

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

ISABELA CAMARGO GONÇALVES

**Desenvolvimento de estratégias analíticas limpas para a
determinação de proteína e ureia em alimentos**

Piracicaba

2023

ISABELA CAMARGO GONÇALVES

**Desenvolvimento de estratégias analíticas limpas para a
determinação de proteína e ureia em alimentos**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo
Piovezani Rocha**

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Gonçalves, Isabela Camargo

Desenvolvimento de estratégias analíticas limpas para a determinação de proteína e ureia em alimentos / Isabela Camargo Gonçalves; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

85 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Compostos nitrogenados 2. Fotometria 3. Imagem digital 4. Leite
5. Qualidade dos alimentos 6. Química analítica verde 7. Segurança alimentar
I. Título

CDU 543.06 : 641.1

Elaborada por:

Rubenildo Oliveira da Costa

CRB-8/7946

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais, Gláucia e Nelson, aos meus avós, Alcyr e Aparecida, e às minhas irmãs, Juliana e Gabriela, por sempre acreditarem em mim e serem minha base. Dedico também a todos que estiveram em meu caminho, me incentivando e encorajando ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

É com enorme satisfação, alegria e reconhecimento que expresso meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram, de qualquer forma, para a realização e construção desta dissertação de mestrado.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, que em muitos momentos me encorajaram e me deram forças para prosseguir com o meu objetivo.

Ao meu orientador, Professor Fábio Rocha, pela paciência e confiança em mim e no meu trabalho ao longo destes anos. Foi de extrema importância contar com uma pessoa regada de conhecimentos e disposição a ensinar.

Aos meus amigos de longa data pelo compartilhamento da vida. Vocês são a família que escolhi.

Aos meus queridos amigos que a Pós-Graduação me concedeu (Anna, Gabriel, Luís, Rita e Samara) pelo acolhimento, aprendizado, companheirismo e amizade. Foram muitos momentos difíceis, mas vencemos! Vocês foram essenciais para minha trajetória até aqui.

Às técnicas do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” em especial, Sheila, pelos chocolates, balas, conselhos e longas conversas sobre a vida, Fátima pelo carinho e deliciosos bolos feitos com todo seu amor, e Liz pelas conversas descontraídas na hora do café. Obrigada por estarem sempre cuidando de nós como se fossemos seus.

Aos professores, Alex Virgilio (CENA/USP), Juliana Naozuka (UNIFESP) e Poliana Macedo dos Santos (UTFPR) pelas sugestões e direcionamentos durante o exame de qualificação.

Aos Professores Boaventura, Zagatto, Chico e Alex pela oportunidade de conhecê-los. Tenho-os como referência de profissionais e exemplos de comprometimento com a ciência a ser seguido.

À Professora Thais Vieira e Luis Felipe F. Fabrício pela colaboração com as análises de micro-Kjeldahl.

Ao CENA, em especial ao Laboratório de Química Analítica “*Henrique Bergamin Filho*”, pela infraestrutura oferecida nestes anos de trabalho.

À Clínica do Leite (Piracicaba, SP) e seus funcionários por contribuírem com as análises pelos métodos de referência utilizadas neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2021/02590-6, pela concessão da bolsa e apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Por fim, e não menos importante, agradeço aos meus pais, Glaucia e Nelson, que fizeram até o impossível para que eu chegasse aqui, me ensinando a sempre caminhar com honestidade, humildade e caráter. Às minhas irmãs, Juliana e Gabriela, por serem minhas parceiras de vida e minhas confidentes. Aos meus amados avós, Alcyr e Aparecida pelos cuidados, amor, acolhimento, suporte financeiro e emocional, almoços em família e por conceberem essa família tão especial na qual estou inserida. Aos queridos tios, Marcia, Brandão, Marcos e Marcia Helena, e primos, Rafaela, Mariana e Vinicius, pelos incentivos e pela torcida a cada passo meu. Ao meu namorado, Samuel, por todo o apoio, respeito, cuidado, compreensão e por nunca ter soltado minha mão. Vocês todos são um exemplo para mim. Amo todos vocês!

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta etapa.

Muito obrigada!

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

RESUMO

GONÇALVES, I. C. **Desenvolvimento de estratégias analíticas limpas para a determinação de proteína e ureia em alimentos**. 2023. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

A análise de alimentos é essencial para a caracterização e monitoramento dos padrões de qualidade dos produtos, pela avaliação das características físico-químicas e organolépticas. Neste contexto, observa-se a necessidade de desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, práticos, menos impactantes ao meio ambiente e que gerem resultados confiáveis. Diante disso, esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de estratégias analíticas limpas empregando a fotometria por imagens digitais para a determinação de proteína em alimentos e de ureia em leite. A determinação de proteína foi baseada na microdestilação da amônia a partir de digeridos Kjeldahl, detectada pela alteração de cor do indicador ácido-base vermelho de fenol (solução aceptora), usando a câmera de um telefone celular. Resposta linear foi obtida de 5,0–50,0 mg/L de amônio (0,003–0,03% de proteína), $r = 0,996$. O coeficiente de variação ($n = 10$) e o limite de detecção (nível de confiança de 99,7%) foram estimados em 2,3% e 2 mg kg^{-1} de proteína, respectivamente. Uma frequência analítica de 12 ensaios h^{-1} foi obtida com o processamento simultâneo de amostras. As quantidades de proteína determinadas em alimentos de origem animal (leite) e vegetal (feijão e lentilha) foram concordantes com o procedimento de referência micro-Kjeldahl ao nível de confiança de 95%. No procedimento para a determinação de ureia em leite foi monitorado o aumento do pH do meio devido à formação de amônia a partir da hidrólise enzimática da ureia usando urease. Esse procedimento foi explorado para a detecção de adulterações em leite, que é um dos principais alvos de fraude alimentar em todo o mundo. O procedimento apresentou resposta linear de 2,0–15,0 mg L^{-1} de ureia ($r = 0,998$), com coeficiente de variação ($n=10$) e limite de detecção (95% de confiança) estimados em 1,6% e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Recuperações de 95 a 112% foram estimadas a partir de amostras de leite UHT e pasteurizado enriquecidas com ureia e os resultados para amostras de leite comercial obtidas pelo método de adição de padrão concordaram com os valores de referência (espectroscopia no infravermelho médio) a nível de confiança de 95%. O procedimento foi aplicado a leites integrais, semidesnatados e desnatados, processados por pasteurização ou sob tratamento UHT. Os métodos analíticos propostos superaram limitações dos procedimentos convencionais, como dificuldades no preparo de amostras, alto custo e tempo de análise. As alternativas analíticas propostas contribuem para a avaliação da qualidade e segurança dos alimentos, sendo mais acessíveis, consumindo baixas quantidades de reagentes e solventes e minimizando as quantidades de resíduos gerados.

Palavras-chave: Fraude em alimentos. Segurança de alimentos. Leite. Compostos nitrogenados. Química analítica limpa.

ABSTRACT

GONÇALVES, I. C. **Development of green analytical strategies for the determination of protein and urea in foods**. 2023. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Food analysis is essential for product characterization and quality control, by evaluating physicochemical and organoleptic characteristics. In this context, development of fast, more practical, reliable, and environmental friendly analytical procedures is demanded. This MSc dissertation aimed to develop green analytical methods exploiting digital-image photometry for the protein determination in foods and urea in milk. Protein determination was based on ammonia distillation from Kjeldahl digests, detected by the color change of the phenol red acid-base indicator (acceptor solution), using a cell phone camera. A linear response was achieved within 5.0–50.0 mg L⁻¹ ammonium, equivalent to 0.003–0.03 % protein ($r = 0.996$). Coefficient of variation ($n = 10$) and limit of detection (99.7 % confidence level) were estimated at 2.3 % and 2 mg kg⁻¹ protein, respectively. A sample throughput of 12 h⁻¹ was achieved with simultaneous sample processing. Protein amounts determined in foods of animal (milk) and vegetal (beans and lentils) origin agreed with the results of the micro-Kjeldahl reference procedure at the 95 % confidence level. The procedure for the determination of urea in milk exploited the increase of the pH of the medium due to the formation of ammonia in the enzymatic hydrolysis of urea, using a urease solution. The procedure was applied to detection of milk adulterations, which is one of the main targets of food fraud worldwide. The proposed procedure showed a linear response within 2.0-15.0 mg L⁻¹ urea ($r = 0.998$), with a coefficient of variation ($n = 10$) and limit of detection (95% confidence level) estimated at 1.6% and 0.5 mg L⁻¹, respectively. Recoveries from 95 and 112% were estimated from samples spiked with urea and results for commercial milk samples achieved by the standard additions method agreed with the reference values (determined by mid-infrared spectroscopy) at the 95% confidence level. The procedure is applicable to whole, semi-skim, and skim milk either pasteurized or processed under ultra-heat treatment (UHT). The proposed analytical methods overcame limitations of conventional procedures, such as difficulties in sample preparation, high cost and analysis time. The proposed analytical alternatives contribute to the evaluation of food quality and safety, being more accessible, consuming low amounts of reagents and solvents and minimizing the amounts of waste generated.

Keywords: Food fraud. Food Safety. Milk. Nitrogen Compounds. Green analytical chemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais métodos analíticos para a determinação de proteína.	26
Tabela 2: Teores de proteína no leite integral determinados pelos procedimentos proposto e de referência.....	54
Tabela 3: Teores de proteína em feijões determinados pelos procedimentos proposto e de referência.....	54
Tabela 4: Teores de proteína em lentilhas determinados pelos procedimentos proposto e de referência.....	55
Tabela 5: Características analíticas de procedimentos para a determinação de proteína em alimentos.	56
Tabela 6: Planejamento fatorial 2^3 para a avaliação da robustez do procedimento.	63
Tabela 7: Recuperações para amostras adicionadas de 2 mg L^{-1} e 6 mg L^{-1} de ureia.	67
Tabela 8: Determinação de ureia em amostras de leite pelos métodos proposto e de referência (ISO:9622, 2013)..	68
Tabela 9: Características analíticas de procedimentos para a determinação de ureia.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação entre adulteração intencional e acidental.	22
Figura 2: Representação da ligação peptídica formada por condensação entre dois aminoácidos.	24
Figura 3: Representação esquemática e fotografia do microdestilador.	40
Figura 4: Representação infográfica do procedimento proposto para a determinação de proteína em alimentos.	41
Figura 5: Representação infográfica do método analítico proposto para a determinação de ureia em leite.	42
Figura 6: Fotografia das soluções após a microdestilação e absorção do analito pela solução de vermelho de fenol.	47
Figura 7: Espectros de absorção de uma solução de vermelho de fenol em pH = 5,0 e pH = 7,0.	46
Figura 8: Efeito da concentração e do volume de NaOH na resposta analítica.	48
Figura 9: Efeito do volume da amostra sobre o sinal analítico.	49
Figura 10: Efeito do volume do indicador sobre o sinal analítico.	50
Figura 11: Efeito da temperatura sobre o sinal analítico.	51
Figura 12: Ilustração da formação de gotículas de condensado nas paredes do tubo tipo Falcon.	51
Figura 13: Efeito do tempo sobre o sinal analítico.	52
Figura 14: Curva de calibração obtida nas condições otimizadas.	53
Figura 15: Espectros de absorção de solução de vermelho de fenol.	58
Figura 16: Aspecto visual do extrato obtido a partir de sementes de melancia após procedimento de extração.	59
Figura 17: Variação da resposta analítica durante a hidrólise enzimática utilizando urease comercial e extrato de sementes de melancia	60
Figura 18: Otimização univariada do procedimento analítico.	62
Figura 19: Avaliação do perfil cinético da reação de hidrólise da ureia em diferentes tipos de leite.	62
Figura 20: Gráfico de Pareto com os efeitos das principais variáveis do procedimento proposto.	64
Figura 21: Curva de calibração obtida nas condições otimizadas e imagens dos tubos contendo diferentes concentrações de ureia.	65

Figura 22: Comparação entre as curvas analíticas obtidas na ausência e presença de amostra de leite integral.....	66
Figura 23: Avaliação do “caráter verde” do procedimento proposto e do procedimento micro-Kjeldahl através da ferramenta GAPI.....	72
Figura 24: Avaliação do “caráter verde” do procedimento proposto e do procedimento MIR de referência através da ferramenta GAPI.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CBQL – Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite
- CV – Coeficiente de variação
- DIP – Fotometria por imagens digitais, do inglês *Digital-Image Photometry*
- Er – Erros relativos
- GAC – Química Analítica verde, do inglês *Green Analytical Chemistry*
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*
- HSV – Matiz, saturação e brilho, do inglês *Hue-Saturation-Value*
- LD – Limite de detecção
- LED – Diodo emissor de luz, do inglês *Light Emitting Diode*
- LQ – Limite de quantificação
- MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária
- MIR – Espectroscopia no infravermelho médio, do inglês *Mid Infrared Spectroscopy*
- NIR – Espectroscopia na região do infravermelho próximo, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*
- r – Coeficiente de correlação linear
- RGB – Vermelho, verde e azul, do inglês *Red-Green-Blue*
- ROI – Região de interesse, do inglês *Region Of Interest*
- SAM – Método das adições de padrão, do inglês *Standard Additions Method*
- UHT – Tratamento de esterilização do leite em temperatura ultra alta, do inglês *Ultra-High Temperature*
- UV – Região ultravioleta do espectro eletromagnético
- UV-vis – Regiões ultravioleta-visível do espectro eletromagnético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Qualidade e segurança dos alimentos	21
1.2	Proteína	23
1.2.1	A importância da proteína para os seres humanos	24
1.2.2	Métodos para a determinação de nitrogênio total e/ou proteína	25
1.3	Ureia	30
1.3.1	Ureia como adulterante no leite	30
1.3.2	Métodos analíticos para a determinação de ureia	31
1.4	Separação de analitos voláteis por destilação	33
1.5	Métodos analíticos explorando fotometria por imagens digitais	34
1.5.1	Aquisição das imagens	35
1.5.2	Modelos de cores	35
1.5.3	Processamento e tratamento dos dados	37
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Reagentes e soluções	38
3.1.1	Determinação de proteína em alimentos	39
3.1.2	Determinação de ureia em leite	39
3.2	Instrumentação	39
3.3	Procedimentos	41
3.3.1	Determinação de proteína em alimentos	41
3.3.2	Determinação de ureia em leite	42
3.4	Procedimentos de referência	43

3.4.1	Determinação de proteína em alimentos – Micro-Kjeldahl.....	43
3.4.2	Procedimento de referência - MIR	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Determinação de proteína em alimentos explorando microdestilação e fotometria por imagens digitais	45
4.1.1	Aspectos gerais.....	45
4.1.2	Otimização do procedimento analítico	47
4.1.3	Características analíticas e aplicação	52
4.2	Determinação de ureia em leite com base no monitoramento da hidrólise enzimática por imagens digitais e vídeos	57
4.2.1	Aspectos gerais.....	57
4.2.2	Avaliação de urease extraída de fonte vegetal	58
4.2.3	Otimização do procedimento analítico	60
4.2.4	Avaliação de robustez.....	62
4.2.5	Características analíticas e aplicação	64
5	AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PROPOSTOS PELO <i>GREEN ANALYTICAL PROCEDURE INDEX (GAPI)</i>	71
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Qualidade e segurança dos alimentos

A análise de alimentos é a área da ciência responsável pelos estudos das características físico-químicas e organolépticas dos alimentos, que integra os conceitos de Ciências dos Alimentos e Química Analítica (ANDRADE, 2009). Essa área interdisciplinar oferece, a partir da avaliação experimental, informações nutricionais, sensoriais e características físico-químicas. Também contempla a segurança dos produtos, por meio do controle de qualidade de alimentos e bebidas. Nesse sentido, componentes específicos dos alimentos (e.g. proteínas, açúcares e fibras alimentares) são determinados explorando métodos analíticos clássicos ou instrumentais.

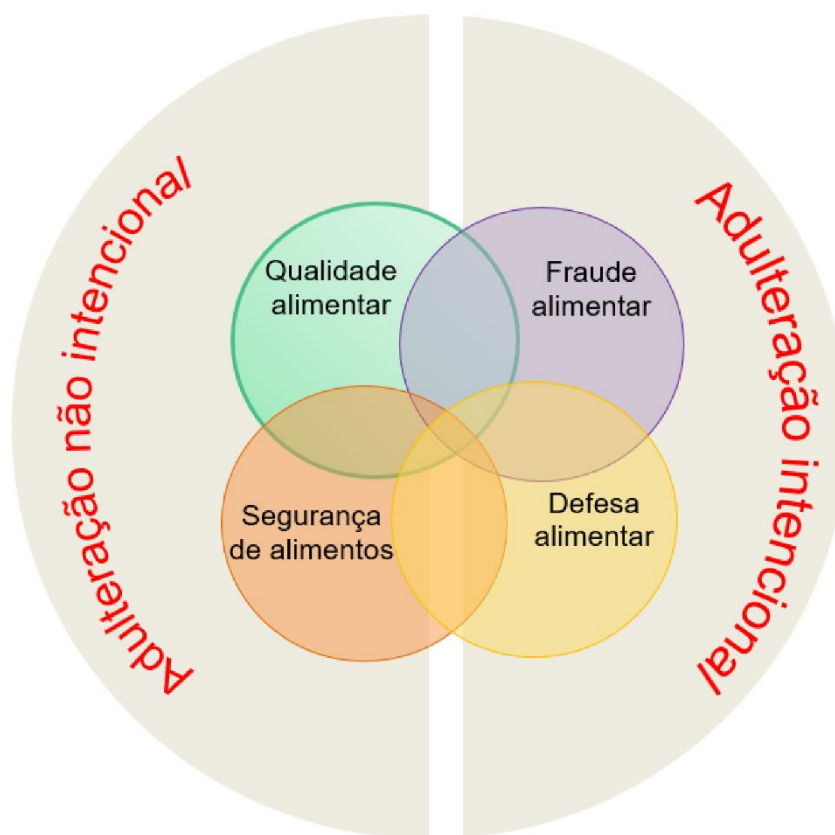
A norma ISO 22000 (ISO, 2018), referente à segurança dos alimentos, define que o alimento deve ser preparado de acordo com as normas sanitárias, visando garantir a segurança dos consumidores. Assim, a qualidade dos alimentos deve ser monitorada a fim de evitar contaminação ou deterioração, que podem ocasionar doenças crônicas e/ou agudas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) definem os padrões de identidade e qualidade dos alimentos. Esses órgãos governamentais são responsáveis pela fiscalização das análises físico-químicas, biológicas, avaliação de rotulagem e estabilidade, a fim de assegurar a inocuidade e segurança dos alimentos. Nesse sentido, a legislação de rotulagem nutricional (RDC nº 429 e Instrução Normativa nº 75) tem o intuito de informar ao consumidor, de forma clara e simples, os principais constituintes do alimento.

As características nutricionais e sensoriais e a composição físico-química dos alimentos são obtidas por órgãos especializados, a partir de métodos analíticos para a avaliação qualitativa e quantitativa (REISSIG, 2009). Essa avaliação também visa a detecção de fraudes, que ocorrem com a intenção de obter lucro e mascarar condições higiênico-sanitárias inapropriadas nos alimentos. Os principais exemplos de fraudes são caracterizados por adulterações de um ingrediente ou substância, falsificação, alterações de fórmulas e rotulagem incorreta, podendo ocorrer em todas as etapas da cadeia produtiva, até o momento da venda (SPINK; MOYER, 2011). Os

atos fraudulentos podem ser intencionais, cuja motivação predominantemente é econômica, e não intencionais (erros), podendo ser de ocorrência natural ou falhas/desatenção durante a elaboração do produto. Os conceitos de defesa dos alimentos (*food defense*), fraude alimentar (*food fraud*), qualidade alimentar (*food quality*) e segurança dos alimentos (*food safety*) são utilizados para diferenciar essas adulterações (Figura 1).

Figura 1: Diferenciação entre adulteração intencional e acidental.



Adaptada de (MELO; SILVA; SILVA, 2021)

O leite e seus derivados estão entre os alimentos mais susceptíveis a adulterações e fraudes devido à longa cadeia de produção e distribuição do produto e à alta demanda mundial. Neste sentido, a má prática mais comum é a diluição, usualmente acompanhada pela adição de compostos nitrogenados (e.g. ureia), para mascarar a concentração total de proteína (2,6 a 3,2% em leite), uma vez que métodos

usuais (Kjeldahl e Dumas) quantificam proteínas com base no teor total de nitrogênio no produto (CHAUHAN; MANDAL; PAUL, 2019).

