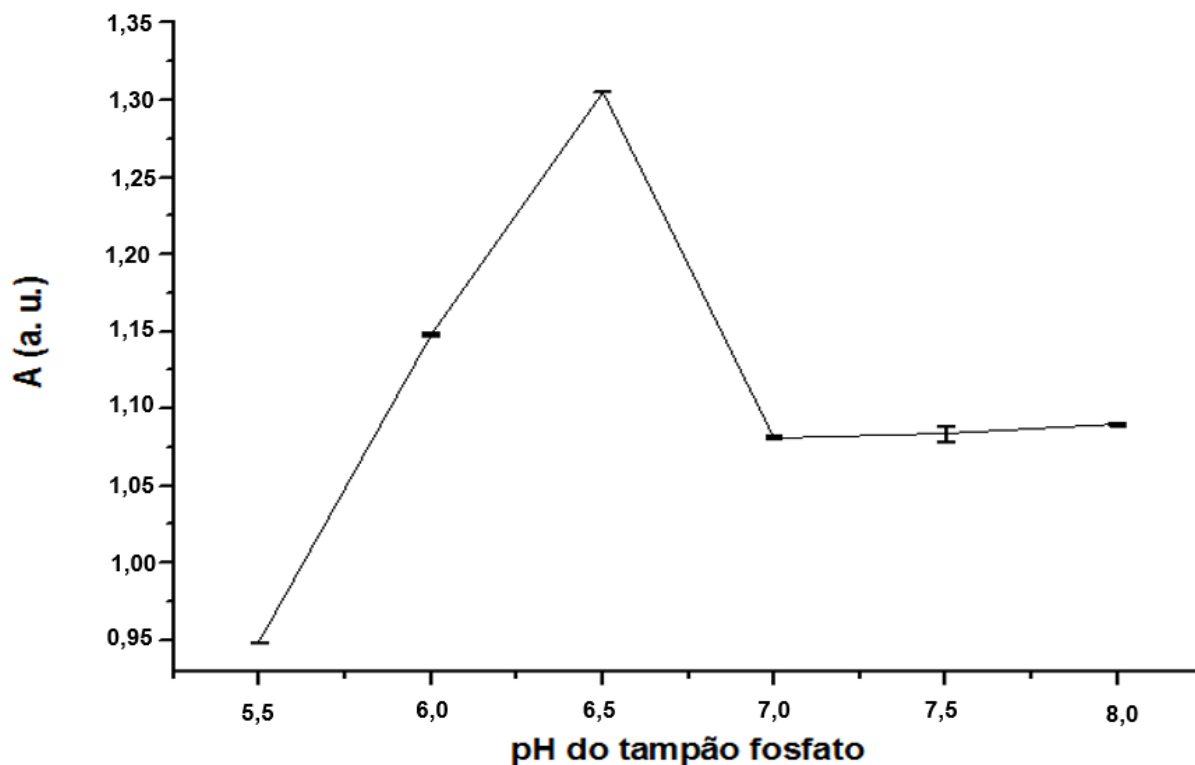


5.3. Avaliação do sistema em fluxo proposto

5.3.1. Estudo do pH

Para estudo da concentração hidrogeniônica (pH), selecionou-se o tampão fosfato, pois segundo a literatura é o mais utilizado em relação a extração da enzima urease e preservação da mesma. Assim sendo, neste estudo, fixou-se a concentração da solução tampão em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se o pH entre 5 e 8. Na figura 8, apresenta-se a resposta analítica do estudo realizado. De acordo com os resultados obtidos, observa-se um aumento do sinal analítico até o pH de 6,5, posteriormente, houve a diminuição do sinal analítico. Neste sentido, foi selecionado o pH de 6,5 para a continuidade na otimização do método proposto.