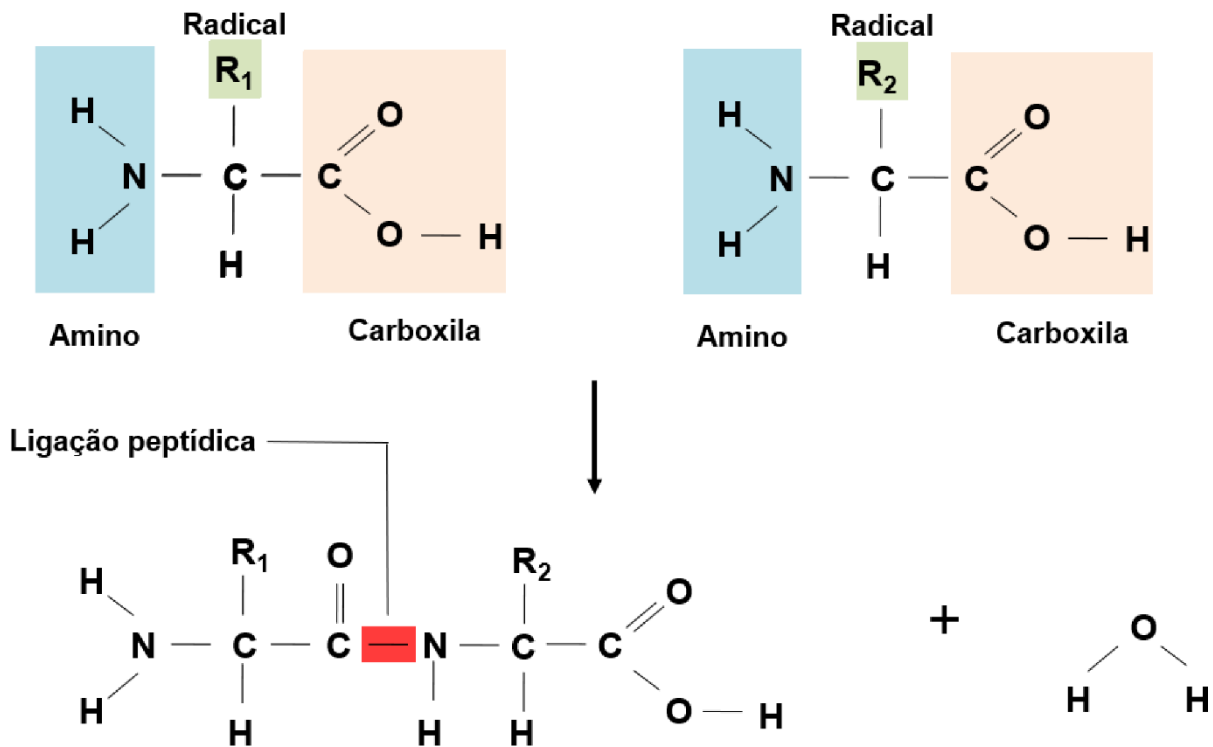
Com o avanço tecnológico, a análise de alimentos vem se expandindo e encontrando novas possibilidades de inovação e ampliação multidisciplinar (SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021). Diante destes aspectos e da necessidade de novas propostas capazes de superar as limitações nos procedimentos convencionais, têm se buscado metodologias analíticas alternativas, de fácil execução, baixo custo e com menor consumo de reagentes e geração de resíduos que sejam eficazes para o controle de qualidade dos alimentos (BORRÀS et al., 2015; DAMODARAN; KIRK, 2018).

1.2 Proteína

As proteínas, grupo mais abundante de macromoléculas, são fundamentais para a saúde dos seres vivos pois desempenham diversas funções biológicas e nutricionais (ALBERTS et al., 2002). Cada proteína é formada por uma ou mais cadeias de aminoácidos, que são moléculas orgânicas contendo grupamentos carboxílicos (-COOH) e amina (-NH₂). Nas proteínas, os aminoácidos se ligam através da ligação peptídica (Figura 2), formada pela reação de condensação de um grupamento carboxílico de um aminoácido com o grupo amina de outro aminoácido (NELSON; COX, 2013). Estes dois grupos estão ligados a um átomo de carbono adjacente ao grupo funcional, designado carbono alfa.

As proteínas podem ser classificadas de acordo com sua forma, podendo ser simples, conjugadas ou derivadas. As proteínas simples são constituídas apenas por aminoácidos. As proteínas conjugadas possuem um grupo de origem não peptídica (grupo prostético, tais como coenzimas ou grupos fosfato), além de aminoácidos. Já as proteínas derivadas, que não são encontradas na natureza, são obtidas pela degradação dos outros dois tipos de proteína. Além desta classificação, as proteínas também podem ser subdivididas em estruturais ou funcionais.

Figura 2: Representação da ligação peptídica formada por condensação entre dois aminoácidos.



Adaptada de (NELSON; COX, 2013).

1.2.1 A importância da proteína para os seres humanos

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a funcionalidade de uma proteína está relacionada com a composição dos aminoácidos e sua biodisponibilidade. As proteínas possuem grande funcionalidade nos processos biológicos, atuando como catalisadores (enzimas), auxiliando na produção de hormônios, antígenos e anticorpos. Devido à presença dos peptídeos bioativos nas sequências primárias, as proteínas possuem importantes funcionalidades também para a saúde, e.g. ação antibacteriana (lactoferrina), reguladoras na função biológica e de defesa (imunoglobulinas) (TOMÉ; DEBABBÍ, 1998).

As proteínas também atuam com função nutricional e funcional e são utilizadas para fornecer aspectos gelificantes (estrutura gelatinosa), emulsificação, viscosidade e textura no processamento de alimentos. O papel nutricional das proteínas tem sido amplamente estudado e seu uso como ingrediente funcional vem

ganhando destaque nos últimos anos. Produtos com características especiais têm sido desenvolvidos, como preparados à base de plantas (*plant based*) e proteínas alternativas (*seaweed*), agregando valor a subprodutos industriais e aumentando a variedade de derivados proteicos de origem vegetal a serem comercializados (YULIARTI; KIAT KOVIS; YI, 2021).

1.2.2 Métodos analíticos para a determinação de nitrogênio total e/ou proteína

A determinação de proteína é de suma importância para a indústria alimentícia. Por exemplo, o teor de proteína compõe o sistema de pagamento de leite por qualidade (MELO et al., 2020; YANG et al., 2020) e, em alguns casos, pode agregar maior rendimento (e.g. fabricação de queijos) e garantir textura aos alimentos (e.g. pães e bolos). Neste contexto, métodos alternativos para a determinação de proteína, que sejam simples de serem executados e de baixo custo são de interesse para a indústria de alimentos.

Muitos procedimentos analíticos têm sido propostos para a determinação de proteína, conforme exemplificado na Tabela 1, de forma que não há a definição de um método de uso universal. Os métodos analíticos disponíveis se diferenciam pelo princípio de determinação, equipamentos utilizados, tempo de análise, custo e sensibilidade. Esses fatores são decisivos na escolha do procedimento a ser utilizado. Conhecer o princípio do método analítico, a composição da matriz e os reagentes envolvidos é um aspecto importante, uma vez que a amostra precisa ser compatível com o método a ser aplicado (OLSON; MARKWELL, 2007).

Tabela 1. Principais métodos analíticos para a determinação de proteína.

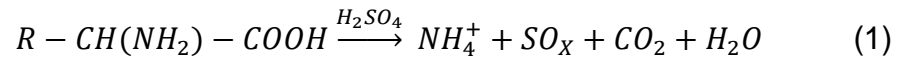
Método	Princípio do método	LOD (mg kg⁻¹)
Kjeldahl	Quantificação de nitrogênio de origem orgânica (Digestão, destilação e titulação)	0,1
Lowry	Redução do reagente de Folin-Ciocalteau ao reagir com as proteínas - Colorimétrico	1x10 ⁻⁵
Bradford	Interação do corante BG-250 com as proteínas - Colorimétrico	2x10 ⁻⁵
Dumas	Combustão da matéria orgânica/ Determinação do nitrogênio por condutividade térmica	-
Biureto	Reativo de Biureto – Reação do cobre com a proteína – Colorimétrico	1x10 ⁻³
Ácido biquinolínico (BQA)	Redução Cu(II) pelas proteínas e formação um complexo de Cu(I) com o BQA – Colorimétrico	0,5

1.2.2.1 Teor de nitrogênio total e proteína por método de Kjeldahl

A quantificação de proteína em amostras alimentícias, através da determinação do nitrogênio total, foi proposta por Kjeldahl no século XIX (JÚNIOR, 2018). Atualmente, o método de Kjeldahl é bem estabelecido, sendo um dos mais utilizados nas determinações de proteínas em alimentos e considerado em vários países como o método oficial, incluindo no Brasil.

O procedimento é realizado em 3 etapas: i) digestão sulfúrica da amostra com conversão das proteínas e demais compostos orgânicos em amônio, II) destilação da amônia e III) determinação da amônia e correlação estequiométrica com a quantidade de proteínas. Na primeira etapa ocorre a decomposição da matéria orgânica por digestão ácida em alta temperatura (até 400°C). A matéria orgânica é transformada em amônio pelo ácido sulfúrico, geralmente em meio da mistura (e.g. K₂SO₄ + CuSO₄), que apresenta ação catalítica e aumenta a temperatura de ebulição (Eq. 1). Na segunda etapa, o meio é alcalinizado (Eq. 2) e a amônia é destilada e coletada em um frasco contendo solução absorvedora (e.g. ácido bórico) e indicador ácido-base (e.g. vermelho de metila e verde de bromocresol) (Eq. 3). Conforme a destilação vai ocorrendo, o borato de amônio vai sendo formado o qual, na última etapa, é titulado com uma solução de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico com concentração conhecida. Ao final do processo, o teor de nitrogênio é obtido através da estequiometria e a

conversão em proteína bruta é realizada multiplicando a quantidade de nitrogênio determinada por um fator de conversão, que depende do tipo de alimento e das proteínas características (e.g. leite e produtos lácteos: 6,38; ovo: 6,68; soja: 5,71) (YANU; JAKMUNEE, 2017).



Apesar de amplamente utilizado, o método de Kjeldahl é moroso, devido às várias etapas envolvidas no procedimento, gera quantidades significativas de resíduos e requer reagentes tóxicos (SÁEZ-PLAZA et al., 2013). Novas propostas vêm sendo exploradas a fim de aprimorar o método de Kjeldahl, como por exemplo, a digestão em escala reduzida (DIDPINRUM et al., 2021). Por ser um procedimento baseado na quantificação de nitrogênio total e não de proteína, a adição de outros compostos nitrogenados não proteicos para restaurar de forma fraudulenta o teor de proteína no alimento, não é identificada por esse método analítico. Como exemplo, a adição de ureia para mascarar a adulteração de leite por diluição (LOPES; SANTANA, 2005).

No método de Kjeldahl, alternativamente à determinação volumétrica, é possível a determinação de amônio nos digeridos por métodos espectrofotométricos (YANU; JAKMUNEE, 2017) ou condutométricos (NAKATA et al., 1988; SASAKI et al., 2019), neste último caso após a separação de amônia por difusão gasosa em sistemas de análises em fluxo.

1.2.2.2 Métodos espectrofotométricos para a determinação de proteína

O método colorimétrico de Biureto se baseia na reação do reagente de Biureto, composto por íons cobre(II), hidróxido de sódio e um agente complexante para estabilizar o cobre em solução (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). Em meio alcalino, ocorre a redução do cobre(II) formando um complexo com as ligações peptídicas das proteínas, que apresenta duas bandas de absorção (270 e 540 nm). A absorção em 540 nm é mais utilizada para análises quantitativas, visto que, várias substâncias absorvem na região de 270 nm, aumentando a susceptibilidade às

interferências (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). A intensidade da coloração obtida é proporcional à quantidade de proteína na solução.

Apesar de ser mais sensível, simples e prático que o método de Kjeldahl e utilizar reagentes de baixo custo, o método de Biureto é menos sensível que outros métodos espectrofotométricos, como os métodos de Lowry e Bradford. Atualmente, o método de Biureto é mais usado para a determinação de proteínas séricas (ZHENG et al., 2017) e em urina (SAVORY; PU; SUNDERMAN JR, 1968). Para determinação em alimentos, o método já foi aplicado a gelatinas (ZHOU; REGENSTEIN, 2006), leite, queijo e carne (REICHARDT; ECKERT, 1991).

O método colorimétrico de Lowry, variante do método de Biureto, se baseia em duas reações químicas para determinação de proteínas totais. A primeira é a reação de Biureto, i.e. redução do íon cobre(II) pelas proteínas em meio alcalino, formando um complexo metálico. Na segunda etapa, o reagente de Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) é reduzido pelo complexo metálico formado anteriormente, produzindo um composto de coloração azul (máxima absorção em 750 nm) (LOWRY et al., 1951; SMITH et al., 1985). A intensidade da coloração obtida é proporcional à quantidade de proteína na solução.

Apesar de ser um método bastante sensível, o tempo de análise é longo e possui alta susceptibilidade a interferentes (e.g. compostos fenólicos, ácido úrico e açúcares), que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, resultando em um falso positivo, e os lipídios, que provocam turbidez das amostras (ZAIA; VERRI JUNIOR; ZAIA, 1999).

Exemplos de aplicação do método de Lowry incluem a determinação de proteína em plasma sanguíneo (NISHI; KESTNER; ELIN, 1985), tecido animal (UPRETI; RATCLIFF; RICHES, 1988), leite humano (BAUER; GERSS, 2011) e, em menor proporção, em produtos alimentícios como feijão, lentilha e grão de bico (RIZVI et al., 2022), hidrolisados de proteína (e.g. linhaça, soja e ervilha) (NWACHUKWU; ALUKO, 2019) e leite (KAMIZAKE et al., 2003).

O método de Bradford para quantificar proteínas se baseia na reação do corante *Coomassie brilliant blue* (BG-250) com as proteínas formadas por aminoácidos de cadeia lateral básica (e.g. lisina e histidina) ou aromática (e.g. triptofano e tirosina), no entanto, este método não quantifica proteínas totais (CHIAL; THOMPSON; SPLITTGERBER, 1993). Essa interação desloca o equilíbrio do corante BG-250 para a forma aniônica, gerando uma mudança de cor de castanho escuro para

azul (máxima absorção em 595 nm), de acordo com a concentração de proteína (BRADFORD, 1976). A determinação da proteína é, então, baseada na intensidade da coloração azul, medindo a absorbância da solução em 595 nm.

O método de Bradford é relativamente mais rápido e sensível que o de Lowry, no entanto apresenta algumas limitações, como a variação da absorvidade molar para diferentes proteínas (FOUNTOULAKIS; JURANVILLE; MANNEBERG, 1992). Algumas modificações do método foram realizadas com o intuito de diminuir a variação da absorvidade molar entre proteínas, como o aumento da concentração do BG-250 ou redução da concentração de ácido fosfórico (READ; NORTHCOTE, 1981).

O método de Bradford é mais usual em análises clínicas, com destaque para a determinação em plasma sanguíneo (HUNN; GREER, 1990), saliva humana (JENZANO et al., 1986) e urina (GOREN; LI, 1986). Para produtos alimentícios, o método foi aplicado à determinação de proteínas em grãos (milho, farelo de soja e cevada) (KARIMI et al., 2022) e em leite em pó (KAMIZAKE et al., 2003).

O método de Dumas, assim como o método de Kjeldahl, estima indiretamente a quantidade de proteínas através do teor de nitrogênio total. O método é baseado na combustão das amostras orgânicas, em sistema fechado e sob altas temperaturas (800 – 1000°C), com conversão a óxidos de nitrogênio. Posteriormente, esses gases passam por uma etapa de redução, na qual são transformados em nitrogênio molecular para a quantificação por detector de condutividade térmica (JUNG et al., 2003).

Os valores obtidos com o método de Dumas são relativamente superiores aos obtidos pelo método de Kjeldahl. Isso ocorre porque as espécies de nitrogênio inorgânico também são reduzidas e quantificadas juntamente com o nitrogênio orgânico. A aplicação se estende a diversos produtos alimentícios, como cereais (SERRANO; RINCÓN; GARCÍA-OLMO, 2013), produtos cárneos (MIHALJEV et al., 2015) e soro do leite (CHIACCHIERINI et al., 2003).

O método do ácido biquinolínico (BQA) também se baseia na redução do Cu(II) pelas proteínas, e o Cu(I) posteriormente forma um complexo violeta com BQA (máximo de absorção em 562 nm) (SMITH et al., 1985). A sensibilidade do método de BQA é semelhante à do método de Lowry. No entanto, esse método é susceptível a interferências (e.g. açúcares, lipídeos e peróxido de hidrogênio), pois podem reagir com os íons de cobre(II) ou cobre (I).

Exemplos de aplicação do método BQA incluem a determinação de proteínas em saliva (JENZANO et al., 1986) e leite humano (KELLER; NEVILLE, 1986), podendo também ser aplicado a alguns alimentos, como em amendoim (POMS; CAPELLETTI; ANKLAM, 2004), cerveja (SIEBERT; LYNN, 2005) e cereais (CHAN; WASSERMAN, 1993).

1.3 Ureia

A ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) é um composto orgânico formado por dois grupos amina ($-\text{NH}_2$) ligados por uma carbonila ($-\text{CO}-$). É um composto encontrado na urina dos mamíferos (e.g. vacas) e de aplicação agrícola, como fonte de nitrogênio. A ureia também é muito utilizada em vários processos industriais, como na produção de plásticos, herbicidas agrícolas, alimentos para ruminantes, aumento de solubilidade de corantes na indústria têxtil, dentre outros (SUAREZ et al., 2018).

1.3.1 Ureia como adulterante no leite

O leite é um dos alimentos mais consumidos mundialmente, especialmente devido ao alto valor nutricional (fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais), ampla disponibilidade e custo relativamente baixo. O leite apresenta uma concentração intrínseca de ureia, a qual é utilizada como marcador biológico da saúde do animal, podendo indicar enfermidades ou falta/excesso de nutrientes na alimentação (FAVERDIN; VÉRITÉ, 1998). Por ser um composto que está presente naturalmente no leite e ser de baixo custo, ureia é usada para fraudes com o intuito de mascarar a diminuição do teor de proteína decorrente da fraude por diluição com água. A legislação sanitária brasileira define que o limite de ureia no leite deve ser de $0,14 - 0,50 \text{ g L}^{-1}$, que é ampliado para $0,80 \text{ g L}^{-1}$ para vacas em período de lactação (EDOUARD et al., 2018). A ingestão de ureia acima de $0,70 \text{ g L}^{-1}$ pode causar alguns problemas de saúde, como dispepsia, acidez estomacal, úlceras, náuseas e insuficiência renal (HONORATO SANTOS NETO et al., 2022; TRIVEDI et al., 2009). O leite pode ser adulterado com a ureia de duas maneiras – pela adição intencional do produto e pela adição de leite sintético ao leite natural (AZAD; AHMED, 2016).

A determinação de ureia no leite é necessária para garantir a segurança dos consumidores, para detectar possíveis fraudes e garantir a qualidade do produto ofertado. Alguns laboratórios credenciados pelo MAPA usualmente determinam ureia junto à composição centesimal, células somáticas (CCS) e contagem bacteriana de leite (ALMEIDA et al., 2008). Devido à importância de monitorar a qualidade do leite nos diversos estágios de produção, procedimentos para análises *in situ*, práticos, com mínimo consumo de reagentes e solventes têm sido desenvolvidos (FAGNANI, 2020).

Algumas limitações são observadas nos procedimentos para a determinação de adulterantes em leite, seja em relação à disponibilidade de equipamentos em laboratórios ou à alta demanda de tempo e utilização de reagentes tóxicos. Dentre as alternativas que permitem alcançar as características desejadas, as análises por imagens digitais obtidas através da câmera de smartphone têm se difundido e apresentado resultados satisfatórios para identificação de fraudes em leites (SILVA; GONÇALVES; ROCHA, 2021).

1.3.2 Métodos analíticos para a determinação de ureia

Os métodos analíticos para a determinação de ureia são classificados em condutométricos, espectrofotométricos, volumétricos e potenciométricos. Nos laboratórios de controle de qualidade de leite, os métodos mais utilizados para a determinação de ureia são os enzimáticos, os quais são baseados na hidrólise catalisada pela enzima urease (AOAC INTERNATIONAL, 1990; GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001).

A detecção de formaldeído em leite é também um indício da adição de ureia, pois a ureia de uso agrícola (fertilizante) possui um revestimento feito com formaldeído (FAGNANI, 2020). O uso de ureia fertilizante para mascarar a diluição do leite é frequente, pois é de baixo custo e fácil acesso.

1.3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é uma técnica de separação dos componentes de uma solução que envolve a distribuição diferencial dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária (LANÇAS, 2009). Os analitos que apresentam maior afinidade com a fase estacionária permanecem mais tempo retidos na coluna cromatográfica, sendo a

resposta analítica gerada em função do tempo (cromatograma) em que cada espécie alcança o detector (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). As principais vantagens da técnica são versatilidade, possibilitando análises de compostos orgânicos ou inorgânicos, e precisão (desvios relativos inferiores a 0,5%). As limitações se baseiam no alto custo dos equipamentos e de manutenção, além de necessitar de operadores qualificados, demandar maior tempo de análise e, usualmente, preparo de amostra moroso (BÉLANGER; JOCELYN PARÉ; SIGOUIN, 1997).