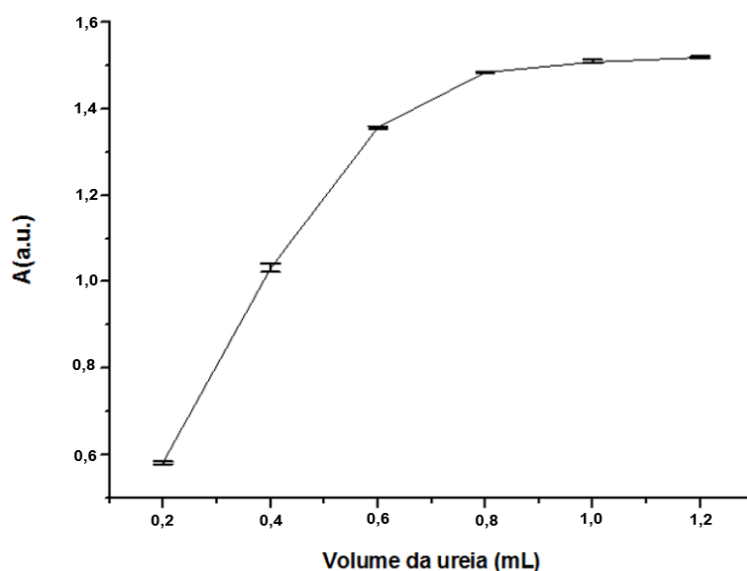
Figura 9: Estudo do pH empregando solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



5.3.4. Estudo do volume da solução de amostra

O volume da solução de amostra e/ou solução de referência inserido no sistema em fluxo é controlado a partir dos pulsos das minibombas solenoide, onde um pulso corresponde a 0,01mL de solução. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, a absorbância aumentou até o volume de 0,8mL e, posteriormente, nota-se uma estabilização na intensidade de absorbância e que volumes maiores não implicaram em um aumento significativo da intensidade do sinal analítico. Assim sendo, foi selecionado o volume de 0,8 mL (80 pulsos) para a continuidade da otimização do tempo de reação.

Figura 10: Estudo da influência do volume da amostra (ureia) 25mg dL⁻¹.

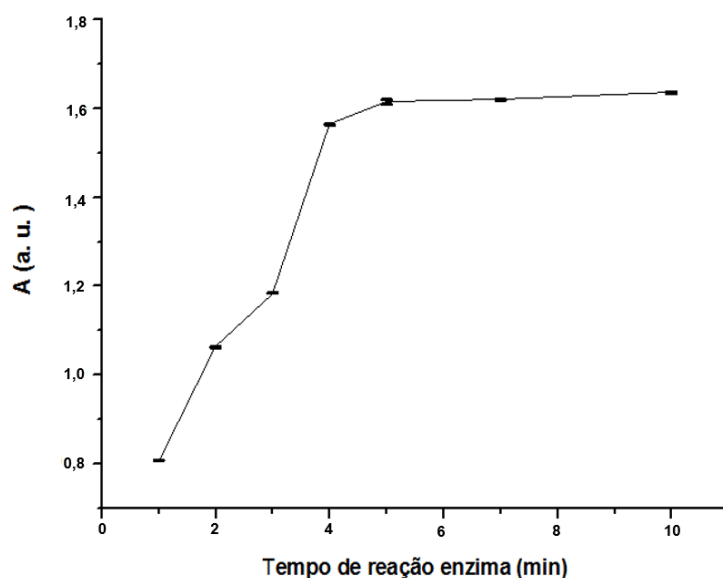


5.3.5. Estudo do tempo de reação

Sabemos que a cinética da reação, em função do tempo, influencia significativamente o rendimento reacional, conseqüentemente, na sensibilidade do método proposto. O estudo do tempo foi realizado empregando a análise univariada para a obtenção de uma melhor resposta analítica. Inicialmente foi realizado o estudo de tempo da solução de referência na presença da enzima urease imobilizada, fixando-se o tempo da solução de referência no reagente sólido em 1 minuto e variando o tempo da reação enzimática entre 1 e 10 minutos. Observando o gráfico da figura 11 notamos que a absorbância com maior intensidade ocorre no tempo de 4 minutos,

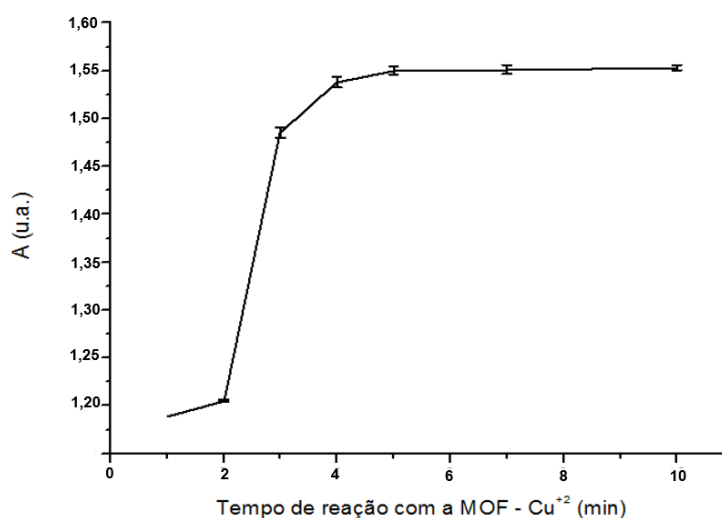
posteriormente, nota-se a estabilidade da resposta analítica (absorbância). Desde modo, foi selecionado o tempo de 4 minutos para a continuidade do estudo.