A técnica de HPLC já foi explorada para determinar ureia em urina humana e animal e em vinho (CLARK et al., 2007). A detecção fluorimétrica foi realizada com comprimentos de onda de excitação e emissão de 213 nm e 308 nm, respectivamente, incorporando a derivatização do xantidrol. Os resultados foram concordantes com os obtidos com os kits baseados na hidrólise enzimática da ureia. Efeitos de matriz foram observados e, portanto, a calibração usando o método das adições padrão foi utilizada. Outra aplicação foi a determinação de ureia em leite (CZAUDERNA; KOWALCZYK, 2009). Para isso, foi realizada a derivatização usando p-dimetil aminobenzaldeído (DMAB) em meio de HCl. As amostras foram analisadas em coluna C18 (4 µm, 300 x 3,9 mm), com um programa de eluição de gradiente ternário (metanol, água e tampão fosfato) e detecção no UV, em 255 e 414 nm. A escolha dos dois comprimentos de onda se deve à formação do cromóforo (através da derivatização da ureia) que é capaz de absorver em comprimentos de onda mais longos (220-280 nm e 340-460 nm). O método oferece baixos limites de detecção (5,6 e 43 ng de ureia, respectivamente) e de quantificação (19 e 142 ng, respectivamente).

1.3.2.2 Sensores potenciométricos

Os sensores potenciométricos são dispositivos de baixo custo que permitem análises *in situ* e em tempo real. As medidas são realizadas com base na diferença de potencial entre um eletrodo de referência, de potencial conhecido e constante, e um eletrodo de trabalho, que responde à concentração do analito (BRATOV; ABRAMOVA; IPATOV, 2010).

Vários procedimentos vêm sendo desenvolvidos utilizando sensores potenciométricos para a detecção de ureia, através do íon amônio produzido pela hidrólise enzimática (CORREIA; MAGALHÃES; MACHADO, 2005; LAKARD et al., 2004; ÖZBEK et al., 2022). Ramesh et al., (2015) avaliaram o biossensor

potenciométrico a partir da urease bacteriana de *Arthrobacter creatinolyticus* imobilizada em membrana para a análise de amostras de leite acrescidas de ureia. Foi obtida uma faixa linear de 1-100 mmol L⁻¹ de ureia e LOD de 0,3 mmol L⁻¹, comparável aos demais métodos, tornando-se uma alternativa viável para a determinação de ureia em leite.

1.3.2.3 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

O método baseado em NIR consiste na absorção da radiação eletromagnética na faixa do infravermelho próximo (750 a 2500 nm). A interação ocorre a partir da incidência da radiação sobre uma amostra produzindo um espectro com base em medidas de absorbância, reflectância ou transmitância (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). O espectrômetro NIR é um equipamento de alta precisão composto por uma fonte de radiação, interferômetro, amplificador e detector (PASQUINI, 2003). Os espectros são usualmente processados através da análise multivariada e os valores são relacionados aos obtidos por métodos analíticos convencionais (VIANA, 2008). De maneira geral, os espectrômetros NIR tem como características distintivas a faixa espectral e precisão do comprimento de onda.

A espectroscopia NIR é uma técnica analítica quantitativa e qualitativa não destrutiva que requer pouco preparo de amostra (GUILLOU; PELISSIER; GRAPPIN, 1986; RIBADEAU-DUMAS; GRAPPIN, 1989). Apesar das vantagens, a técnica possui algumas limitações, e.g. a necessidade de muitas amostras para construir o modelo de predição e o tratamento dos dados por modelos quimiométricos, além de necessitar de analistas qualificados para avaliação periódica dos modelos preditivos (RIBADEAU-DUMAS; GRAPPIN, 1989).

Como exemplo de aplicação, Khan et al. (2015) utilizaram o método baseado em NIR para detecção de ureia em leite. Os resultados foram concordantes com os obtidos pelo método de referência e o limite de detecção (30 mg L⁻¹) obtido foi suficiente para quantificar ureia em níveis abaixo do recomendado (70 mg L⁻¹).

1.4 Separação de analitos voláteis por destilação

A destilação é um método para a separação de analitos voláteis da matriz da amostra, amplamente utilizada na área de alimentos para a purificação de produtos (HALVORSEN; SKOGESTAD, 2000). Por exemplo, a destilação é usualmente empregada na concentração/purificação de óleos essenciais e produção de bebidas alcoólicas destiladas. Destilações são também bastante usadas para a purificação de solventes e ácidos. Do ponto de vista analítico, a destilação é considerada um processo de separação moroso, motivando a proposta de alternativas mais viáveis, como a separação por difusão gasosa (NAKATA et al., 1988; SASAKI et al., 2019), pervaporação (KAMOWAGA et al., 2000) e microdestilação (SOARES; ROCHA, 2019).

Procedimentos de microdestilação se destacam pela alta eficiência de separação e miniaturização, com conseqüente redução no consumo reagentes e solventes. Estratégias têm sido propostas empregando a microdestilação, visando diminuir o tempo e aumentar a eficiência de separação do analito. Esta abordagem foi explorada para a determinação de amônia e nitratos em solos (MCLEOD, 1992), dióxido de enxofre em vinhos (MAQUIEIRA et al., 1993) e compostos orgânicos em água (BRUCE; LEE; STEPHENS, 1992). Soares e Rocha (SOARES; ROCHA, 2019) desenvolveram um microdestilador construído a partir de materiais de baixo custo (tubos tipo Falcon e Eppendorf), que foi aplicado com sucesso à separação do metanol do biodiesel. Para essa aplicação, foram consumidos somente 200 μ L de amostra, com eficiência de transferência do analito para a solução absorvedora estimada em $98 \pm 3\%$. (MENEZES, 2006).

1.5 Métodos analíticos explorando fotometria por imagens digitais

Uma imagem digital é definida como uma função bidimensional $f(x,y)$, onde x e y são coordenadas planas, e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x,y) é chamada de intensidade na imagem no referido ponto (GONZALEZ; WOODS, 2010). As imagens digitais podem ser coloridas ou monocromáticas. Se colorida, o sistema colorimétrico *Red-Green-Blue* (RGB) é o que apresenta maior aplicação. Neste modelo, as imagens consistem em três planos de imagens independentes, um para cada uma das cores primárias, que se combinam para produzir uma imagem de cores compostas (GONZALEZ; WOODS, 2010).

A utilização de fotometria por imagens digitais para a caracterização e determinação da composição de diferentes materiais é crescente em diversas áreas, devido à portabilidade, baixo custo, alta acessibilidade e instrumentação simples. Esta estratégia também tem se tornado uma ferramenta analítica importante na área de alimentos, inclusive para o controle de qualidade e identificação de casos de adulteração, deterioração e fraude nos produtos (SANTOS; PEREIRA-FILHO, 2013). Alguns exemplos de aplicações são a avaliação da autenticidade do leite (LIMA et al., 2020b; SANTOS; PEREIRA-FILHO, 2013), a determinação do teor de etanol em bebidas (PESSOA et al., 2017), de compostos fenólicos em frutas (MARTINS et al., 2021), do teor de amilose em arroz (TUAÑO; CASTRILLO; VIOLA, 2021), avaliação do amadurecimento da banana (CHO; KOSEKI, 2021) e avaliação de vinhos de acordo com a origem geográfica das uvas, tipo e fabricante (LIMA et al., 2020a).

1.5.1 Aquisição das imagens

A fotometria por imagens digitais se baseia na medição da intensidade da radiação refletida pela amostra, por exemplo, através da câmera de um smartphone, e conversão a um sistema de cores, usualmente o sistema RGB. As medidas fotométricas são tipicamente realizadas em condições de iluminação controlada, mantendo constante a distância entre a câmera e o objeto de medida e a área da imagem capturada (ROI, do inglês *region of interest*). Em aplicações analíticas, usualmente, as medições são realizadas após a derivação química do analito, com formação de um produto colorido, possibilitando a medida fotométrica e conferindo seletividade ao procedimento. Aplicativos de acesso livre (e.g. Photometrix® e ColorGrab®) são disponíveis para a conversão das imagens aos canais de cores apropriados. Os métodos analíticos baseados em imagens digitais têm como principais vantagens o baixo custo, instrumentação simples e portabilidade, com possibilidade de análises no local, o que facilita a tomada de decisão e agilidade na emissão dos resultados.

1.5.2 Modelos de cores

No sistema RGB as cores são especificadas através da mistura das três cores básicas vermelho (R), verde (G) e azul (B) em uma matriz tridimensional, sendo o mais

usado para armazenar e representar imagens digitais (KIM et al., 1998). Cada canal possui uma intensidade de coloração, variando de 0 (ausência total de cor) a 255 (intensidade máxima de uma cor). A combinação dos três canais do modelo RGB resulta em mais de 16 milhões de tonalidades de cores diferentes (256^3). Alguns exemplos de aplicações são a quantificação de açúcar redutor em bebidas (TEIXEIRA; SANTOS, 2022), determinação de gordura em produtos cárneos curados (CRUZ-FERNÁNDEZ et al., 2017), detecção da toxicidade de águas residuais (LI et al., 2023) e determinação de cobre em cachaça (FERNANDES et al., 2020a).

Outro espaço de cor usual para obter a informação analítica é o modelo HSV, definidos por matiz (H), saturação (S) e luminosidade (V) (CAPITAN-VALLVEY et al., 2015; FERNANDES et al., 2020b). A matiz está relacionada com a cor do objeto, ou seja, com faixa de comprimento de onda da radiação absorvida, podendo variar de 0 a 360° . A saturação determina a pureza da cor, sendo 0% (maior tonalidade cinza/sem cor) a 100% (mais pura a cor/cor intensa). Por último, a luminosidade representa o brilho da cor, variando de 0% (ausência de cor) a 100% (saturação). Exemplos de aplicação do espaço HSV são: determinação de sulfeto em água (ARIZA-AVIDAD et al., 2015) e determinação de pH (MARTINEZ-OLMOS et al., 2011).

O sistema de cores Lab é descrito pelas coordenadas L^* (luminosidade, que varia de 0 a 100), a^* e b^* , que representam a mudança de cor do vermelho para verde e do amarelo para o azul, com intervalos de -120 a 120 (FERNANDES et al., 2020b). Este sistema de cores foi explorado para determinar proteína (SUZUKI; SUZUKI, 2005), avaliar a cor dos alimentos (YAM; PAPADAKIS, 2004) e determinar de cloro residual em água (SUZUKI et al., 2006).

A escala de cinza (*grayscale*) possui uma abordagem mais simples e corresponde à intensidade da cor com um tom de cinza, que varia de 0 (preto) a 255 (branco) do sistema RGB. Exemplos da aplicação deste modelo de cor incluem detecção de adulteração no teor de gordura em hambúrgueres de frango (FERNANDES et al., 2019) e avaliação do frescor do espinafre (KOYAMA et al., 2021).

O modelo CMY se baseia na mistura de cores. As cores ciano, magenta e amarelo são complementares às matrizes vermelho, verde e azul, respectivamente. A representação das cores no modelo CMY são semelhantes às obtidas com o modelo RGB, no entanto, é um sistema subtrativo que combina cores primárias para formar cores secundárias (CAMUFFO, 2019). Os valores obtidos a partir das cores secundárias variam de 0 a 100%. Esse sistema de cores é usualmente empregado

para obtenção de imagens utilizando scanner ou outro equipamento análogo (FERNANDES et al., 2020b).

1.5.3 Processamento e tratamento dos dados

A forma de processamento de dados depende primeiramente do sistema de cores utilizado. No caso do sistema RGB, a intensidade da radiação refletida é inversamente proporcional à intensidade da cor e, portanto, da concentração do analito. Para se obter a resposta analítica (S), usualmente subtrai-se o valor obtido com a amostra do valor do branco analítico (ACEVEDO et al., 2018) ou de 255 (PORTO et al., 2019), que representa a reflexão total de radiação. Outra abordagem bastante explorada é a combinação de canais, por exemplo, conforme indicado pela Eq. 5, visando aumentar a sensibilidade ao somar as respostas obtidas em diferentes canais (SILVA; ROCHA, 2022).

$$S = \sqrt{(255 - R)^2 + (255 - G)^2 + (255 - B)^2} \quad (5)$$

Outra opção utilizada para o processamento da resposta analítica é a equação logarítmica (Eq. 6) que se baseia nos princípios da Lei de Lambert-Beer. No entanto, é determinada a reflectância ao invés da transmitância como descreve a lei de Beer (FRANCO et al., 2021; TEIXEIRA; SANTOS, 2022).

$$S = -\log \frac{I_b}{I_a} \quad (6)$$

Em que:

I_b = sinal analítico médio do branco

I_a = sinal analítico médio da amostra ou solução de referência.

Recentemente, a análise multivariada vem sendo explorada em fotometria por imagens digitais para o processamento dos dados, especialmente com o intuito de minimizar efeitos de matriz. Por exemplo, a regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês *Partial least squares regression*) foi explorada para a detecção de adulterações em queijo ralado (VISCANTI et al., 2023), vinhos envelhecidos

(HERRERO-LATORRE et al., 2019) e de ketchup com corante Sudan I (1-fenildiazenil-2-naftol) (REILEA et al., 2020), além da determinação de nitrito em águas (SHARIATIRAD; IRANDOUST; MOHAMMADI, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho de mestrado foi o desenvolvimento de alternativas analíticas simples, rápidas, economicamente viáveis, ambientalmente amigáveis e de fácil execução para a determinação de compostos nitrogenados (proteína e ureia) em alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um procedimento analítico para a determinação de proteína em alimentos por microdestilação, posterior à digestão pelo método de Kjeldahl, com detecção por fotometria por imagens digitais;
- Desenvolver um procedimento analítico para a determinação de ureia em leite utilizando fotometria por imagens e vídeos digitais, explorando a hidrólise enzimática catalisada por urease.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Amostras de leites desnatado, semidesnatado e integral de oito marcas (pasteurizados e esterilizados pelo processo de ultra alta temperatura, UHT), e amostras de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) e lentilha (*Lens culinaris*), de cinco marcas, foram adquiridas no comércio local das cidades de Águas de São Pedro/SP e Piracicaba/SP. Para o desenvolvimento do procedimento analítico para a determinação de ureia em leite foram também utilizadas amostras de leite cru adquiridas junto à Clínica do Leite-ESALQ/USP, atrelada à Rede de Laboratórios Certificados pelo Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL).

Todas as soluções foram preparadas em água deionizada (resistividade > 18 M Ω cm) ou etanol, a partir de reagentes de grau analítico.

3.1.1 Determinação de proteínas em alimentos

Soluções de referência de amônio ($5,0\text{--}50,0\text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas semanalmente em H_2SO_4 $1,7\text{ mol L}^{-1}$ (Merck, Alemanha) por diluição de uma solução estoque de amônio $2,000\text{ g L}^{-1}$, obtida de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, Alemanha). Uma solução de NaOH 10% m/v (Merck, Alemanha) foi preparada pela dissolução do reagente em água. Uma solução estoque de vermelho de fenol 0,100% m/v foi preparada em etanol e soluções 0,001% m/v foram preparadas por diluição do estoque em meio de etanol:água 1:1 v/v.

Para o método de referência, uma solução de H_3BO_3 4,0% m/v foi preparada em água e um indicador ácido-base misto foi preparado pela dissolução de 0,132 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol em 200 mL de etanol 70% v/v.

3.1.2 Determinação de ureia em leite

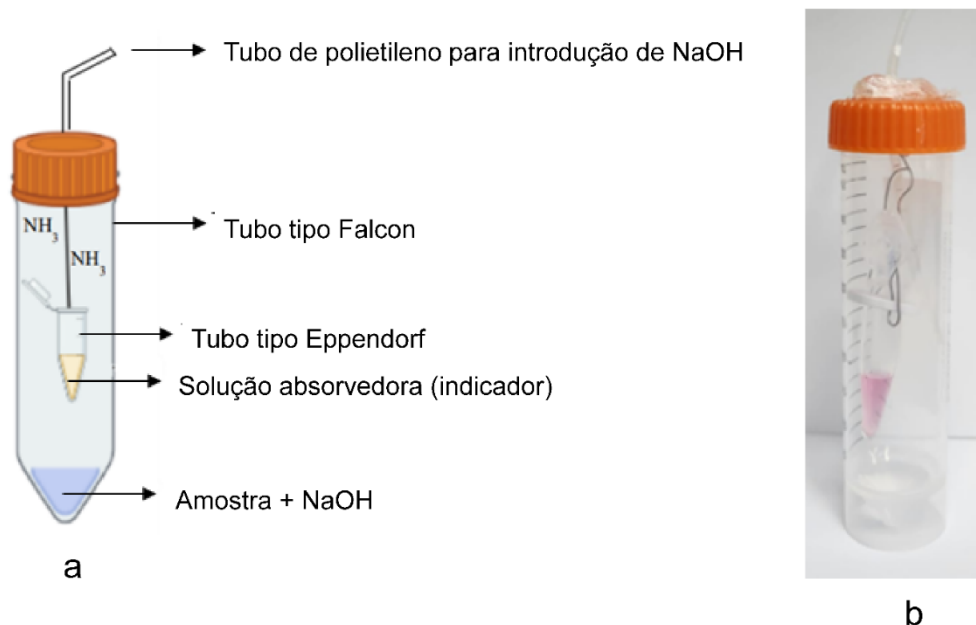
Uma solução estoque 100 mg L^{-1} foi preparada pela dissolução de ureia (Sigma, Steinheim, Alemanha) em água. Soluções de referência ($2,0$ a $15,0\text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas diariamente pela diluição do estoque em água. A solução enzimática foi preparada pela dissolução de 0,005 g de urease comercial (Sigma, Steinheim, Alemanha; 15.000-50.000 unidades/g, extraída de *Jack Bean*, *Canavalia ensiformis*) em 10 mL de água. A solução manteve-se estável por pelo menos 5 dias quando armazenada sob refrigeração ($5\text{ }^\circ\text{C}$).

Uma solução de vermelho de fenol 0,01% m/v foi preparada pela dissolução de 5 mg do indicador ácido-base (Merck, Alemanha) em 25 mL de etanol anidro e completando o volume para 50 mL com água. Esta solução foi armazenada a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2 Instrumentação

Para o método de determinação de proteína, o sistema de microdestilação, ilustrado na Figura 3, foi construído em laboratório conforme descrito anteriormente (SOARES; ROCHA, 2019), com algumas adaptações. O sistema consiste em um tubo tipo Falcon de fundo cônico de 50 mL contendo a amostra, com um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo a solução absorvedora/indicadora, suspenso em seu interior.

Figura 3: Representação esquemática (a) e fotografia (b) do microdestilador.



Para o procedimento de determinação de ureia em leite, a reação enzimática foi realizada em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL com fundo cônico.

Para ambos os métodos propostos, as medidas fotométricas foram realizadas diretamente dos tubos tipo Eppendorf utilizando um smartphone iPhone XR, com câmera de 12 megapixels (4608 × 2592 pixels), abertura de lente f/1.8 e sistema IOS 15. O aplicativo PhotoMetrix® (versão 1.8, 2021), de acesso livre, foi utilizado para converter as imagens adquiridas em sinais analíticos, no sistema de cor RGB. Uma caixa de isopor (8 cm de altura, 21,5 cm de largura e 13 cm de profundidade), internamente recoberta com papel sulfite branco (75 g/m³), foi adaptada para inserir os tubos. Uma lâmpada à base de LED (30 LEDs, 40 lux) foi posicionada na parte inferior da caixa, com o objetivo de manter a iluminação controlada e constante. Um suporte de celular foi fixado a 11,5 cm do objeto de medição e as medidas fotométricas foram realizadas no centro do tubo tipo Eppendorf, com uma área de medida (ROI, do inglês *region of interest*) de 32 x 32 pixels. Todas as imagens foram obtidas com o flash da câmera e o zoom desativados.

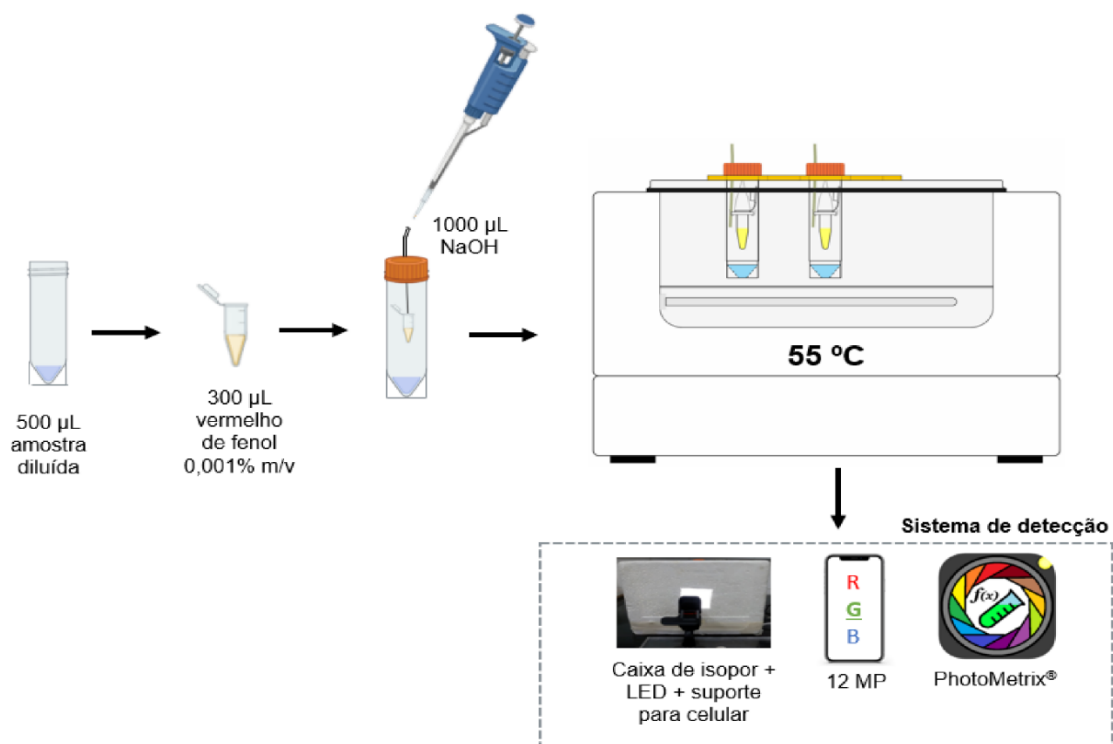
Os espectros de absorção foram adquiridos utilizando um espectrofotômetro multicanal UV-Vis (Ocean Optics®, EUA) e uma cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Determinação de proteína em alimentos

Os digeridos Kjeldahl foram preparados conforme descrito na seção 3.4.1 e o volume final foi completado para 100 mL com água. Os digeridos foram diluídos com água deionizada, antes da microdestilação, sendo 1:100 v/v para leite integral e 1:150 v/v para as amostras vegetais (feijão e lentilha). Aliquotas de 500 μ L das soluções diluídas foram transferidas para tubos tipo Falcon de 50 mL com um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo 300 μ L da solução indicadora de vermelho de fenol 0,001% m/v, suspenso em seu interior. Após o fechamento do tubo tipo Falcon, 1000 μ L de solução de NaOH 10% m/v foi inserido através do tubo de polietileno e a microdestilação foi realizada aquecendo o conjunto em banho-maria a 55°C. Após 40 min, as medidas fotométricas foram realizadas nas condições descritas na seção 3.2, diretamente nos tubos tipo Eppendorf. Os valores do branco foram medidos de forma análoga, usando 500 μ L de uma solução ácida em vez da amostra digerida. Todas as medições fotométricas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). O procedimento proposto é ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Representação infográfica do procedimento proposto para a determinação de proteína em alimentos.

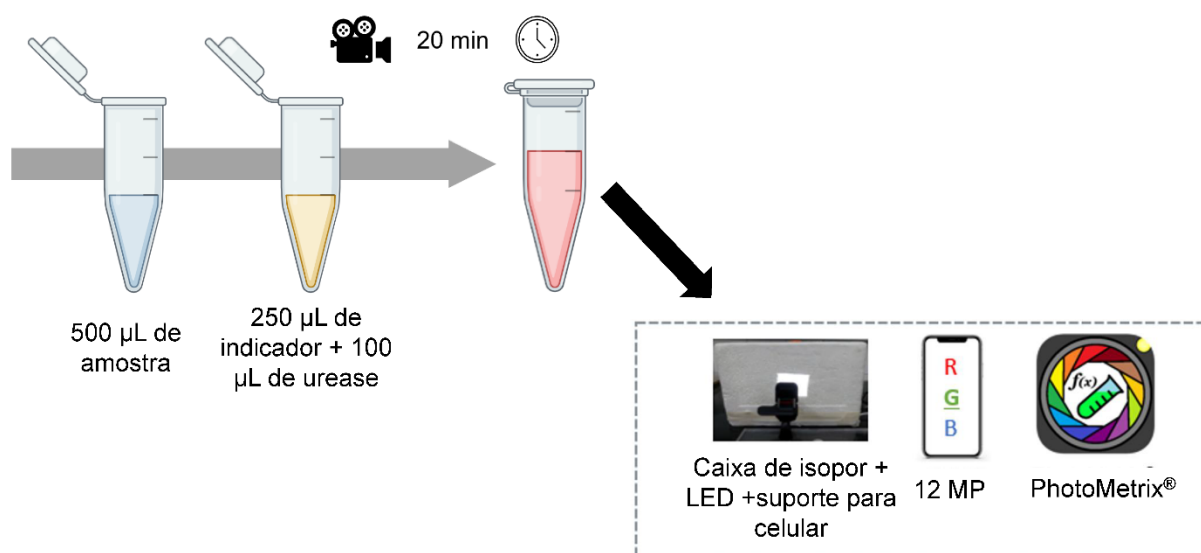


As medições foram realizadas a partir da intensidade da radiação refletida pela solução do indicador, e convertidas no sistema de cores RGB. Para se obter respostas analíticas proporcionais à intensidade da cor, os valores de G foram subtraídos de 255, sinal de referência correspondente à reflexão máxima da radiação neste sistema de cores.

3.3.2 Determinação de ureia em leite

Em cada tubo tipo Eppendorf, contendo 500 μL de amostra de leite diluído 1:10 v/v, foram adicionados 250 μL de indicador vermelho de fenol 0,01% m/v e 100 μL de solução de urease 0,5 g L^{-1} . As medidas foram realizadas após 20 min (tempo necessário para garantir a completa hidrólise enzimática da ureia), usando a câmera do smartphone, conforme descrito anteriormente. A cor do indicador ácido-base foi monitorada a partir da intensidade da radiação refletida medida sob condições controladas (Figura 5). A calibração pelo método das adições de padrão foi adotada para contornar efeitos de matriz.

Figura 5: Representação infográfica do método analítico proposto para a determinação de ureia em leite.



As medidas fotométricas (canal G) foram baseadas no consumo da forma ácida do vermelho de fenol. Para obter respostas analíticas proporcionais à intensidade da cor, os valores de G foram subtraídos do valor do branco (FERNANDES et al., 2020b), medidos de forma análoga, usando 500 µL de água e 250 µL da solução de vermelho de fenol. Todas as medições fotométricas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Para otimizar as condições de reação, vídeos foram gravados e as informações analíticas foram extraídas usando o software ImageJ® a partir de “frames” obtidos a cada 60 s.

Para a calibração pelo método de adição de padrão (SAM), realizado em triplicata, soluções preparadas a partir de 1840 µL de amostras de leite diluído 1:10 v/v foram adicionadas de 40, 80, 120 ou 160 µL da solução padrão de ureia 100 mg L⁻¹ completando o volume para 2,0 mL com água deionizada, para obtenção de amostras adicionadas de 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ de ureia.

3.4 Procedimentos de referência

3.4.1 Determinação de proteína em alimentos – Micro-Kjeldahl

Para a avaliação da exatidão, as amostras foram analisadas pelo método de referência de micro-Kjeldahl (BRASIL, 2013).

As amostras de feijão e lentilha foram previamente moídas em moinho criogênico (Modelo Spex 6800, EUA), com 5 min de pré-congelamento e 5 ciclos de moagem de 2 min, com 1 min de congelamento entre os ciclos. Posteriormente, 0,18-0,20 g das amostras moídas ou ca. 2 g de leite integral foram pesados diretamente nos frascos de Kjeldahl. Em cada tubo, foram adicionados 7 mL de H₂SO₄ 96% m/v e 2,5 g da mistura catalítica (K₂SO₄ 30% + CuSO₄.5H₂O 70%), e os tubos aquecidos gradualmente a 120°C (20 min), 250°C (20 min) e 350°C (20 min). A temperatura foi então mantida a 350°C até a obtenção de um digerido incolor (cerca de 2,5 h). Após a digestão, cada tubo foi acoplado ao destilador (Tecnal® TE-036/1, Brasil) e 20 mL de NaOH 50% m/v foram adicionados para converter os íons amônio em NH₃ volátil, posteriormente coletada em um Erlenmeyer contendo 20 mL de H₃BO₃ 4,0% m/v e cinco gotas da solução indicadora ácido-base composta pela mistura de vermelho de metila e verde de bromocresol. A destilação foi realizada até obtenção de ca. 75 mL.

A solução destilada foi então titulada com uma solução padronizada de ácido sulfúrico (0,05 mol L⁻¹). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

A porcentagem de proteína foi calculada conforme a Eq. 7 (BRASIL, 2013).

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \times N \times 0,014 \times 100}{m} \quad (7)$$

Em que:

V = volume (mL) da solução de ácido sulfúrico 0,1000 N gasto na titulação, após a correção do branco;

N = normalidade da solução de ácido sulfúrico 0,1000 N;

0,014 = fator de equivalência entre a concentração de ácido sulfúrico 0,1000 N e nitrogênio

m = massa de amostra, em gramas.

O teor de proteína foi obtido multiplicando o valor do teor de nitrogênio total (Eq. 8) obtido por um fator de conversão (F = 6,38, para leite e 6,25, para feijão e lentilha).

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ nitrogênio total} \times F \quad (8)$$

3.4.2 Procedimento de referência - MIR

O procedimento de referência para avaliação da exatidão foi baseado na espectroscopia de infravermelho médio (MIR, CombiFoss FT+®) de acordo com as diretrizes (9622:2013)/IDF 141:2013 (ISO:9622, 2013). As análises foram realizadas em um laboratório de referência certificado pelo CBQL (Clínica do Leite – Piracicaba/SP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de proteína em alimentos explorando microdestilação e fotometria por imagens digitais

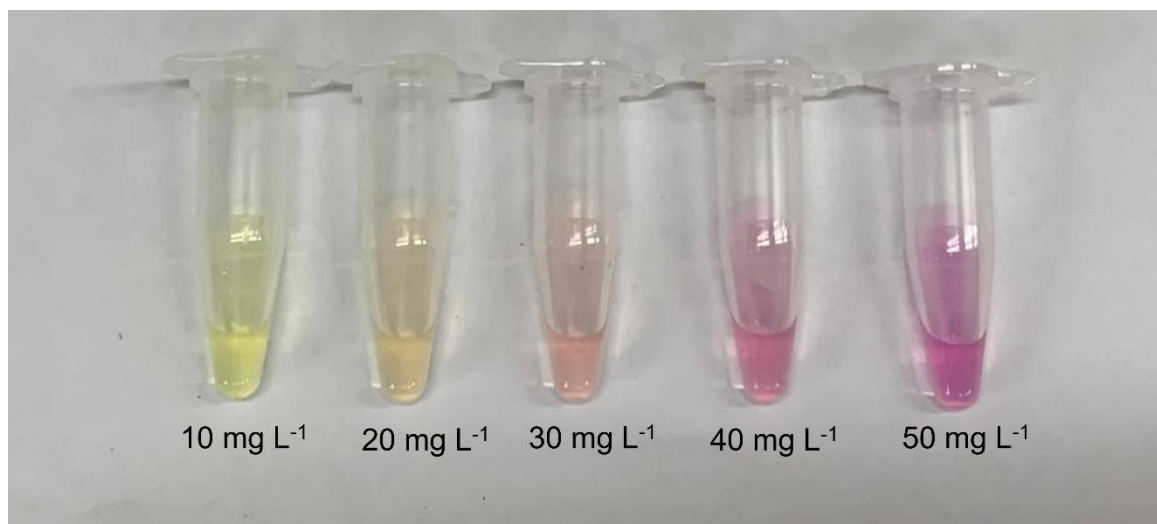
4.1.1 Aspectos gerais

O procedimento para a determinação de proteína foi baseado na geração de amônio, proporcionalmente à quantidade de proteína (Eq. 1), através da digestão ácida pelo método de Kjeldahl. Após a alcalinização do digerido, a amônia foi destilada (Eq. 2) sob aquecimento controlado em banho-maria e absorvida em solução de um indicador ácido-base (HIn, Eq. 3). A microdestilação foi realizada em um microdestilador simples e de baixo custo, construído no próprio laboratório, semelhantemente ao explorado para determinação de metanol em biodiesel (SOARES; ROCHA, 2019). Entretanto, nesta aplicação, tem-se uma espécie significativamente mais volátil, a amônia (ponto de ebulição = $-33,4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ao invés do metanol (ponto de ebulição = $64,7^{\circ}\text{C}$), gerada a partir de uma reação química. Deste modo, as modificações no aparato constituíram na perfuração da tampa do tubo tipo Falcon para a inserção de um tubo de polietileno de 0,7 mm a fim de otimizar a introdução da solução de hidróxido de sódio e evitar perdas de amônia, constituindo, assim, um sistema fechado. Após a introdução do tubo, o furo foi vedado com cola quente.

A escolha do indicador ácido-base foi realizada de acordo com o pKa do íon amônio = 9,25. Foram avaliadas soluções de fenolftaleína 1,0%, 0,1% e 0,01% m/v (faixa de transição de pH 8,2–9,8, incolor-rosa) e vermelho de fenol 0,1%, 0,01% e 0,001% m/v (transição de amarelo para vermelho na faixa de pH 6,8–8,4, com cores intermediárias laranja e rosa). Nos experimentos preliminares utilizando a fenolftaleína, em todas as concentrações, não foi possível observar alterações de cor, o que indica que a quantidade de amônia absorvida não foi suficiente para que a solução absorvedora atingisse o pH de viragem. Por exemplo, para que pH = 8,5 fosse atingido, a concentração de amônia em solução deve ser de $3,72 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$. Resultados satisfatórios, no entanto, foram obtidos quando foi utilizado o indicador vermelho de fenol 0,001% m/v. Nessa condição, a intensidade da cor da solução

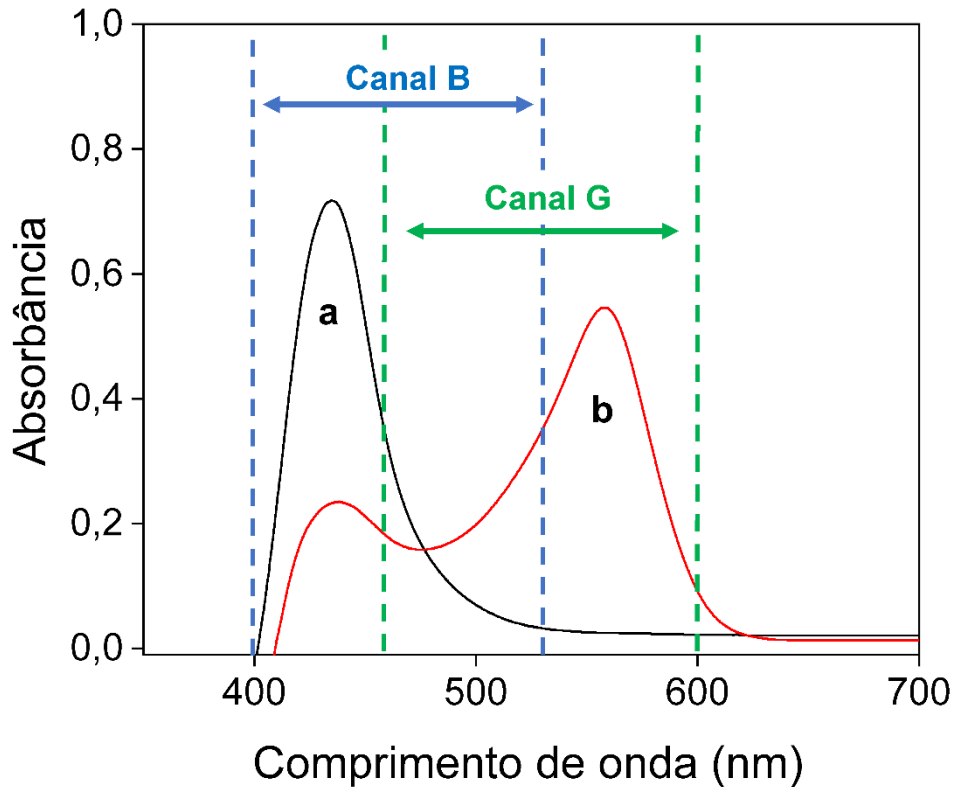
absorvedora foi proporcional à concentração de amônio na amostra, como mostra a Figura 6.

Figura 6: Fotografia das soluções após a microdestilação e absorção do analito pela solução de vermelho de fenol. Condições experimentais: 500 μL da solução de amônio 10 a 50 mg L^{-1} + 1000 μL NaOH 50% m/v e solução absorvedora: 500 μL do indicador vermelho de fenol 0,001% m/v; Tempo de microdestilação: 30 min; Temperatura: 55°C.



Para avaliar o canal do sistema RGB mais apropriado para a medida fotométrica, foram obtidos espectros de absorção do indicador vermelho de fenol em diferentes pH. Como mostram os espectros na Figura 7 o canal B refere-se ao indicador na forma ácida (amarelo), que é consumida com a absorção de amônia na solução, ou seja, espera-se que os valores de B aumentem proporcionalmente à concentração de amônio, pois se referem à intensidade da radiação refletida. Por outro lado, o canal G refere-se ao indicador na forma básica (rosa), gerada com a absorção da amônia. Espera-se, portanto, que neste canal a resposta fotométrica seja inversamente proporcional à concentração de amônio na solução. O canal G foi escolhido para as medições fotométricas pois corresponde a cerca de 75% da resposta analítica total no sistema RGB, o que deve resultar em maior sensibilidade analítica em comparação com as medições no canal B. Além disso, uma correlação mais linear com a concentração de amônio foi observada no canal G ($r_G = 0,98$ versus $r_B = 0,95$). A combinação vetorial das respostas nos canais G e B ($[(255-G)^2 + (255-B)^2]^{1/2}$) não resultou em melhora significativa da sensibilidade.

Figura 7: Espectros de absorção de uma solução de vermelho de fenol 0,001% m/v ($pK_a = 7,81$) em (a) pH = 5,0 e (b) pH = 7,0. As faixas espectrais cobertas pelos canais B e G do sistema RGB também são indicadas.



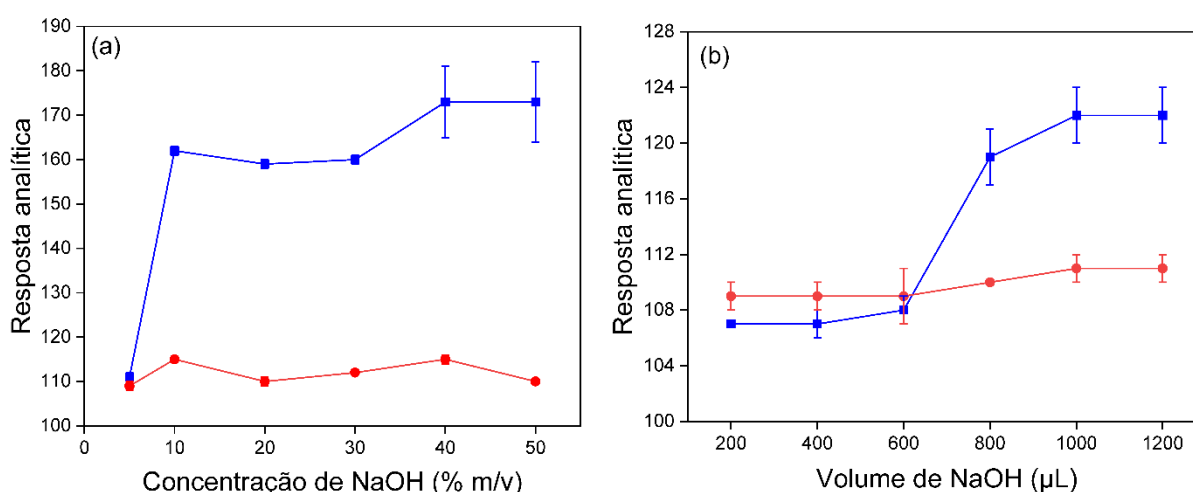
4.1.2 Otimização do procedimento analítico

O procedimento foi otimizado pelo método univariado, com o objetivo de maximizar a resposta analítica e reduzir o consumo de reagentes e a geração de resíduos. Foram avaliados os efeitos da concentração e volume de hidróxido de sódio 10% m/v, dos volumes da solução indicadora vermelho de fenol 0,001% m/v e da amostra, da temperatura e do tempo de reação. Baseado nos experimentos preliminares, a condição inicial foi definida como: 500 μL de solução de amônio + 1000 μL de solução de hidróxido de sódio 10% m/v; Solução absorvedora: 500 μL de indicador vermelho de fenol 0,001% m/v; e microdestilação por 30 min a 55 $^{\circ}\text{C}$. Uma solução de amônio 20 mg L^{-1} preparada em 1,7 mol L^{-1} H_2SO_4 (para simular a acidez do digerido) foi usada como solução de referência e os valores do branco foram medidos em cada condição experimental com a solução ácida sem adição de amônio.

Os efeitos da concentração e volume de NaOH foram avaliados com a finalidade de assegurar o excesso de NaOH, assim garantindo a formação de amônia.

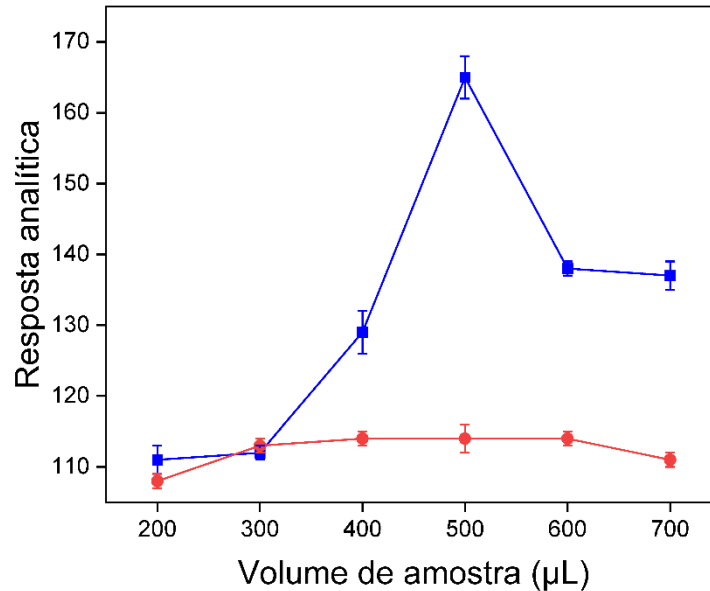
Esse excesso foi alcançado a partir de NaOH 10% m/v, que produziu a melhor resposta analítica (Figura 8a). Visando reduzir o consumo de NaOH, o efeito do volume de solução 10% m/v foi avaliado (Figura 8b). Volumes de hidróxido de sódio inferiores a 600 μL não foram suficientes para a neutralização do meio, resultando em respostas analíticas próximas ao branco. A maior resposta analítica foi obtida com 1000 μL de NaOH, que assegura um excesso de 47% de NaOH em relação ao teor de ácido nos digeridos. O volume de 1000 μL de NaOH foi então definido para os experimentos posteriores.