Figura 11: Estudo da influência do tempo reacional da enzima imobilizada (urease), concentração 25 mg dL^{-1} de ureia.



Com o tempo da reação enzimática fixada em 4 minutos, efetuou-se o estudo do tempo de reação na presença do reagente sólido (MOF-Cu^{2+}) variando-se o tempo de reação entre de 1 a 10 minutos. De acordo com a figura 12, nota-se que com 4 minutos de reação se obtém a estabilidade do sinal de absorbância, posteriormente a resposta analítica permanece constante. Neste sentido, selecionou-se o tempo de 4 minutos para reação na presença do reagente sólido. Assim sendo, o tempo de 4 minutos foi definido para ambas as reações.

Figura 12: Estudo da influência do tempo reacional do reagente sólido (MOF-Cu^{2+}), concentração 25 mg dL^{-1} de ureia.



5.4. Figura de mérito

No sistema em fluxo proposto foram realizadas várias curvas com 11 pontos, elas foram construídas fundamentadas no método de mínimos quadrados em dias diferentes, de acordo com a equação: $Y = A \cdot x + B$, com as concentrações variando entre de 1 e 50 mg dL⁻¹. Os valores médios estimados dos coeficientes lineares (A) angulares (B) foram de 0,0481 e 0,0831 respectivamente e o coeficiente de correlação (R) foi de 0,9964. Na Figura 13 é apresentado a construção da curva analítica variando-se a concentração entre 1 e 50 mg dL⁻¹ de ureia e na tabela 2 nota-se os coeficientes Lineares (A), angulares (B) e de Correlação (R), adquiridos

através de curvas analíticas obtidas no sistema em fluxo realizadas em dias diferentes. Desde modo, podemos afirmar que o sistema proposto para a determinação de ureia é estável e robusto podendo ser aplicado como método de rotina.

Figura 13: Curva analítica com concentrações de 1 – 50 mg dL⁻¹ de ureia.

$$Y = (0.03486 \pm 0.00002) *x + (0.08344 \pm 0.0254), R = 0,99671$$

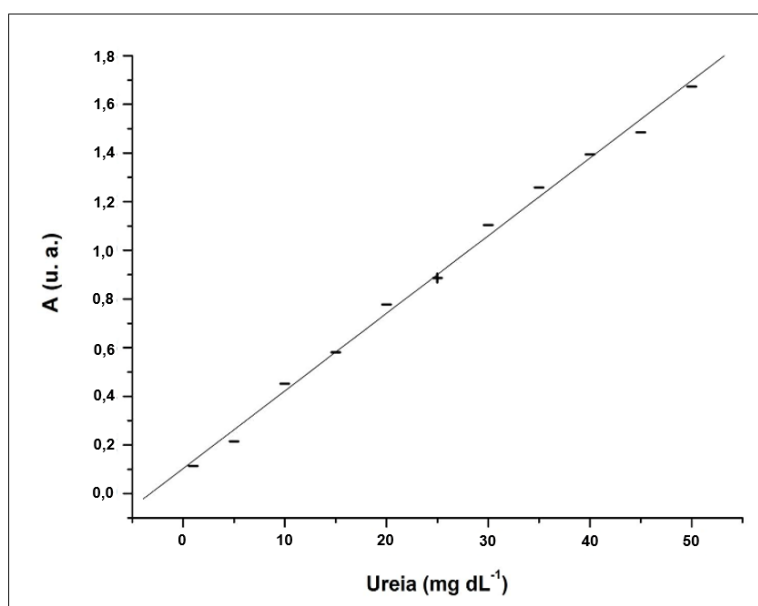


Tabela 2: Coeficientes Lineares (A) e Angulares (B) e de Correlação (R), adquiridos através de curvas analíticas no sistema em fluxo realizadas em dias diferentes.