Figura 8: Efeito da concentração, $V = 1000 \mu\text{L}$ (a) e do volume, $C = 10\% \text{ m/v}$ (b) de NaOH sobre a resposta analítica (■) para $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ e (●) branco. Condições experimentais: 500 μL da solução de amônio, 500 μL do indicador vermelho de fenol 0,001% m/v, 1000 μL NaOH 50% m/v; temperatura: 55 $^\circ\text{C}$; tempo: 30 min. Os resultados referem-se a valores médios e desvios ($n=3$).



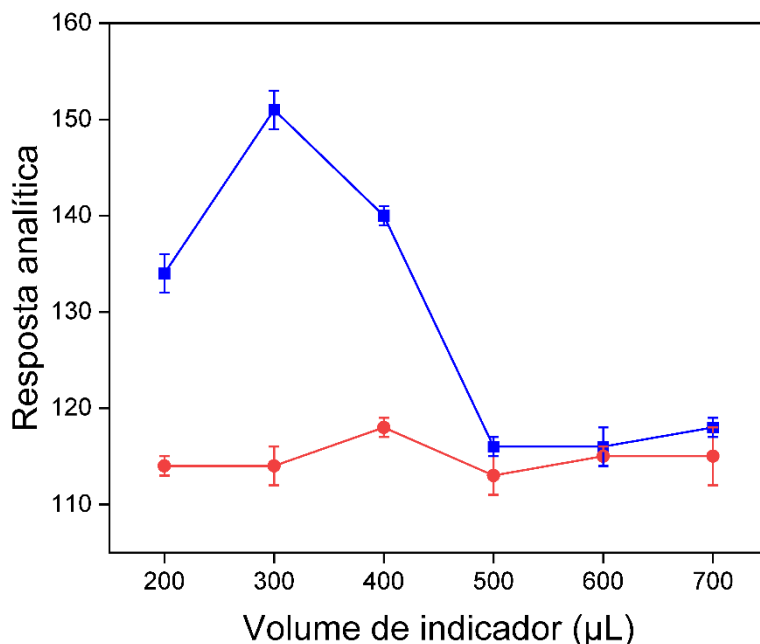
O efeito do volume de amostra (solução de amônio em H_2SO_4 $1,7 \text{ mol L}^{-1}$) foi avaliado visando aumentar a sensibilidade, o que foi observado até 500 μL (Figura 9). Para volumes maiores, a resposta analítica foi prejudicada pela falta de NaOH (23% e 5% de excesso para os volumes de amostra de 600 e 700 μL , respectivamente). Considerando que a resposta analítica é suficiente para a aplicação proposta e visando minimizar o consumo de NaOH, o volume de amostra de 500 μL foi definido para os experimentos posteriores.

Figura 9: Efeito do volume da amostra sobre o sinal analítico (■ 20 mg L⁻¹ NH₄⁺) e (●) branco. Condições experimentais: 500 µL do indicador vermelho de fenol 0,001% m/v, 1000 µL NaOH 10% m/v; temperatura: 55 °C; tempo: 30 min. Os resultados referem-se a valores médios e desvios (n=3).



O efeito da concentração de vermelho de fenol foi avaliado em 0,1, 0,01 e 0,001% m/v, visando definir uma condição adequada para observar a mudança de cor. Com concentrações superiores a 0,01% m/v, houve saturação do sinal analítico, o que impossibilitou as medidas fotométricas. Resultados satisfatórios foram obtidos com 0,001% m/v do indicador e, diante disso, foi avaliado o efeito do volume da solução. Este parâmetro afeta a absorção de amônia, que depende da exposição da solução à fase gasosa. Por outro lado, como a quantidade de amônia volatilizada é constante, volumes maiores que 300 µL tendem a diminuir a resposta analítica devido à diluição do produto de medida. Esses aspectos explicam os resultados observados na Figura 10, em que a maior resposta analítica foi observada em 300 µL.

Figura 10: Efeito do volume do indicador sobre o sinal analítico (■ 20 mg L⁻¹ NH₄⁺) e (●) branco. Condições experimentais: 500 µL da solução de amônio, 1000 µL NaOH 10% m/v; temperatura: 55 °C; tempo: 30 min. Os resultados referem-se a valores médios e desvios (n=3).



Embora a amônia seja um composto altamente volátil, também é bastante solúvel em meio aquoso. Assim, aquecimento foi explorado para acelerar sua evaporação, favorecendo a absorção pela solução de vermelho de fenol. Ambos os efeitos, da temperatura e do tempo de aquecimento, foram avaliados inserindo o microdestilador em banho-maria, sob temperatura controlada. O aquecimento a 55°C foi estabelecido como a melhor condição (Figura 11), pois temperaturas mais altas favoreciam a volatilização da água juntamente com o analito, o que ocasionou a formação de gotículas de condensado nas paredes do tubo tipo Falcon (Figura 12). Essas gotículas podem absorver a amônia gasosa, diminuindo assim o sinal analítico. A avaliação do efeito do tempo na microdestilação (Figura 13) mostrou que a condição de estado estacionário foi observada após 40 min.

Figura 11: Efeito da temperatura sobre o sinal analítico (■ 20 mg L⁻¹ NH₄⁺ e ●) branco. Condições experimentais: 500 µL da solução de amônio, 300 µL do indicador vermelho de fenol 0,001% m/v, 1000 µL NaOH 10% m/v; tempo: 30 min. Os resultados referem-se a valores médios e desvios (n=3).

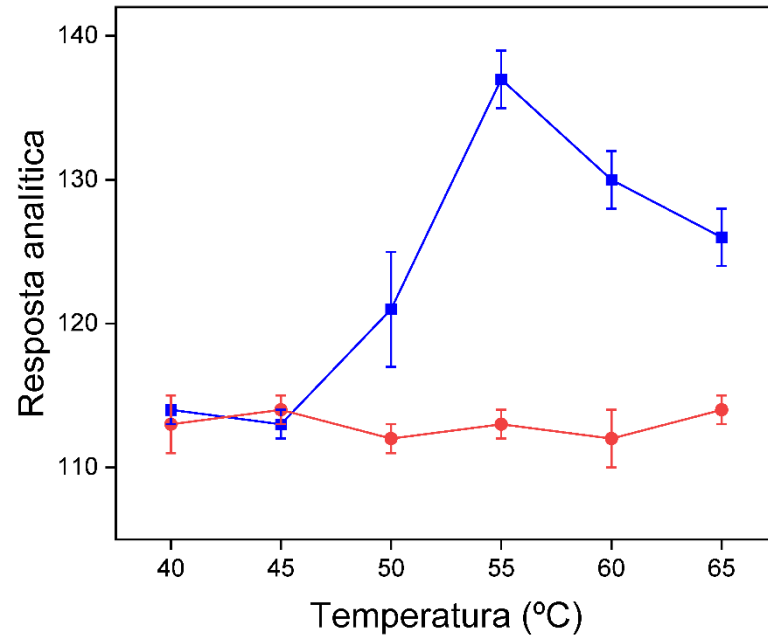


Figura 12: Ilustração da formação de gotículas de condensado nas paredes do tubo tipo Falcon.

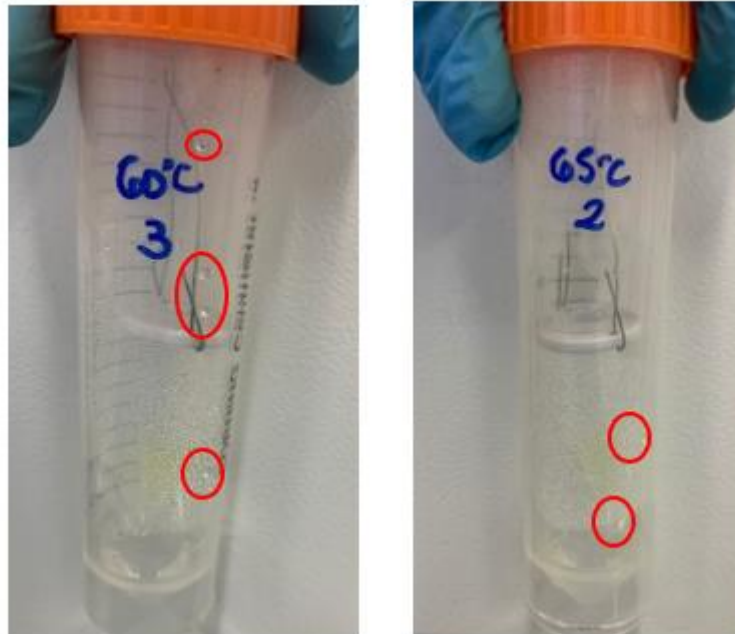
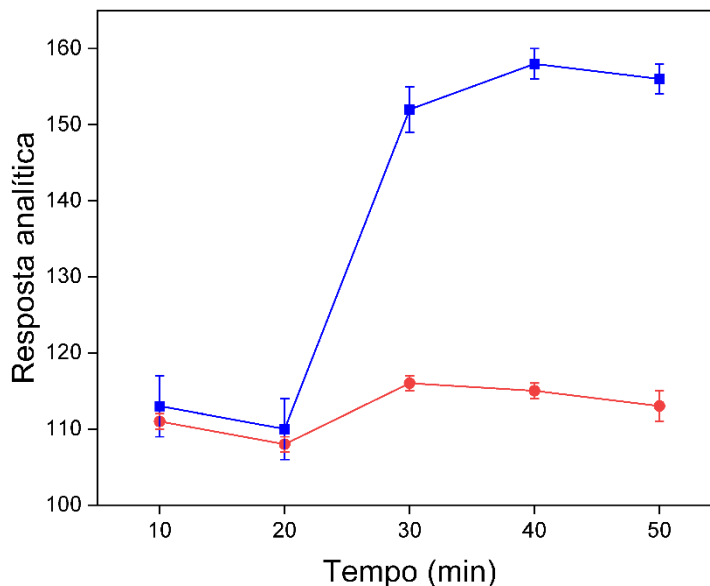


Figura 13: Efeito do tempo sobre o sinal analítico (■ 20 mg L⁻¹ NH₄⁺) e (●) branco. Condições experimentais: 500 µL da solução de amônio, 300 µL do indicador vermelho de fenol 0,001% m/v, 1000 µL NaOH 10% m/v; temperatura: 55 °C. Os resultados referem-se a valores médios e desvios (n=3).

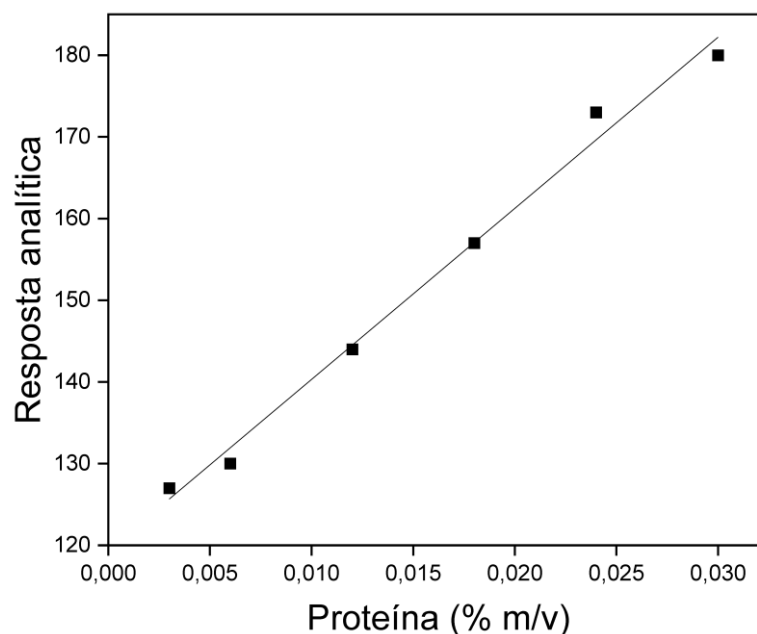


Após definir os melhores valores para as variáveis relevantes, a sensibilidade do procedimento aumentou 20% em relação à condição experimental inicial.

4.1.3 Características analíticas e aplicação

Nas condições otimizadas, o procedimento proposto possibilitou a determinação de proteína na faixa de 0,003-0,03% (5,0-50,0 mg L⁻¹ de amônio), com resposta linear descrita pela equação: $S = (2094 \pm 100) C + (119,4 \pm 1,8)$, $r = 0,996$, em que S corresponde aos valores do sinal analítico (255-G) e C é a concentração (mg L⁻¹) de proteína (Figura 14).

Figura 14: Curva de calibração obtida nas condições otimizadas. Condições experimentais: 500 μL da solução de amônio, 300 μL do indicador vermelho de fenol 0,001% m/v, 1000 μL NaOH 10% m/v; temperatura: 55°C; tempo: 30 min



O limite de detecção (LOD) de 3 mg L^{-1} de amônio foi determinado experimentalmente como a menor concentração de amônio adicionado que gera resposta analítica significativamente diferente do sinal de referência, a 95% de confiança. Esse resultado é próximo ao valor estimado pelos parâmetros de regressão da curva analítica (5 mg L^{-1}) (MILLER; MILLER, 2005) e corresponde a 2 mg kg^{-1} de proteína.

O coeficiente de variação foi estimado em 2,3% (20 mg L^{-1} de amônio, $n=10$). O procedimento requer apenas 3 μg de indicador vermelho de fenol, 100 mg de hidróxido de sódio e 500 μL de amostra digerida e gera apenas 1,8 mL de resíduo por determinação. A frequência analítica foi estimada em 12 ensaios h^{-1} pela microdestilação simultânea de oito amostras.

O procedimento foi aplicado a amostras de leite, feijão e lentilha. A exatidão foi avaliada comparando-se os resultados pelo procedimento proposto e de referência, baseado no método micro-Kjeldahl titulométrico (BRASIL, 2013), Tabelas 2, 3 e 4. Os valores médios concordaram (nível de confiança de 95%), conforme avaliado pelo teste t pareado (t calculado = 1,409, 0,671 e 2,004 para leite integral, feijão e lentilha, respectivamente, e t crítico = 2,365 (amostras de leite, $n = 8$) e 2,776 (amostras de

feijão e lentilha, n = 5). As variâncias de ambos os procedimentos foram comparadas pelo teste *F* e os valores calculados também foram concordantes a 95% de confiança.

Tabela 2: Teores de proteína no leite integral determinados pelos procedimentos proposto e de referência.

Proteína (%) ^a			
Amostra	Procedimento proposto	Procedimento de referência	F ^b
1	3,00 ± 0,06	3,02 ± 0,09	2,3
2	3,2 ± 0,01	3,09 ± 0,07	2,0
3	2,98 ± 0,04	3,31 ± 0,02	4,0
4	3,0 ± 0,1	3,02 ± 0,09	1,2
5	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1,0
6	3,1 ± 0,2	3,05 ± 0,06	11,1
7	3,07 ± 0,09	3,09 ± 0,04	5,1
8	3,1 ± 0,2	3,0 ± 0,1	4,0

^aMédia ± desvio padrão, n = 3.

^bF crítico= 19

Tabela 3: Teores de proteína em feijões determinados pelos procedimentos proposto e de referência.

Proteína (%) ^a			
Amostra	Procedimento proposto	Procedimento de referência	F ^b
1	18,7 ± 0,9	19,4 ± 0,3	9,0
2	18,0 ± 0,8	18,1 ± 0,2	16,0
3	21 ± 1	21,1 ± 0,3	11,1
4	21,1 ± 0,8	19,8 ± 0,2	16,0
5	21,5 ± 0,6	20,7 ± 0,2	9,0

^aMédia ± desvio padrão, n = 3.

^bF crítico= 19

Tabela 4: Teores de proteína em lentilhas determinados pelos procedimentos proposto e de referência.

Amostra	Proteína (%) ^a		F ^b
	Procedimento proposto	Procedimento de referência	
1	22,1 ± 0,7	23,3 ± 0,5	2,0
2	24 ± 1	25 ± 1	1,0
3	23 ± 1	24,3 ± 0,7	2,0
4	25 ± 1	25,1 ± 0,7	2,0
5	25,3 ± 0,4	26,6 ± 0,6	2,3

^aMédia ± desvio padrão, n = 3.

^bF crítico= 19

O procedimento proposto requer somente um microdestilador construído no próprio laboratório, consome baixas quantidades de reagentes e minimiza a geração de resíduos, atendendo aos requisitos da química analítica verde.

As principais características analíticas do procedimento proposto para a determinação de proteína em alimentos foram comparadas com outros procedimentos analíticos reportados na literatura (Tabela 5). O procedimento proposto possui faixa de resposta linear comparável ou melhor do que as citadas na Tabela 5 (DIDPINRUM et al., 2021; LAPORTE; PAQUIN, 1999; LÜTHI-PENG; PUHAN, 1999; SILVA; ROCHA, 2020), além de gerar menores volumes de resíduos por determinação (1,8 mL). Outros procedimentos colorimétricos (BRADFORD, 1976; LOWRY et al., 1951) geram até 40 vezes mais resíduos que o procedimento proposto, envolvendo também reagentes mais caros e tóxicos (DIDPINRUM et al., 2021).

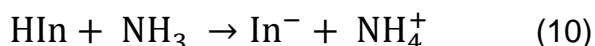
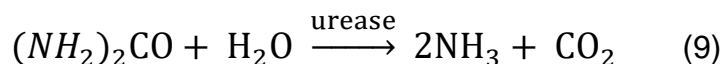
Tabela 5: Características analíticas de procedimentos para a determinação de proteína em alimentos.

Procedimento	Amostra	Massa da amostra (mg)	LOD (g kg ⁻¹)	Faixa linear (g kg ⁻¹)	Volume de resíduos por determinação (mL)	Referência
Digestão Kjeldahl em menor escala	Leite em pó	10-80	0,009	0,03-0,36	31	(DIDPINRUM et al., 2021)
NIR-PLS	Leite	-	5	17-38	-	(LAPORTE; PAQUIN, 1999)
NIR-PLS	Feijão	-	0,06	0,21-0,33	-	(PLANS et al., 2013)
Fotometria por imagens digitais	Leite	5000	0,3	3,4-34	7800	(SILVA; ROCHA, 2020)
Espectrofotometria UV-visível	Leite (búfala e vaca)	20	0,03	0,1-1,2	5	(LÜTHI-PENG; PUHAN, 1999)
Microdestilação/imagens digitais	Leite/grãos	180	0,02	0,03-0,30	1,8	Esse trabalho

4.2 Determinação de ureia em leite com base no monitoramento da hidrólise enzimática por imagens digitais e vídeos

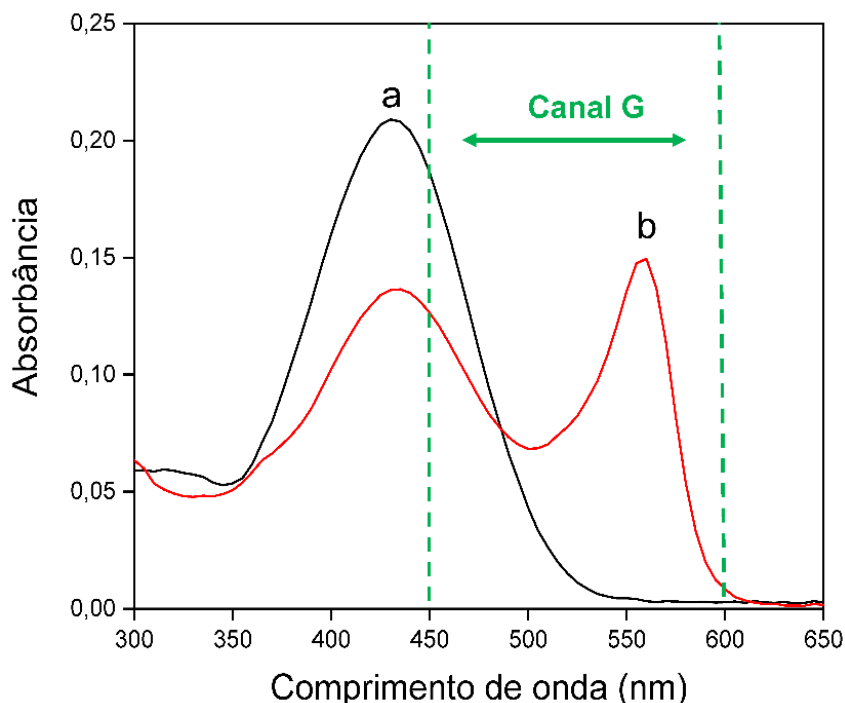
4.2.1 Aspectos gerais

O procedimento proposto é baseado na hidrólise da ureia sob catálise da enzima urease, conforme descrito na Eq. 9. A reação produz amônia e o aumento de pH é monitorado pela mudança de cor do indicador ácido-base (vermelho de fenol) (Eq. 10). As condições experimentais foram definidas para garantir que a reação seja limitada pela concentração de ureia, visando a sua determinação a partir de mudanças de cor da solução indicadora através de fotometria por imagens digitais (valores RGB).



Para avaliar o canal do sistema RGB adequado para as medidas fotométricas, foram obtidos espectros de absorção UV-vis do indicador ácido-base antes e após a reação enzimática utilizando um espectrofotômetro (Agilent®, Cary 60 UV-vis). No procedimento desenvolvido para a determinação de proteína em alimentos, foi demonstrado que o indicador vermelho de fenol foi o mais adequado para monitorar o aumento da concentração de amônia, com transição de cor de amarelo para rosa na faixa de pH entre 6,8 e 8,4. O máximo de absorção da forma básica do indicador vermelho de fenol é 550 nm, que se sobrepõe majoritariamente à faixa espectral coberta pelo canal G do sistema RGB (Figura 15).

Figura 15: Espectros de absorção de solução de vermelho de fenol 0,001% m/v com 500 μL de ureia 8,0 mg L^{-1} e 100 μL de urease 0,5 g L^{-1} , em (a) tempo inicial e (b) após 20 min de reação. A faixa espectral coberta pelo canal G do sistema RGB também é indicada.



Devido à complementaridade com a cor do produto medido, cerca de 75% da variação total do sinal (soma das respostas nos canais R, G e B) está relacionada ao canal G. Como a concentração da forma básica do indicador aumenta com a amônia gerada, os valores de G foram corrigidos em relação ao branco ($G_{\text{branco}} - G_{\text{amostra}}$) para fornecer uma resposta analítica proporcional à quantidade de ureia hidrolisada.

4.2.2 Avaliação de urease extraída de fonte vegetal

Extratos vegetais como fonte de urease vem sendo amplamente utilizados como uma alternativa de substituição de enzimas comerciais, as quais possuem elevado custo (LAI et al., 2023). Extratos brutos de urease podem ser obtidos de sementes de cucurbitáceas (e.g. melancia, melão e abóbora), sendo o processo realizado em três etapas: trituração, adição do solvente e filtração. Diferentes tipos de solventes já foram utilizados para a obtenção do extrato vegetal bruto, sendo eles, água destilada, solução de etanol 30%, tampão fosfato ou EDTA (PRAKASH; UPADHYAY, 2003).

Um extrato bruto, obtido a partir de sementes de melancia (*Citrullus vulgaris*), foi comparado com a solução de urease comercial para avaliar a catálise da hidrólise da ureia por meio da aquisição de vídeos digitais. A obtenção de urease a partir de sementes de melancia foi realizada seguindo o procedimento a seguir: (I) trituração das sementes (ca. 30g) em liquidificador com 100 mL de água destilada. (II) centrifugação do extrato obtido por 10 min a 5000 rpm para minimizar a turbidez e (III) filtração do sobrenadante em duas etapas (3,0 μm e 0,45 μm) para retenção de partículas e obtenção de uma solução clara e límpida (Figura 16).

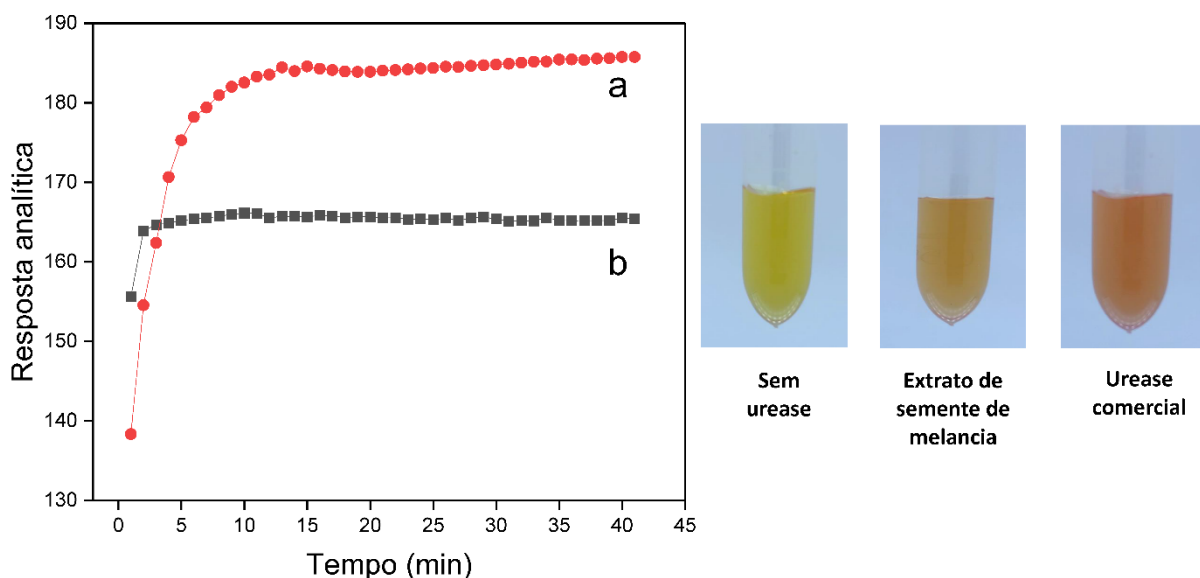
Figura 16: Aspecto visual do extrato obtido a partir de sementes de melancia após procedimento de extração.



Após a extração, amostras de leite diluídas 1:10 v/v foram adicionadas de 15 mg L⁻¹ de ureia e 100 μL do extrato e submetidas ao procedimento proposto (item 3.3.2). Para comparar a atividade da urease comercial com a extraída de fontes vegetais, vídeos digitais foram adquiridos e o tempo para atingir o estado estacionário foi observado (LIM; LEVERENZ, 2019). Os resultados obtidos com os vídeos indicaram que, com o uso do extrato bruto o sinal analítico foi 12% menor que o obtido com a enzima comercial devido à menor atividade enzimática (Figura 17). Volumes maiores de extrato bruto (200 e 300 μL) não alteraram significativamente o sinal

analítico (variações de sinal menores que 2%), devido à maior diluição da amostra. Portanto, a partir deste experimento, conclui-se que o uso do extrato bruto é viável, mas, para fins analíticos, optou-se pelo uso de urease comercial que resultou em melhor resposta analítica.

Figura 17: Variação da resposta analítica durante a hidrólise enzimática utilizando urease comercial (a) e extrato de sementes de melancia (b). Condições experimentais: 500 μL de ureia 8,0 mg L^{-1} , 250 μL de indicador vermelho de fenol 0,01 % m/v e 100 μL de solução enzimática.



4.2.3 Otimização do procedimento analítico

As condições experimentais foram definidas pelo método de otimização univariado visando o aumento da resposta analítica e minimização do consumo de reagentes e da geração de resíduos. Como as variáveis experimentais podem afetar a taxa de hidrólise enzimática, o efeito do volume de urease, concentração de vermelho de fenol e tempo de reação foram avaliados a partir de vídeos digitais. Em cada condição experimental, o sinal analítico foi calculado subtraindo-se os valores G obtidos imediatamente após a adição da urease daqueles medidos após atingir o estado estacionário. As condições iniciais para otimização foram: 500 μL de solução referência de ureia 8,0 mg L^{-1} , 250 μL de indicador vermelho de fenol 0,01% m/v e 50 μL de urease 500 mg L^{-1} .

O efeito da concentração de vermelho de fenol na resposta analítica é mostrado na Figura 18A. A resposta analítica aumentou gradualmente (de 17 para 36) quando a concentração do indicador aumentou de 0,001% m/v para 0,01% m/v, sendo 0,01% m/v usado como a melhor condição experimental devido à maior diferença do branco. Concentrações superiores a 0,01% m/v causaram saturação do sinal analítico, ou seja, valores de G próximos a zero, indicando absorção total da radiação incidente. O leite possui pH tipicamente entre 6,6-6,8 e, nesta situação, a quantidade de indicador na forma básica (ca. 10%, $pK_a = 7,81$) foi suficiente para a saturação do sinal. Com base nesses aspectos, uma concentração de vermelho de fenol de 0,01% m/v foi selecionada para experimentos posteriores.

Para garantir a completa hidrólise da ureia utilizando uma menor quantidade de urease otimizou-se essa variável para evitar desperdícios, visto que é o reagente com maior custo no procedimento proposto. Como pode ser visto na Figura 18B, respostas analíticas semelhantes foram obtidas com 75 μ L e 100 μ L de urease. Porém, para garantir um leve excesso de urease, foi selecionado o volume de 100 μ L. Também na Fig. 18B, pode-se notar que o sinal analítico tem pouca variação a partir de 10 min de reação, indicando que a hidrólise enzimática está próxima de se completar. No entanto, visando minimizar erros nas medidas fotométricas e obter maior precisão, estabeleceu-se um tempo de reação de 20 min.

O leite normalmente apresenta pH entre 6,6 e 6,8, com capacidade tamponante majoritariamente relacionada à caseína e ao fosfato de cálcio coloidal, cujos teores podem variar com a raça do animal, estágio de lactação e estado de saúde (SALAUN; MIETTONB; GAUCHERON, 2005). A capacidade tampão da amostra diluída foi demonstrada por uma titulação ácido-base, em que um $\Delta pH = 0,8$ foi observado com a adição de 280 μ L de uma solução de NaOH 50 mmol L⁻¹ em comparação com um $\Delta pH = 4,3$ com adição de 40 μ L do titulante no padrão de ureia. Esse efeito tampão é evidenciado na Figura 19A, em que uma amostra de leite diluído 1:10 v/v apresentou pH maior que o padrão de ureia na mesma concentração (pH 6,98 e 5,60), aumentando a quantidade da forma dissociada do indicador e fornecendo uma resposta analítica inicial mais alta. Esses efeitos foram evidenciados quando a hidrólise enzimática foi monitorada por meio de vídeos digitais, com diferenças entre o leite e o padrão com a mesma concentração de ureia (Figura 19A) e entre diferentes amostras de leite (Figura 19B). Isso indica que a hidrólise enzimática é afetada pela matriz da amostra, caracterizando um efeito de matriz no procedimento analítico. A

calibração pelo método de adição padrão (SAM) foi então proposta para contornar os efeitos de matriz. Como todas as soluções de calibração foram preparadas no meio da amostra, o desenvolvimento da reação e as mudanças de cor do vermelho de fenol foram monitorados nas condições tamponadas inerentes a cada amostra.

Figura 18: Otimização univariada do procedimento analítico. Efeitos de (A) concentração de vermelho de fenol (tempo de reação de 20 min) e (B) volume de urease na resposta analítica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com 500 μL de solução de ureia 8,0 mg L^{-1} e 250 μL de indicador vermelho de fenol.

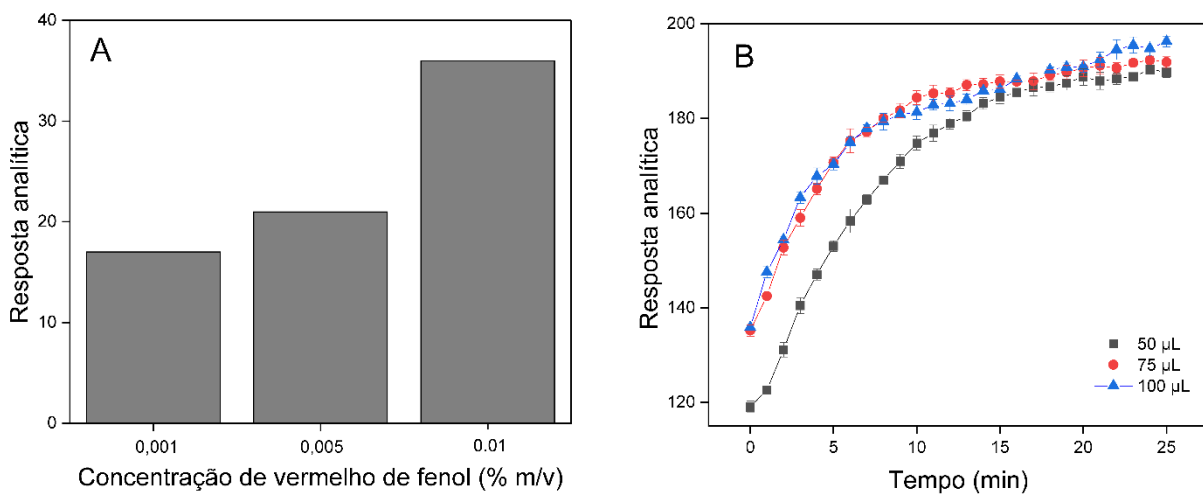
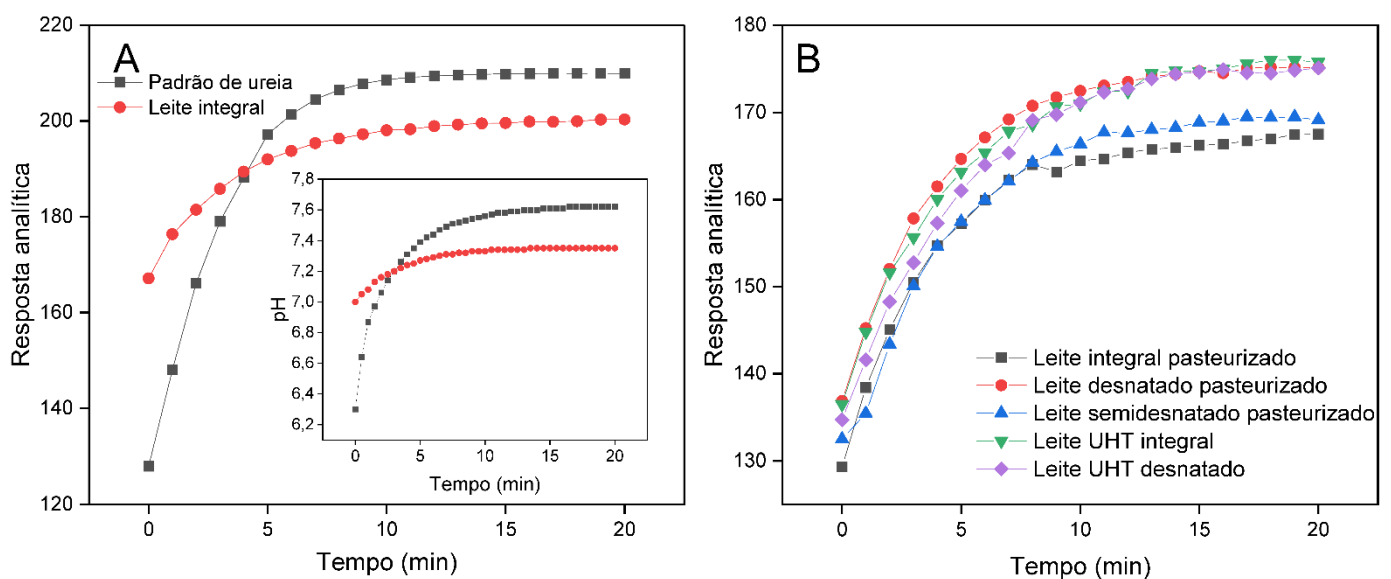


Figura 19: Avaliação do perfil cinético da reação de hidrólise da ureia em diferentes tipos de leite. Todas as soluções foram adicionadas de 8,0 mg L^{-1} ureia.



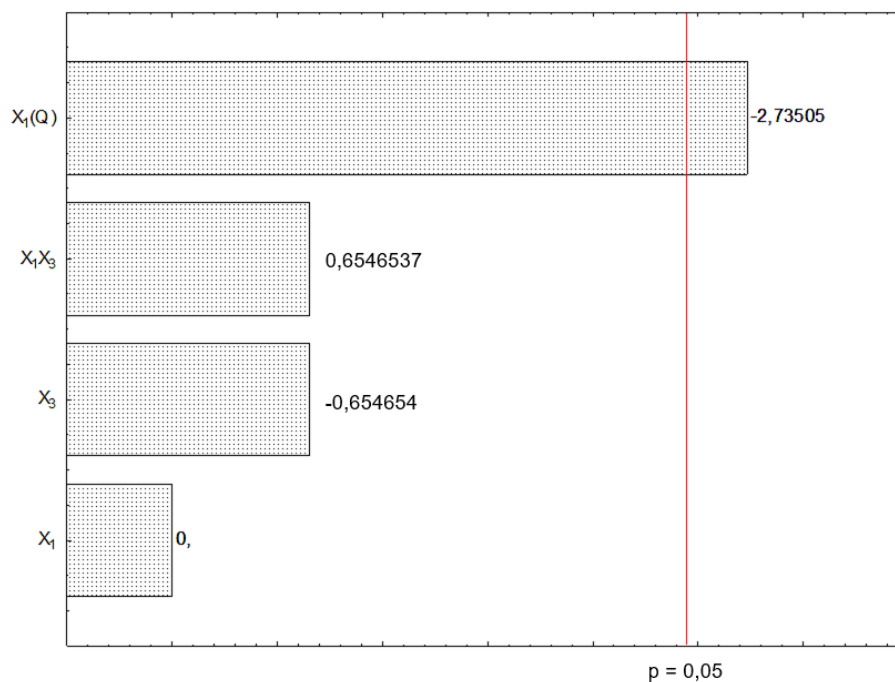
4.2.4 Avaliação de robustez

Para avaliar a robustez do procedimento desenvolvido, foi aplicado um planejamento fatorial completo $2^3 + CP$, utilizando como variáveis os volumes de urease (X_1) e amostra (X_2) e o tempo de reação (X_3). Os níveis das variáveis foram definidos variando as condições ótimas (500 μL de amostra, 100 μL de urease e 20 min de reação) em $\pm 10\%$ (Tabela 6). Através da análise de variância (ANOVA), o efeito do volume de urease demonstrou ser significativo a 95% de confiança, conforme gráfico de Pareto (Figura 20), indicando que esta variável afeta a resposta analítica tendo, assim, que ser cuidadosamente controlada. O efeito das demais variáveis não foi significativo, indicando a robustez do procedimento.

Tabela 6: Planejamento fatorial 2^3 para a avaliação da robustez do procedimento proposto. Volumes das variáveis em μL .

Experimento	Variáveis			Sinal analítico ^a
	Urease (X_1)	Amostra (X_2)	Tempo (X_3)	
1	90 (-1)	450 (-1)	18 (-1)	149
2	110 (1)	450 (-1)	18 (-1)	149
3	90 (-1)	550 (1)	18 (-1)	150
4	110 (1)	550 (1)	18 (-1)	149
5	90 (-1)	450 (-1)	22 (1)	150
6	110 (1)	450 (-1)	22 (1)	148
7	90 (-1)	550 (1)	22 (1)	147
8	110 (1)	550 (1)	22 (1)	150
9 – 11 [CP]	100 (0)	500 (0)	20 (0)	152

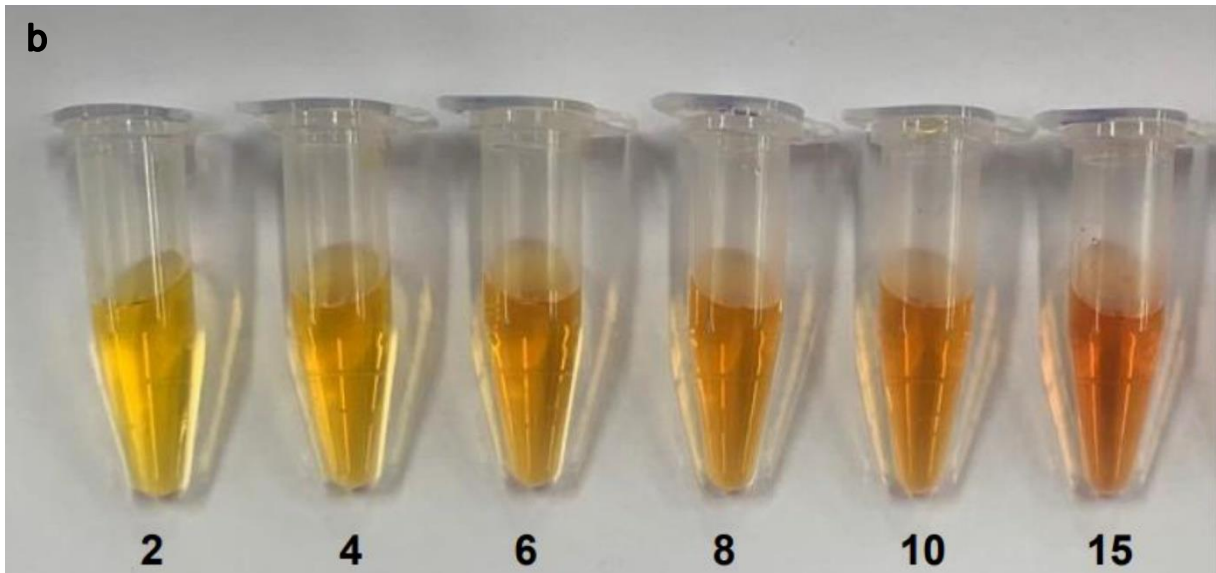
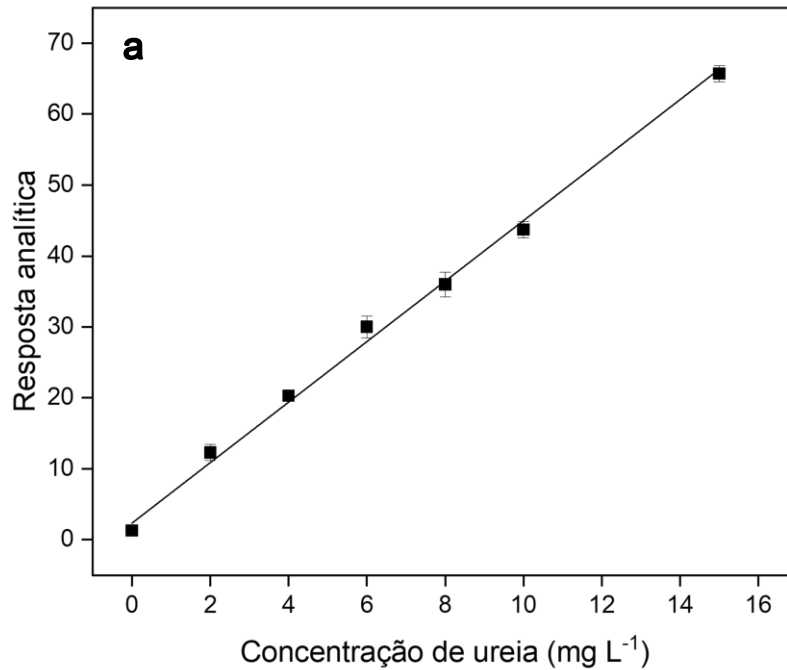
a. (Gbranco – Gamostra), valores médios de medidas em triplicatas.
 Concentração de ureia: 8 mg L⁻¹
 CP: Pontos centrais

Figura 20: Gráfico de Pareto com os efeitos das principais variáveis do procedimento proposto.