Coeficiente linear (A)	Coeficiente Angular (B)	Coeficiente de correlação (R)	Pontos da curva
0.04524 ± 0.00122	0.06046 ± 0.0345	0,9964	11
0.03278 ± 0.00001	0.07029 ± 0.02124	0,99739	11
0.03182 ± 0.00101	0.09026 ± 0.02863	0,99499	11
0.03486 ± 0.00002	0.08344 ± 0.0254	0,99671	11

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados em 0,082 mg dL⁻¹ e 0,272 mg dL⁻¹, respectivamente. O tempo total da análise, desconsiderando o preparo da amostra e incluindo todas as suas etapas de amostragem, reação, detecção e limpeza, é de aproximadamente 8 minutos, obtendo uma frequência analítica de 8 determinações por hora.

Os parâmetros analíticos obtidos no sistema de análise proposto estão apresentados resumidamente na Tabela 3.

Tabela 3: Figuras de mérito do sistema de análise proposto para determinação ureia em leite.

Parâmetros	Método
	Proposto
Faixa de trabalho (mg dL ⁻¹)	1 – 50
Coeficiente angular	0,201
Coeficiente linear	0,0761
Limite detecção (mg dL ⁻¹)	0,0362
Limite quantificação (mg dL ⁻¹)	0,272
Exatidão (%)	1,05
Precisão (DPR) (%)	0,99
Consumo de amostra por determinação (mL)	0,8
Consumo da solução carregadora (mL)	0,96
Geração de efluentes por determinação (mL)	1,76

Na tabela 4, apresentamos uma comparação de métodos em fluxo para determinação de ureia em diferentes amostras e utilizando fontes de urease diferentes.

Tabela 4: Comparação do método proposto com outros métodos para determinação de ureia.

Referência	Gilmara C. 2001 ^{*a}	F.V. Silva et al. 2000 ^{*b}	Rezende, 2018 ^{*c}	Método proposto
Produto	Sangue animal	Leite	Solo	Leite
Fonte enzimática	Cajanus cajan (ervilha)	Canavalia ensiformis (feijão)	-	Citrullus lanatus (melancia)
Tempo	2h	3 min	42 seg	8 min
Desvio padrão	1,40%	1,90%	5,30%	0,99%
Quantidade de amostra	1 mL	900 mL	500 g	0,8 mL
Temperatura	45° C	-	-	-
Detecção	Espectrofotométrico	Potenciométrica	Condutométrica	Espectrofotométrico

^{*a} - Determinação de ureia em plasma de sangue animal

^{*b} - Determinação potenciométrica de ureia por injeção sequencial

^{*c} - Determinação da Atividade da Urease no Solo

Na tabela 3 podemos observar que os parâmetros do nosso sistema apresentam resultados coerentes quando comparado com demais sistemas de análise em fluxo, uma vez que o tempo gasto foi de apenas 8min. o desvio padrão é de 0,99% e a quantidade de amostra é de menos de 1mL (0,8mL).

5.5. Estudo da seletividade

Os resultados obtidos no teste de possíveis interferentes na reação proposta estão apresentados na Tabela 5.

Os resultados adquiridos durante os testes de interferentes demonstraram que as vitaminas Timina (B1) e Cianocobalamina (B12) apresentaram maior potencial de referência, uma vez que mostrou um limite menor de concentração que causa interferência. Porém, a tiamina e a Cianocobalamina não apresentam uma real interferência, pois tem concentração média no leite de (B1) $0,5\text{mg dL}^{-1}$ e (B12) $2,4\text{mg dL}^{-1}$ de leite (MILLER, 2000), uma vez que a ureia está presente numa faixa de 10 a 14 mg dL^{-1} (Laerte, 2013).

A cisteína e o triptofano apresentaram um potencial de interferência menor, levando em consideração a concentração utilizada. Com concentração média de $5,6\text{ mg g}^{-1}$ e $46,3\text{ mg g}^{-1}$ respectivamente. (Viapiana, 2017).

A cistina e a lactose também não apresentaram interferência real durante as análises, com concentração média de $30,34\text{ mg g}^{-1}$ a cistina (Fani, 2014) e $5,2\%$ a lactose (Noro, 2001).

Tabela 5: Resultados dos possíveis interferentes na reação com a MOF-Cu²⁺

Substância	Concentração de ureia (mg dL^{-1})	Concentração do interferente (mg dL^{-1})	Razão volumétrica	Varição do sinal (%)
Cistina	25	2500	1:100	-0,07
Cisteína	25	2500	1:100	-0,512
Triptofano	25	2500	1:100	0,302
Timina	25	1250	1:50	1,472
Cianocobalamina	25	1250	1:50	1,128
Lactose	25	2500	1:100	0,656

5.6. Adição e recuperação

Cinco amostras diferentes foram preparadas segundo o método descrito no tópico 4.1.4. (Natural, UHT semidesnatado, UHT desnatado, leite em pó e zero lactose)e, posteriormente, foram analisadas empregando o método proposto Nessas amostras foram adicionadas quantidades conhecidas de ureia de 10 e 25 mg dL⁻¹. Suas concentrações foram medidas de acordo com as curvas analíticas realizadas com concentrações entre 1 e 50 mg dL⁻¹ e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Valores de recuperação num intervalo entre 60 e 115% são considerados satisfatórios. (Brito, 2003; Ribani, 2004). Nas amostras realizadas foram obtidos valores adequados entre 90 e 103%, indicando que não ocorreu efeito matriz na determinação de ureia.

Tabela 6: Teste de adição e recuperação para determinação de ureia em leite, aplicando o sistema em fluxo proposto.

Tipo de amostra de leite	Método proposto (mg dL⁻¹)	Valor adicionado (mg dL⁻¹)	Valor recuperado (mg dL⁻¹)	Recuperação (%)
Natural	31,9 ± 0,4	10	39,1 ± 1,3	91,2
		25	53,2 ± 0,5	95,0
Leite em pó	24,8 ± 2,7	10	32,6 ± 0,7	94,0
		25	46,5 ± 1,2	92,0
Leite UHT desnatado	19,1 ± 1,2	10	28,1 ± 2,5	97,1
		25	40,0 ± 2,3	91,4
Leite UHT semidesnatado	31,4 ± 0,3	10	37,8 ± 0,7	90,7
		25	51,5 ± 1,4	92,4
Zero lactose	26,9 ± 0,5	10	38,1 ± 1,3	103,0
		25	48,3 ± 1,2	93,7

5.7. Análise das amostras

Uma vez realizada a otimização dos parâmetros químicos e físicos do sistema proposto, foram analisadas 10 amostras leite pelo método proposto e pelo método de referência (kit ureia CE) e os resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: comparativo entre o sistema proposto e o kit ureia CE.

Tipo de amostra de leite	Método Proposto	Método Ref. (KIT)
Composto lácteo	35,0 ± 0,3	34,1 ± 0,1
Leite em pó	36,0 ± 0,1	37,8 ± 0,3
UHT integral	43,63 ± 0,04	43,87 ± 0,05
UHT zero lactose	16,4 ± 0,6	16,7 ± 0,3
UHT semidesnatado	19,9 ± 0,2	19,16 ± 0,08
UHT desnatado	16,7 ± 0,3	15,5 ± 0,1
Instantâneo em pó	21,29 ± 0,08	21,32 ± 0,01
In natura ^A	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,3
In natura ^B	1,54 ± 0,09	1,65 ± 0,02
In natura ^C	0,84 ± 0,04	0,96 ± 0,03

“A”, “B”, “C”: Leite de três vacas diferentes

Aplicando o teste F (precisão) entre os resultados obtidos empregando o método proposto e o método de referência obteve-se um $f_{cal} = 0,99$. Assim sendo, podemos inferir que não há diferença significativa ao nível de confiança 95% ($f_{tab} = 3,18$) entre os desvios dos dois métodos analíticos analisados. Também, foi realizado o teste t (amostras diferentes e métodos diferentes) e obteve-se valor de $t_{cal} = 1,05$. Portanto, não há diferença significativa ao nível de confiança 95% ($t_{tab} = 2,26$), demonstrando a exatidão do método proposto em relação ao método de referência.

O ponto médio da curva analítica 25mg dL^{-1} foi empregado em todos os estudos de otimização do método proposto. Com as mesmas massas da enzima imobilizada e do MOF-Cu+2 foram realizadas 130 amostras, mantendo a repetibilidade e a sensibilidade do sinal analítico.