4.2.5 Características analíticas e aplicação

Utilizando as condições otimizadas, o procedimento proposto apresentou faixa de resposta linear de 2,0 – 15,0 mg L⁻¹ de ureia, conforme descrito pela equação: $S = (4,1 \pm 0,1)C + (0,8 \pm 0,8)$, $r = 0,998$, em que S corresponde ao sinal analítico (Gbranco – Gamostra) e C à concentração de ureia, em mg L⁻¹ (Figura 21). A linearidade da curva de calibração foi confirmada pelo teste *lack-of-fit* (RAPOSO, 2016), com nível de confiança de 95%, resultando em $F_{cal} = 2,59$ ($F_{tab} = 3,26$).

Figura 21: Curva de calibração obtida nas condições otimizadas (a) e imagens dos tubos contendo diferentes concentrações de ureia (números em negrito indicam as concentrações em mg L^{-1}) após 20 min de reação enzimática (b). Condições experimentais: 500 μL solução de referência, 250 μL indicador vermelho de fenol 0,01% m/v e 100 μL de urease 0,5 g L^{-1} .



O LOD de 0,5 mg L^{-1} foi estimado experimentalmente como a menor concentração de ureia capaz de produzir uma resposta analítica significativamente diferente do branco ao nível de 95% de confiança. Este valor concordou com o

estimado utilizando os parâmetros de regressão linear ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) (MILLER; MILLER, 2005). O coeficiente de variação ($n = 10$) foi estimado em 1,6%, e a reprodutibilidade (precisão entre dias) foi de 4,5%, avaliada a partir das inclinações das curvas analíticas obtidas em quatro dias diferentes, utilizando as mesmas soluções padrão de ureia e urease. O procedimento proposto apresentou uma frequência analítica de 20 ensaios h^{-1} .

Curvas analíticas obtidas na ausência e na presença da amostra de leite integral diluído 1:10 v/v apresentaram diferentes inclinações (2,7 e 4,1 para o padrão de ureia e amostra de leite, respectivamente) (Figura 22). Deste modo, o método de adição de padrão foi explorado com o intuito de corrigir o efeito de matriz. Recuperações, estimadas em duas concentrações ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$) indicam que a calibração por adição de padrão foi eficiente (Tabela 7).

Figura 22: Comparação entre as curvas analíticas obtidas na ausência e presença de amostra de leite integral (diluição 1:10 v/v).

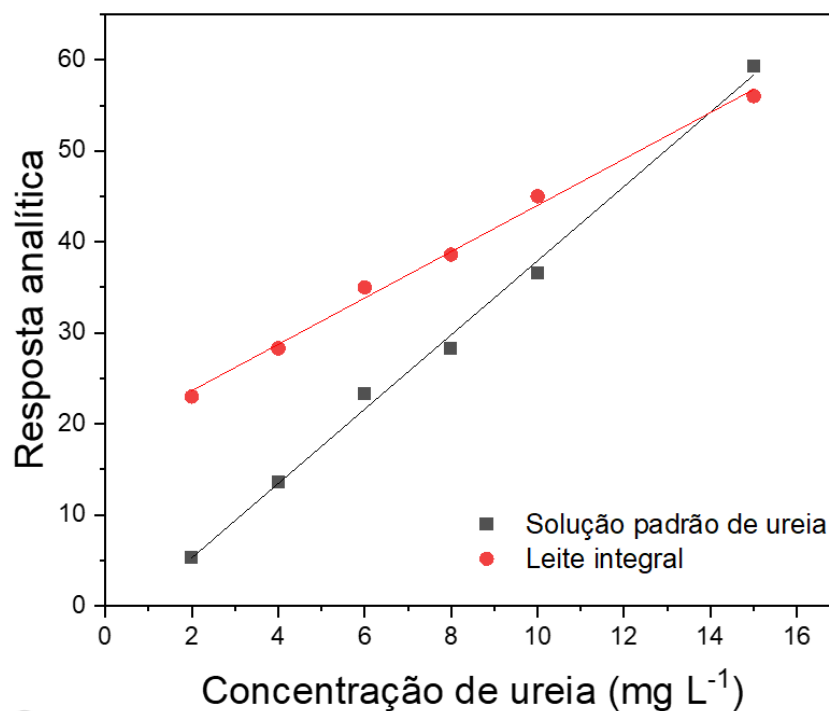


Tabela 7: Recuperações para amostras de leite adicionadas de 2,0 mg L⁻¹ e 6,0 mg L⁻¹ de ureia.

Amostra	Ureia adicionada (mg L ⁻¹)			
	(2,0 mg·L ⁻¹)	Rec (%)	(6,0 mg·L ⁻¹)	Rec (%)
I1	2,1	103 ± 1	6,5	108 ± 1
I2	2,0	100 ± 2	6,3	105 ± 1
SD1	2,0	101 ± 3	5,8	97 ± 2
SD2	2,0	102 ± 1	6,4	106 ± 3
D1	1,96	98 ± 4	5,7	95 ± 2
D2	2,2	110 ± 2	6,7	112 ± 4

I = leite integral, SD = leite semidesnatado D = leite desnatado

Para a avaliação da exatidão, amostras comerciais de leite UHT e pasteurizado (n = 13) foram analisadas pelo procedimento proposto e de referência (MIR) (ISO:9622, 2013). A partir dos dados da Tabela 8, avaliou-se que as diferenças nos resultados obtidos são baixas e que os resultados são concordantes ao nível de confiança de 95%, avaliados por um teste t pareado (t calculado = 0,614 e t crítico = 1,796). Esses resultados demonstram a eficácia do método das adições de padrão para contornar efeitos de matriz. As variâncias foram comparadas pelo teste F e os valores calculados foram concordantes a 95% de confiança, considerando uma precisão típica de 1,0% para o procedimento de referência MIR (ISO:9622, 2013). Todas as amostras analisadas estavam dentro do limite permitido para ureia endógena no leite (0,14 – 0,50 g L⁻¹), de acordo com a legislação brasileira.

Tabela 8: Determinação de ureia em amostras de leite pelos métodos proposto e de referência (ISO:9622, 2013). Valores médios e incertezas estimados a partir de medições triplicadas.

Amostra	Ureia (mg L ⁻¹)			
	Procedimento proposto	Procedimento de referência ¹	Er (%)	Valor F ²
I1	215 ± 1	217 ± 2	-0,9	4,8
I2	225,1 ± 0,9	238 ± 2	-5,4	7,0
I3	195 ± 1	203 ± 2	-3,9	2,4
I4	222 ± 1	194 ± 2	+14,4	4,0
I5	197 ± 1	245 ± 2	-19,6	6,0
I6	170 ± 1	166 ± 2	+2,4	2,8
I7	160,7 ± 0,7	168 ± 2	-4,3	5,8
SD1	172 ± 1	202 ± 2	-14,8	2,8
SD2	230,4 ± 0,8	248 ± 2	-7,1	9,8
SD3	180 ± 1	210 ± 2	-14,3	4,0
D1	155 ± 1	145 ± 1	+6,9	1,5
D2	123 ± 1	126,0 ± 1,2	-2,4	1,7
D3	168 ± 2	164,0 ± 2	+2,4	1,6

I = leite integral, SD = leite semidesnatado D = leite desnatado

1. Coeficiente de variação de 1,0% (FOSS ANALYTICS, 2019).

2. Valor F tabelado (nível de confiança de 95%): 19,0. Valores estimados sem arredondamento dos desvios padrão.

O procedimento proposto está em conformidade com as diretrizes da química analítica verde, consumindo apenas 30 µg de vermelho de fenol, 50 µg de urease e 500 µL de amostra, gerando apenas 850 µL de resíduo por determinação.

Para comparação do desempenho analítico alcançado, as características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de ureia em leite estão listadas na Tabela 9 (HONORATO SANTOS NETO et al., 2022; KHAN et al., 2015; MISHRA; MISHRA; BHAND, 2010; SUAREZ et al., 2010, 2018; TOLEDO et al., 2017; XIE; YU; GONG, 2019). O procedimento proposto é mais simples, utiliza instrumentação acessível e não requer estratégias laboriosas de preparo de amostra,

enquanto os procedimentos descritos anteriormente requerem reações de derivatização (HONORATO SANTOS NETO et al., 2022; TOLEDO et al., 2017), preparo de amostras complexo (HONORATO SANTOS NETO et al., 2022; MISHRA; MISHRA; BHAND, 2010; SUAREZ et al., 2010, 2018; XIE; YU; GONG, 2019), ou são menos ambientalmente amigáveis (XIE; YU; GONG, 2019). O LOD e a precisão do procedimento proposto são comparáveis ou melhores que os obtidos em outras abordagens, com a vantagem de consumir menos reagentes. Considerando apenas os reagentes, o custo foi estimado em US\$ 1,1 por determinação.

A sensibilidade é uma vantagem quando comparada aos métodos analíticos descritos anteriormente para a determinação de ureia no leite (HONORATO SANTOS NETO et al., 2022; KHAN et al., 2015; SUAREZ et al., 2010, 2018; TOLEDO et al., 2017). Além disso, o uso de um smartphone como dispositivo de detecção oferece portabilidade e acessibilidade, tornando o procedimento adequado para análises *in situ* e rápida obtenção dos resultados analíticos.

Tabela 9: Características analíticas de procedimentos para a determinação de ureia em leite.

Procedimento	Faixa linear (mg L⁻¹)	LOD (mg L⁻¹)	CV (%)	Reagentes/ Preparo de amostra	Referência
Espectroscopia de reflectância difusa	25-750	7,5	-	p-dimetilaminobenzaldeído	(TOLEDO et al., 2017)
NIR	100-10000	30,3	1,4	-	(KHAN et al., 2015)
Fotômetro LED	60-1800	10,8	0,7	Ácido acético, salicilato e hipoclorito de sódio	(SUAREZ et al., 2018)
Imagem digital	0,8-8,8	0,4	2,5	Diacetilmonoxima	(HONORATO SANTOS NETO et al., 2022)
Cromatografia gasosa	0,3-685	0,3	2,9	Cloreto de sódio	(XIE; YU; GONG, 2019)
Biossensor - análise de injeção de fluxo	6-12000	6,0	2,5	Tampão fosfato	(MISHRA; MISHRA; BHAND, 2010)
Sistema em fluxo com detecção fotométrica	6-300	0,5	0,4	Salicilato e hipoclorito de sódio	(SUAREZ et al., 2010)
Este trabalho	2,0-15,0	0,5	1,6	Água deionizada (diluição)	-

5 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PROPOSTOS PELO *GREEN ANALYTICAL PROCEDURE INDEX (GAPI)*

Recentemente, é crescente a demanda por métodos analíticos que atendam às exigências ambientais e de saúde. A química analítica verde (GAC, do inglês *Green analytical chemistry*) tem como principais objetivos a redução do consumo de energia, solventes, reagentes, minimização de resíduos e utilização de matérias-primas renováveis (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Diante da elevada motivação por procedimentos que sejam ambientalmente amigáveis, ferramentas para avaliação do “caráter verde” dos métodos analíticos foram desenvolvidas, tais como *National Environmental Methods Index (NEMI)* (GUARDIA; ARMENTA, 2011; KEITH; GRON; YOUNG, 2007), *Analytical Eco-Scale* (GAŁUSZKA et al., 2012) e, mais recentemente, o *Green Analytical Procedure Index (GAPI)* (PŁOTKA-WASYLKA, 2018).

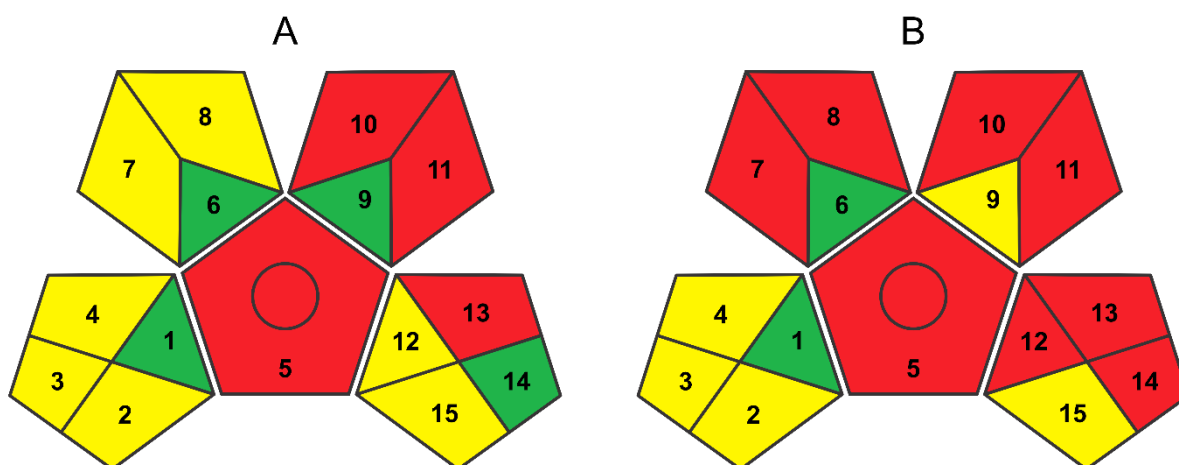
A ferramenta semiquantitativa GAPI avalia cada etapa do procedimento analítico (amostragem, transporte, armazenamento, preparação da amostra, reagentes, solventes, instrumentação e consumo de energia) através de uma escala de cores com três níveis de avaliação em um pictograma. As cores verde, amarelo e vermelho indicam baixo, médio e alto impacto ambiental, respectivamente (PŁOTKA-WASYLKA, 2018). Os cinco pentagramas são subdivididos em 15 categorias: (1) tipo de coleta da amostra; (2) preservação; (3) transporte; (4) armazenamento; (5) tipo do método proposto (indireto ou direto); (6) tipo de extração (nano-extração, microextração e macro-extração); (7) solventes e/ou reagentes utilizados; (8) tratamentos adicionais; (9) quantidade de solventes e/ou reagentes; (10) perigo para a saúde (pontuação de risco NFPA); (11) perigo à segurança do analista (pontuação de risco NFPA); (12) energia consumida; (13) risco ocupacional; (14) volume de resíduos e (15) tratamento de resíduos. A presença do círculo no pentágono central indica que o método é quantitativo.

Esta ferramenta foi aplicada para avaliação dos dois procedimentos desenvolvidos neste trabalho de mestrado e comparados com os procedimentos de referência.

A Figura 23 refere-se ao gráfico GAPI para o procedimento de determinação de proteína em alimentos no método proposto (A) e de referência (micro-Kjeldahl) (B). Quanto à avaliação da coleta da amostra, ambos os métodos possuem coleta *in-line*

e, portanto, uma avaliação verde foi atribuída. Por outro lado, os dois métodos requerem preservação física da amostra (refrigeração) e armazenamento em condições normais, atribuindo, portanto, a cor amarela. O campo 5, relacionado com o tipo de método, foi colorido de vermelho para os dois procedimentos, pois ambos requerem a etapa de digestão no preparo da amostra. Nos campos relacionados ao uso de solventes/reagentes tóxicos à saúde (10) e seu risco à segurança (11) também foram atribuídas cores vermelhas, devido ao uso de reagentes corrosivos e irritantes a pele. No entanto, vale ressaltar, que a utilização destes reagentes no método proposto foi em volumes significativamente inferiores ao método de referência, devido à aplicação da microdestilação como forma de substituição das etapas de digestão e titulação convencionais. Outro ponto importante é em relação à geração de resíduos (14) que possui volume bastante inferior no método proposto (1,8 mL) em comparação com o método de referência (>75 mL), atribuindo a cor verde ao procedimento proposto e vermelha ao de referência.

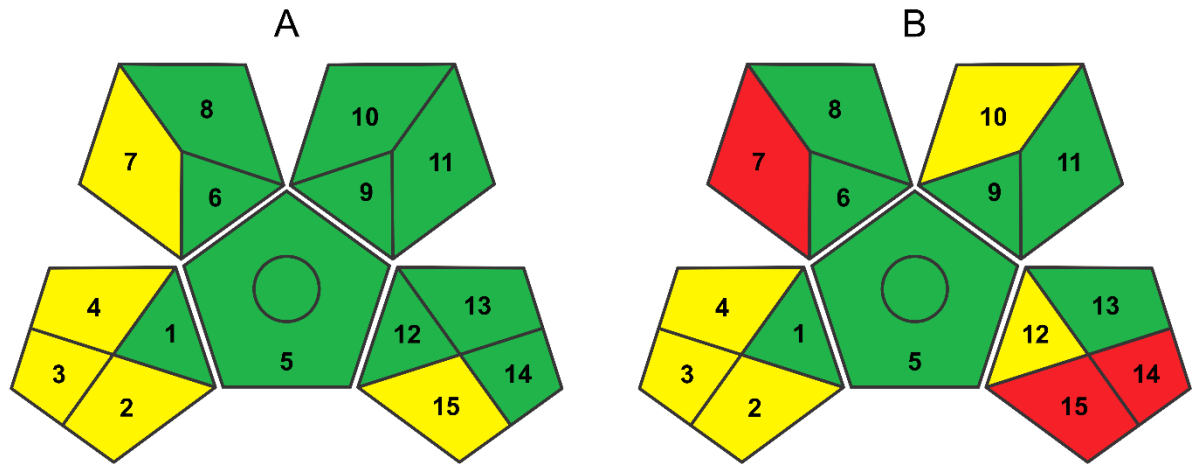
Figura 23: Avaliação do “caráter verde” de (A) procedimento proposto e (B) procedimento micro-Kjeldahl através da ferramenta GAPI (PŁOTKA-WASYLKA, 2018). As cores verde, amarelo e vermelho indicam impactos ambientais baixos, moderados e altos.



No procedimento para determinação de ureia, o gráfico GAPI demonstra mais espaços verdes em todas as etapas quando comparado com o procedimento de referência MIR (Figura 24). Os principais aspectos estão associados à preparação da amostra (6,8), reagentes e solventes (9,10,11), tipo de método (5) e instrumentação (13). Esses aspectos reforçam o baixo volume de amostra e reagentes gastos, a ausência de preparo de amostras e baixo consumo de energia. Por outro lado, o

procedimento MIR gera grandes volumes de resíduos (> 10 mL), sendo avaliado, neste aspecto, como alto impacto ambiental (cor vermelha).

Figura 24: Avaliação do “caráter verde” de (A) procedimento proposto e (B) procedimento MIR de referência através da ferramenta GAPI (PŁOTKA-WASYLKA, 2018). As cores verde, amarelo e vermelho indicam impactos ambientais baixos, moderados e altos.



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho de mestrado foram desenvolvidos dois métodos analíticos colorimétricos de baixo custo baseados na aquisição de imagens digitais e vídeos para determinar proteína em alimentos e adulteração por adição de ureia em leite.