6. Conclusão

O sistema de análise proposto é de arranjo simples, versátil e robusto e mostrou-se viável para determinar a ureia em leite empregando a enzima urease imobilizada em celulose e o reagente sólido MOF-Cu²⁺.

O sistema em fluxo para determinação de ureia em leite demonstrou capacidade de quantificar proteína através de nitrogênio ureico com maior exatidão do que o método oficial que não consegue distinguir o nitrogênio proteico do não proteico. Mediante a utilização da enzima urease que funciona como catalisador da hidrólise da ureia. E precisão quando comparado com o método de identificação de ureia em sangue (Ureia CE).

A ferramenta analítica também apresenta uma redução significativa do tempo reacional, da utilização e da quantidade dos reagentes, das vidrarias e equipamentos necessários. Também aponta maior precisão e sensibilidade do que o método oficial.

A coluna contendo a enzima apresentou boa estabilidade, caracterizada pela durabilidade de 130 análises, a qual é suficiente para uso prático. No procedimento proposto destacam-se a disponibilidade da enzima, seu baixo custo, e a pequena manipulação das amostras.

7. Referências

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sala de imprensa: ANVISA avalia risco da presença de formol e ureia no leite, 9 de maio de 2013. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/resultadousca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2671667&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=anvisa-avalia-risco-da-presenca-ureianoleite&inheritRedirect=true>.

ARSTAD, B. et al. Amine functionalized metal organic frameworks (MOFs) as adsorbents for carbon dioxide. *Adsorption*. v. 14, p. 755-762, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). Tipos de Leite. 2017. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/fixedcontent.aspx?area=sob-tip>>

BACILA, M. Bioquímica veterinária. 2ª edição, volume único. São Paulo: robe editorial, 2003, p. 583.

BATTEN, Stuart R. et. al. Terminology of metal–organic frameworks and coordination polymers. **Pure Appl. Chem.**, Vol. 85, No. 8, pp. 1715–1724, 2013.

Behmer MLA. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 15ª ed. São Paulo (SP): Nobel; 1987. BEHMER, M. I. L. A. **Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização e análise**. Ed. 13ª. São Paulo: Nobel, p. 320, 1999.

BELIAN, MÔNICA F. et al. Materiais inorgânicos associados a sistemas multicomutados para a determinação de espécie químicas em alimentos. Recife. 2015.

BERGAMIN, F. H. et al. solvent extraction in continuous flow injection analysis: Determination of molybdenum in plant material. **Analytica Chimica Acta**, v.101, p.9, 1978.

BRADFORD, M. M.; *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.

BRISOLA, J. Imobilização de lipase em celulose e nanocristais de celulose bacteriana. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Londrina. 2018.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de ecotoxicologia e meio Ambiente**, v. 13, p. 129, 2003.

BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentration of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.11, p.2964-71, 1997.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A.; RIVAS, J.; Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the total environment*, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CORTEZ, M A.S.; et al. Características físico-química e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e glicosado. **Revista Instituto de Laticínios “Candido Tostes”** v. 65, n. 376, p. 18-25, 2010.

DALLA-VECHIA, R.; Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros, **Química Nova**, V. 27 (2004), P. 623.

DANTAS, R. A. L.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. Redes metalorgânicas e suas aplicações em catálise. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 123-133, 2014.

DRACZ, S. Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de queijo em leite. Viçosa, MG, UFV, 1996. 57p. (Tese M.S.)

ESCOBAR, A.; et al. Melamina. Un problema potencial para la salud animal y humana como adulterante en los alimentos con énfasis en la leche. **Rev. Salud Anim.** V. 32 N. 1, p.22-31, 2010.

F.V. SILVA et al. Potentiometric determination of urea by sequential injection using Jack bean meal crude extract as a source of urease. **Talanta**. Vol.53, pag. 331–336, jun. 2000.

FANI, M. propriedades nutricionais das proteínas do soro de leite. **Aditivos & Ingredientes**, v. 41, p. 26, 2014.

FAO, & WHO. (2010). Codex Alimentarius Commission. Proposed draft maximum levels for melamine in food and feed, joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on contaminants in foods, 4th session, **Turkey**.

FARIA, L. C.; PASQUINI, C.; OLIVEIRA-NETO, G.; Determination of urea in Serum using Naturally Immobilized Urease In A Flow-Injection Conductometric System. **Analyst** 1991, 116, 357.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D.; Biossensores. **Quim. Nova** 1992, 15, 28
FELÍCIO, P. E. Adulteração do leite mostra que é hora de investir no Sistema de Inspeção Sanitária Federal. *Revista ABCZ, Uberaba*, n. 41, nov/dez., 2007, p. 77.

FINETE, V. L. M., et al. Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? **Food Chemistry**, 141, 3649–3655, 2013.

GILMARA C.; BOAVENTURA F.; sistema em fluxo para determinação Espectrofotométrica de ureia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima urease. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 2, 191-194, 2001.

GONZALEZ, A. G. HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method, validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Analytical Chemistry**, v. 26.3, p. 227, 2007.

GONZALEZ, F. H. D. ; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 72.

Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M.; J. Biol. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Chem.* 1949, 177, 751.

GROVES, W. F.; DAVIS JR., F. C.; SELLS, B. H.; Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Anal. Biochem.* 1968, 22, 195.

He, D., ZHANG, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the extraction of melamine from milk followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control*, 36, 36–41, 2014.

JENSEN, R.G. **Handbook of milk composition**. 1^a ed. San Diego: Academic Press, 1995. p. 919.

Jha, S. N., Jaiswal, P., Borah, A., Gautam, A. K., & Srivastava, N. (2015). Detection and quantification of urea in milk using attenuated total reflectance Fourier Transform infrared spectroscopy. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 926–933.

KARTHEEK, M.; SMITH, A. A.; MUTHU, A. K.; MANAVALAN, R. Determination of Adulterants in Food: **A Review**. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3, n. 2, p. 629-636, 2011.

KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M.; BERGAMIN FILHO, H. multicommutation in flow analysis. Part5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, v. 334, p. 287, 1996.

LI, J. -R. et al. Carbon dioxide capture-related gas adsorption and separation in metal-organic frameworks. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 255, p. 1791- 1823, 2011.

Liu, Y.; Chen, J. Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and compatible polymers*, 2016. Disponível em: <<http://jbc.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0883911516637377>>.

Loung, J. H. T., Groom, C. A., & Male, K. B. (1991). The potential role of biosensors in the food and drink industries. *Biosensors & Bioelectronics*, 6, 547–554.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; J. Biol. Chem. Protein measurement with the Folin phenol reagent. 1951, 193, 265.

Luzzana, M., & Giardino, R. (1999). Urea determination in milk by a differential pH technique. **HAL-archives-ouvertes**. *Le Lait*, 79, 261–267.

- MAGALHÃES, A. C. M. Teores de nitrogênio uréico no leite e no plasma de vacas mestiças. Viçosa, 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- MANGUEIRA, T.F.B.; et al. Adição de ferro ao leite e sua retenção na coalhada dessorada. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, Campinas, v. 22 , n.3, p.305-307, Mar. 2002.
- Manual of methods of analysis of foods milk and milk products, p. 12, 2012.
- MCKELVIE, I., KOLEV, S. **Advances in flow injection analysis and related techniques**, Volume 5, Edição 1, 2008.
- MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. Handbook of Dairy Products and Nutrition. 2nd Ed. CRC Press LCC, Illinois, 2000.
- NIKOLELI, G.N.;NIKOLELIS,D.P.;METHENITIS,C. Construction of a simple optical sensor based on air stable lipid film with incorporated urease for the rapid detection of urea in milk. *Analytica Chimica Acta*, v.675, n.1, p.58–63, 2010.
- NORO, G. Síntese e secreção do leite. 2001. Disponível em <https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/sintese_leite.pdf> Acesso em: 08/07/2018.
- Noyhouzer, T., Kohen, R., Mandler, D., 2009. *Anal. Methods* 1, 93–99.
- OLIVEIRA, Gislene Bremer. Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. 2009. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.
- PIRES, A.S. Fraudes em leites de consumo: limites de detecção. **Jornal da Produção de Leite PDPL/RV**. Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- QIU, S.; Zhu, G. Molecular engineering for synthesizing novel structures of metalorganic frameworks with multifunctional properties. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 2891-2911, 2009.
- REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v.16, n. 6, p. 570, 1993.
- REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. Análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**. 12, edição 1, 1989.
- REIS, B. F.; et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and apectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, p. 129, 1994.
- Rezende, C. P. et al. Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação da Atividade da Urease no Solo. **Revista virtual de química**, vol. 10; no. 5; nov. 2018.