No primeiro procedimento, o sistema de microdestilação construído e as medidas analíticas baseadas em fotometria por imagens digitais agregaram vantagens como baixo custo, instrumentação acessível, adequação para análises de rotina e menor impacto ambiental quando comparado com o método de referência, devido ao menor volume de reagentes utilizados e resíduos gerados. As abordagens convencionais para controle de qualidade de alimentos requerem instrumentação de alto custo, maior tempo de análise e exigem preparo de amostra complexo. O procedimento desenvolvido melhora a seletividade pela separação eficiente do analito e evita a necessidade de derivatização química (muitas vezes envolvendo produtos químicos tóxicos e de alto custo) para a determinação de proteínas em diferentes tipos de alimentos. Resultados concordantes com o método de referência e características analíticas adequadas, como linearidade, limite de detecção e precisão, indicam que o procedimento proposto é uma alternativa confiável para a determinação de proteína em alimentos, em conformidade com as normas vigentes.

O método analítico proposto para a determinação de ureia em leite é uma abordagem rápida, prática e ambientalmente amigável, capaz de quantificar a ureia em níveis de concentração necessários para diferenciar quantidades endógenas (presentes naturalmente no leite) de adulterações. O método foi aplicado com eficiência em amostras de leite UHT e pasteurizado sem tratamentos complexos (necessária apenas a diluição da amostra) e resultados exatos foram obtidos pelo método de adição de padrão. Devido a essas características e ao desempenho analítico (linearidade, LOD, exatidão e precisão), o método proposto é uma alternativa viável aos métodos de referência, como os baseados em MIR, que requerem muitas amostras para construir os modelos de predição e utilização de equipamentos mais caros e tratamento quimiométrico de dados. Este trabalho também demonstrou a viabilidade de avaliar o desenvolvimento da reação por vídeos digitais obtidos com um smartphone, que foi utilizado para otimização do procedimento e detecção de efeitos de matriz que afetam a hidrólise enzimática.

Os procedimentos analíticos desenvolvidos neste trabalho visam contribuir para a área de análise de alimentos apresentando alternativas rápidas e mais acessíveis e com alta confiabilidade analítica, para a determinação de proteínas em alimentos e detecção de adulterações em leites por adição de ureia, auxiliando na garantia da segurança dos alimentos consumidos pela população.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, M. S. M. S. F. et al. A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 259–263, 2018.

ALBERTS, B. et al. Analyzing protein structure and function. In: ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. New York: Garland Science, 2002.

ALMEIDA, V. V. et al. Catalisando a hidrólise da uréia em urina. **Química Nova na Escola**, v. 28, p. 42–46, 2008.

ANDRADE, É. C. B. **Análise de alimentos: uma visão química da nutrição**. São Paulo: Varela, 2009.

AOAC INTERNATIONAL. Mid-infrared spectroscopic method 972.16 for fat, lactose, protein, and solids in milk. **Association of Official Analytical Chemists International**, v. 22201, p. 2000, 1990.

ARIZA-AVIDAD, M. et al. Inkjet-printed disposable metal complexing indicator-displacement assay for sulphide determination in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 872, p. 55–62, 2015.

AZAD, T.; AHMED, S. Common milk adulteration and their detection techniques. **International Journal of Food Contamination**, v. 3, p. 1–9, 2016.

BAUER, J.; GERSS, J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 215–220, 2011.

BÉLANGER, J. M. R.; JOCELYN PARÉ, J. R.; SIGOUIN, M. Chapter 2: High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 37–59, 1997.

BORRÀS, E. et al. Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 1–14, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Determinação de nitrogênio total em leite e derivados lácteos pelo método de micro-Kjedahl**. Brasília: MAPA, 2013.

BRATOV, A.; ABRAMOVA, N.; IPATOV, A. Recent trends in potentiometric sensor arrays: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, n. 2, p. 149–159, 2010.

BRUCE, M. L.; LEE, R. P.; STEPHENS, M. W. Concentration of water-soluble volatile organic compounds from aqueous samples by azeotropic microdistillation. **Environmental Science & Technology**, v. 26, p. 160–163, 1992.

CAMUFFO, D. Photometric Aspects of Visible Light and Colours. In: CAMUFFO, D. **Microclimate for Cultural Heritage**: measurement, risk assessment, conservation, restoration, and maintenance of indoor and outdoor monuments. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 2019, p. 273–299.

CAPITAN-VALLVEY, L. F. et al. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: a tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23–56, 2015.

CHAN, K. Y.; WASSERMAN, B. P. Rapid solid-phase determination of cereal protein using bicinchoninic acid. **Cereal chemistry**, v. 70, p. 27, 1993.

CHAUHAN, S. L.; MANDAL, K. D.; PAUL, B. R. Adulteration of milk: a review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 7, p. 55–57, 2019.

CHIACCHIERINI, E. et al. Milk soluble whey proteins: fast and precise determination with Dumas method. **Analytical Letters**, v. 36, p. 2473–2484, 2003.

CHIAL, H. J.; THOMPSON, H. B.; SPLITTGERBER, A. G. A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G. **Analytical Biochemistry**, v. 209, p. 258–266, 1993.

CHO, B.-H.; KOSEKI, S. Determination of banana quality indices during the ripening process at different temperatures using smartphone images and an artificial neural network. **Scientia Horticulturae**, v. 288, art. 110382, 2021.

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

CORREIA, D. P. A.; MAGALHÃES, J. M. C. S.; MACHADO, A. A. S. C. Array of potentiometric sensors for simultaneous analysis of urea and potassium. **Talanta**, v. 67, p. 773–782, 2005.

CRUZ-FERNÁNDEZ, M. et al. Smartphone determination of fat in cured meat products. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 8–14, 2017.

CZAUDERNA, M.; KOWALCZYK, J. Easy and accurate determination of urea in milk, blood plasma, urine and selected diets of mammals by high-performance liquid chromatography with photodiode. **Chemia Analityczna**, v. 54, p. 919, 2009.

DAMODARAN, S.; KIRK, L. P. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2018.

DIDPINRUM, P. et al. A newly designed sticker-plastic sheet platform and smartphone-based digital imaging for protein assay in food samples with downscaling Kjeldahl digestion. **RSC Advances**, v. 11, n. 58, p. 36494–36501, 2021.

EDOUARD, N. et al. L'urée du lait, un indicateur pour estimer les rejets azotés et piloter l'alimentation des vaches laitières. **Journées d'Animation Scientifique du Département Phase**, v. 1, p. 1-52, 2018.

FAGNANI, R. **Fraude por adição de ureia no leite: como suspeitar e analisar**. Piracicaba: MilkPoint, 2020.

FAVERDIN, P.; VÉRITÉ, R. Utilisation de la teneur en urée du lait comme indicateur de la nutrition protéique et des rejets azotés chez la vache laitière. **Renc. Rech. Ruminants**, v. 5, p. 209–212, 1998.

FERNANDES, D. D. S. et al. Quantification and identification of adulteration in the fat content of chicken hamburgers using digital images and chemometric tools. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 20–27, 2019.

FERNANDES, G. M. et al. Paper-based analytical device for colorimetric detection of Cu^{2+} in Brazilian sugarcane spirits by digital image treatment. **Microchemical Journal**, v. 159, n. July, art. 105463, 2020a.

FERNANDES, G. M. et al. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187–203, 2020b.

FOSS ANALYTICS. **MilkScan FT1**. São Paulo: FOSS, 2019. Disponível em: <www.fossanalytics.com>. Acesso em: 10 fev. 2023.

FOUNTOULAKIS, M.; JURANVILLE, J.-F.; MANNEBERG, M. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bichinchonic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 24, p. 265–274, 1992.

FRANCO, M. D. O. K. et al. A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone. **Food Chemistry**, v. 338, art. 127800, 2021.

GAŁUSZKA, A. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GONZÁLEZ, F. H.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. **Biblioteca Setorial da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, v. 44, n. 4, p. 72, 2001.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Processamento digital de imagem. **Pearson**, v. 10, p. 11–27, 2010.

GOREN, M. P.; LI, J. T. The Coomassie Brilliant Blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 386–388, 1986.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751–766, 1949.

GUARDIA, M.; ARMENTA, S. **Green Analytical Chemistry: theory and practice**.

Amsterdam: Elsevier, 2011. 244 p. (Comprehensive analytical chemistry, 57)

GUILLOU, H.; PELISSIER, J. P.; GRAPPIN, R. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. **Le Lait**, v. 66, p. 143–175, 1986.

HALVORSEN, I. J.; SKOGESTAD, S. Distillation theory. In: WILSON, I. D. (ed.) **Encyclopedia of Separation Science**. Cambridge: Academic Press, 2020. p. 1117–1134.

HERRERO-LATORRE, C. et al. Detection and quantification of adulterations in aged wine using RGB digital images combined with multivariate chemometric techniques. **Food Chemistry: X**, v. 3, art. 100046, 2019.

HONORATO SANTOS NETO, J. et al. A new and accessible instrumentation to determine urea in UHT milk using digital image analysis. **Food Chemistry**, v. 381, art. 132221, 2022.

HUNN, J. B.; GREER, I. E. Colorimetric and refractometer estimates of total plasma protein in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Journal of Fish Biology**, v. 36, p. 617–618, 1990.

ISO. **ISO 9622**: milk and liquid milk products: guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. 2 ed. Geneva, 2013. 14 p.

ISO. **ISO 22000**: food safety management systems - requirements for any organization in the food chain. 2 ed. Geneva, 2018. 37 p.

JENZANO, J. W. et al. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical Biochemistry**, v. 159, p. 370–376, 1986.

JUNG, S. et al. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 1169–1173, 2003.

JÚNIOR, J. C. A. **Determinação do teor de proteína em concentrado proteico de soro de leite por FT-MIR-ATR combinada com calibração multivariada**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

KAMIZAKE, N. K. K. et al. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 507–516, 2003.

KAMOWAGA, M. Y. et al. Determinação direta de nitrogênio amoniacal do solo utilizando sistema de injeção seqüencial com pervaporação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, v. 23, 2000. Poços de Caldas. Poços de Caldas: SBQ, 2020.

KARIMI, F. et al. An applicable method for extraction of whole seeds protein and its determination through Bradford's method. **Food and Chemical Toxicology**, v. 164, 2022.

KEITH, L. H.; GRON, L. U.; YOUNG, J. L. Green analytical methodologies. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2695–2708, 2007.

KELLER, R. P.; NEVILLE, M. C. Determination of total protein in human milk: comparison of methods. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 120–123, 1986.

KHAN, K. M. et al. Detection of Urea Adulteration in Milk Using Near-Infrared Raman Spectroscopy. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 93–102, 2015.

KIM, S. H. et al. Object oriented face detection using range and color information. In: Proceedings Third IEEE International Conference on Automatic Face and Gesture Recognition, 3., 1998, Nara, Japan. Nara, Japan: IEEE, 1998. p. 76–81.

KOYAMA, K. et al. Predicting sensory evaluation of spinach freshness using machine learning model and digital images. **PlosOne**, art. 0248769, 2021.

LAI, H. J. et al. Extraction of crude soybean urease using ethanol and its effect on soil cementation. **Soils and Foundations**, v. 63, n. 3, art. 101300, 2023.

LAKARD, B. et al. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 1641–1647, 2004.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35–61, 2009.

LAPORTE, M.; PAQUIN, P. Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.47, n. 7, p. 2600–2605, 1999.

LI, R. et al. Application study of RGB color extraction in water toxicity detection. **Bioelectrochemistry**, v. 149, art. 108270, 2023.

LIM, K.; LEVERENZ, H. Characterization of urease derived from *Citrullus lanatus* (watermelon) seeds to estimate total Kjeldahl nitrogen in human urine. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 5, p. 486–499, 2019.

LIMA, C. M. et al. Digital image-based tracing of geographic origin, winemaker, and grape type for red wine authentication. **Food Chemistry**, v. 312, p. 126060, 2020a.

LIMA, M. J. A. et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, 2020b.

LOPES, D. C.; SANTANA, M. C. A. **Determinação de proteína em alimentos para animais: métodos químicos e físicos**. Viçosa: UFV, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LÜTHI-PENG, Q.; PUHAN, Z. Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 393, n. 1–3, p. 227–234, 1999.

MAQUIEIRA, A. et al. Determination of total and free sulphur dioxide in wine with a continuous-flow microdistillation system. **Analytica Chimica Acta**, v. 283, n. 1, p. 401–407, 1993.

MARTINEZ-OLMOS, A. et al. Chemical Sensor array-based optical portable instrument for determination of pH. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 156, n. 2, p. 840–848, 2011.

MARTINS, L. C. et al. A greener and faster approach for determination of phenolic compounds by smartphone-based colorimetry. *Proceedings*. v. 70, n.1, art. 07655, 2021.

MCLEOD, S. Micro-distillation unit for use in continuous flow analyzers. Its construction and use in determination of ammonia and nitrate in soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 266, p. 107–112, 1992.

MELO, C. M. T. et al. Estudo da redução de reagentes na determinação de proteínas em alimentos-Método de Kjeldahl. **Innovative Science & Technology Journal**, v. 6, p. 35–39, 2020.

MELO, E. L. I.; SILVA, G. C.; SILVA, O. F. Food defense: do conceito às atuais exigências do mercado internacional. **Research, Society and Development**, v. 10, p. 17, 2021.

MENEZES, E. A. Determinação in situ de fósforo, nitrato e amônio em solo. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006. 102 p.

MIHALJEV, Z. et al. Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 2, p. 365-370, 2015.

MILLER, J.N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Harlow: Pearson Education, 2005.

MISHRA, G. K.; MISHRA, R. K.; BHAND, S. Flow injection analysis biosensor for urea analysis in adulterated milk using enzyme thermistor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1560–1564, 2010.

NAKATA, R. et al. Determination of ammonium ion in a flow-injection system with a gas-diffusion membrane. Selection of Optimal Conditions for the pH Indicator. **Analytica Chimica Acta**, v. 208, p. 81–90, 1988.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed: 2014.

NISHI, H. H.; KESTNER, J.; ELIN, R. J. Four methods for determining total protein compared by using purified protein fractions from human serum. **Clinical Chemistry**, v. 31, p. 95–98, 1985.

NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. **Food Chemistry**, v. 270, p. 25–31,

2019.

OLSON, B. J. S. C.; MARKWELL, J. Assays for determination of protein concentration. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 38, Appendix 3:3A, 2007.

ÖZBEK, O. et al. Potentiometric urea biosensors. **Clinica Chimica Acta**, v. 524, p. 154–163, 2022.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198–219, 2003.

PESSOA, K. D. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica baseada em imagens digitais de spot tests para determinação de etanol em cachaça. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, p. 0995–1010, 2017.

PLANS, M. et al. Characterization of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by infrared spectroscopy: Comparison of MIR, FT-NIR and dispersive NIR using portable and benchtop instruments. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1643–1651, 2013.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204–209, 2018.

POMS, R. E.; CAPELLETTI, C.; ANKLAM, E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 459–464, 2004.

PORTO, I. S. A. et al. Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 149, art. 104031, 2019.

PRAKASH, O.; UPADHYAY, L. S. B. Effect of thiols on the activity of urease from dehusked seeds of watermelon (*Citrullus vulgaris*). **Plant Science**, v. 164, p. 189–194, 2003.

RAMESH, R. et al. Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 786–792, 2015.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: a tutorial review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 167–185, 2016.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, p. 53–64, 1981.

REICHARDT, W.; ECKERT, W. The determination of protein content of milk, cheese, and meat with the use of the biuret reaction. **Die Nahrung**, v. 35, p. 731–738, 1991.

REILEA, C. G. et al. Qualitative and quantitative analysis based on digital images to determine the adulteration of ketchup samples with Sudan I dye. **Food Chemistry**, v. 328, art. 127101, 2020.

- REISSIG, G. N. **Fraudes em Alimentos: tipos e detecção**. Disciplina de Seminários em Alimentos. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2009.
- RIBADEAU-DUMAS, B.; GRAPPIN, R. Milk protein analysis. **Le Lait**, v. 69, p. 357–416, 1989.
- RIZVI, N. B. et al. Quantitative estimation of protein in sprouts of *Vigna radiate* (Mung Beans), *Lens culinaris* (Lentils), and *Cicer arietinum* (Chickpeas) by Kjeldahl and lowry methods. **Molecules**, v. 27, p. 814, 2022.
- SÁEZ-PLAZA, P. et al. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 178–223, 2013.
- SAHA, D.; MANICKAVASAGAN, A. Machine learning techniques for analysis of hyperspectral images to determine quality of food products: a review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 28–44, 2021.
- SALAUN, F.; MIETTONB, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 95–109, 2005.
- SANTOS, P. M. DOS; PEREIRA-FILHO, E. R. Digital image analysis - an alternative tool for monitoring milk authenticity. **Analytical Methods**, v. 15, n. 3, p. 112–114, 2013.
- SASAKI, M. K. et al. A new strategy for membraneless gas-liquid separation in flow analysis: Determination of dissolved inorganic carbon in natural waters. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 1218–1223, 2019.
- SAVORY, J.; PU, P. H.; SUNDERMAN JR, F. W. A biuret method for determination of protein in normal urine. **Clinical Chemistry**, v. 14, p. 1160–1171, 1968.
- SERRANO, S.; RINCÓN, F.; GARCÍA-OLMO, J. Cereal protein analysis via Dumas method: Standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 31–36, 2013.
- SHARIATI-RAD, M.; IRANDOUST, M.; MOHAMMADI, S. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Multivariate analysis of digital images of a paper sensor by partial least squares for determination of nitrite. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 158, p. 48–53, 2016.
- SIEBERT, K. J.; LYNN, P. Y. Comparison of methods for measuring protein in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemist**, v. 63, p. 163–170, 2005.
- SILVA, A. F. S.; GONÇALVES, I. C.; ROCHA, F. R. P. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, v. 125, p. 1–7, 2021.
- SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R. P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**, v. 115, 1 set. 2020.
- SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R. P. Innovative prediction of milk microbiological quality

from pH measurements by digital imaging photometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 114, art. 104715, 2022.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6. ed. Belmont: Brooks Cole, 2007.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76–85, 1985.

SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. A simple and low-cost approach for microdistillation: Application to methanol determination in biodiesel exploiting smartphone-based digital images. **Talanta**, v. 199, p. 285–289, 2019.

SPINK, J.; MOYER, D. C. Defining the public health threat of food fraud. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 157–163, 2011.

SUAREZ, W. T. et al. A compact miniaturized continuous flow system for the determination of urea content in milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p. 1525–1533, 2010.

SUAREZ, W. T. et al. In situ determination of urea in milk employing a portable and low-cost LED photometer. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 4, p. 1149–1154, 2018.

SUZUKI, Y. et al. Tristimulus colorimetry using a digital still camera and its application to determination of iron and residual chlorine in water samples. **Analytical Sciences**, v. 22, p. 410–414, 2006.

SUZUKI, Y.; SUZUKI, K. Optical sensors for ions and protein based on digital color analysis. n: ORELLANA, G.; MORENO-BONDI, M. C. (eds.). **Frontiers in Chemical Sensors: novel principles and techniques**. Berlin: Springer, 2015. p. 343–365.

TEIXEIRA, G. G.; SANTOS, P. M. Simple and cost-effective approaches for quantification of reducing sugar exploiting digital image analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 113, art. 104719, 2022.

TOLEDO, P. R. A. B. et al. Fast and simple method for identification of adulteration of cow 's milk with urea using diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, v.45, p.6357-6364, 2017.

TOMÉ, D.; DEBABB, H. Physiological effects of milk protein components. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 383–392, 1998.

TRIVEDI, U. B. et al. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 140, n. 1, p. 260–266, 2009.

TUAÑO, A. P. P.; CASTRILLO, G. A.; VIOLA, G. A. V. Analysis of apparent amylose content of market milled rice via digital image photometry using a smartphone camera. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 852–861, 2021.

UPRETI, G. C.; RATCLIFF, R. A.; RICHES, P. C. Protein estimation in tissues containing high levels of lipid: modifications to Lowry's method of protein determination. **Analytical Biochemistry**, v. 168, p. 421–427, 1988.

VIANA, L. C. **Uso da espectroscopia no infravermelho próximo para predição de propriedades tecnológicas da madeira de *eucalyptus***. 2008. 111 p. Mestrado (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VISCONTI, L. G. et al. Determination of grated hard cheese adulteration by digital image analysis and multivariate analysis. **International Dairy Journal**, v. 138, art. 105539, 2023.

XIE, W.; YU, K.; GONG, Y. Rapid and quantitative determination of urea in milk by reaction headspace gas chromatography. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 838–841, 2019.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 137–142, 2004.

YANG, Y. et al. Opportunities for fraudsters: When would profitable milk adulterations go unnoticed by common, standardized FTIR measurements? **Food Research International**, v. 136, art. 109543, 2020.

YANU, P.; JAKMUNEE, J. Down scaled Kjeldahl digestion and flow injection conductometric system for determination of protein content in some traditional northern Thai foods. **Food Chemistry**, v. 230, p. 572–577, 2017.

YULIARTI, O.; KIAT KOVIS, T. J.; YI, N. J. Structuring the meat analogue by using plant-based derived composites. **Journal of Food Engineering**, v. 288, art. 110138, 2021.

ZAIA, D. A. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; ZAIA, C. T. B. V. Determination of total proteins: a study of reaction between quinones and proteins. **Talanta**, v. 49, p. 373–376, 1999.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787–793, 1998.

ZHENG, K. et al. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 112, n. 15, p. 16–21, 2017.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Determination of total protein content in gelatin solutions with the Lowry or Biuret assay. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 474–479, 2006.