RIBANI, M. validação de métodos cromatográficos e eletroferéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771, 2004.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771, 2004.

RICARDO, C. P. P.; Teixeira, A. R. N.; Enzima, Plátano Editora S.A., Lisboa, 1983

RODRIGUES, F. Manual de Bancada - Boas Práticas de Laboratório. Queijos no Brasil, 2011. Visto em: ago. 2017. Disponível em <<http://www.queijosnobrasil.com.br/analises-de-leite.html>>.

RODRIGUES, F. Manual de Bancada - Boas Práticas de Laboratório. Queijos no Brasil, 2011. visto em: set. 2017. Disponível< <http://www.queijosnobrasil.com.br/analises-de-leite.html>>.

ROSELER, D.K.; FERGUSON, J.D.; SNIFFEN, C.J.; HERREMA, J. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in holstein cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.76, n.2, p.525-34, 1993.

ROWSELL, J. L. C.; YAGHI, O. M. Metal-organic frameworks: a new class of porous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 73, n. 1/2, p. 3-14, 2004

RUZICA, J.; HANSEN, E. H.; Flow injection analysis. Part I Anew concepto of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145, 1975.

Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 390.

SILVA, F. G.; et al. **Talanta** v. 53, p. 331-336, 2000.

SILVA, P.H.F.; Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova Na Escola**, São Paulo, n. 6, p.3-5, Nov. 1997.

SILVA, T. R. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: . Acesso em: 15 jul. 2019.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica, tradução da 8ª edição, Editora Thomson, 2009, p.999.

SMITH, P. K.; et al. *Anal. Biochem.* Pag. 150, V. 76, 1985.

SOEDJAK, H. S.; Colorimetric micromethod for protein determination with erythrosin-B *Anal. Biochem.* 1994, 220, 142.

SOUZA, G.N. et al. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

TAYLOR, D.; NIEMAN, T. A.; Bipolar pulse conductometric detection of enzyme reactions in flow-injection systems Urea in serum and urine. *Anal. Chim. Acta* 1986, 186, 91.

TRIVEDI, U. B, et al. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 140(1), 260–266, 2009.

TRONCO, V.M. Manual para inspeção da qualidade do leite, p.166. Dissertação, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

VELLOSO, C. Celso Velloso: As ações do Ministério para o combate à fraude de leite no Brasil. Entrevista. *Milkpoint*, mai. 2003. Visto em: jun. 2017. Disponível em <<https://www.milkpoint.com.br/?actA=7&areaID=50&secaoID=126¬icialID=8435>>.

VELLOSO, C. Celso Velloso: As ações do Ministério para o combate à fraude de leite no Brasil. Entrevista. *Milkpoint*, visto em: jun. 2017. Disponível em <<https://www.milkpoint.com.br/actA=7&areaID=50&secaoID=126¬icialID=8435>>.

VIAPIANA, I. V. proteínas do soro do leite. **Food Ingredients Brasil**, v. 41, p. 26, 2017.

W. CZAJA, A. KRYSZYNOWICZ, S. BIELECKI, R. M. BROWN Jr, Biomaterials Anti-inflammatory and antioxidant nanostructured cellulose membranes loaded with phenolic-based ionic liquids for cutaneous application. 27 (2006) 145.

WU, Y., & ZHANG, Y. (2013). Analytical chemistry, toxicology, epidemiology and health impact assessment of melamine in infant formula: Recent progress and developments. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 325–335.

XIN H.; STONE,R. Tainted milk scandal: chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. **Science** washington, v 322, p. 1310-1311, 2008.

ZHANG L.G; ZHANG X.; NI L.J.; XUE Z. B.; GU X.; HUANG S. X. Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 145, p. 342-348. 2014.

ZHANG, X. F., ZOU, M. Q., QI, X. H., LIU, F., ZHU, X. H., & ZHAO, B. H. (2010). Detection of melamine in liquid milk using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 1655–1660.

ZHAO, X., QI, F., YUAN, C., DU, W., LIU, D. Lipasecatalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 44, 182–197, 2015.

ZHAO,Y.;MARTIN,B.R.;WEAVER,C.M. Calcium Bioavailability of Calcium Carbonate Fortified Soymilk Is Equivalent to Cow's Milk in Young Women, *Journal of Nutrition*, San Diego, v.135, p.2379-238, Abr. 2005.