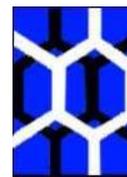




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E  
INDUSTRIAL**



**SARA DOS SANTOS NASCIMENTO**

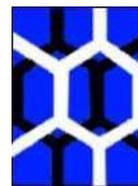
**DESENVOLVIMENTO DE MICRODISPOSITIVO A BASE DE PAPEL PARA  
AVALIAÇÃO DA ACIDEZ DO LEITE**

Maceió - AL

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E  
INDUSTRIAL**



**DESENVOLVIMENTO DE MICRODISPOSITIVO A BASE DE PAPEL PARA  
AVALIAÇÃO DA ACIDEZ DO LEITE**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do título de Bacharelado em Química Tecnológica e Industrial.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu

Maceió- AL

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Jone Sidney Alves de Oliveira**

N244d Nascimento, Sara dos Santos  
Desenvolvimento de microdispositivo a base de papel para avaliação da acidez do leite / Sara dos Santos Nascimento. – 2020.  
34 f.

Orientadora: Fabiane caxico de Abreu  
Monografia (TCC em Química) – Universidade Federal de Alagoas.  
Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 31-34

1. Acidez do leite. 2. Alizarol. 3. Qualidade do leite 4. Dispositivo microfluídico.  
I. Título.

CDU: 637.13

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

SARA DOS SANTOS NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO DE MICRODISPOSITIVO A BASE DE PAPEL PARA  
AVALIAÇÃO DA ACIDEZ DO LEITE**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao corpo docente do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de fevereiro de 2020.

*Fabiane Caxico de Abreu Galdino*

Profª Drª Fabiane Caxico de Abreu Galdino, UFAL (Orientadora)

**Banca Examinadora:**

*Diógenes Meneses dos Santos*

Profº Dr. Diógenes Meneses dos Santos, UFAL

*Fabricia da Rocha Ferreira*

Profª Drª Fabrícia da Rocha Ferreira, IQB - UFAL



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)  
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,  
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.  
www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



**ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB**

1. Data da apresentação do TCC: 28/02/2020

2. Aluno / matrícula: SARA DOS SANTOS NASCIMENTO 12210955

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:  
Fabiane Cavico de Abreu Galdino

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

FABIANE CAVICO DE ABREU GALDINO (Presidente)	Nota: 10,0
FABÍCIA DA ROCHA FERREIRA (1º avaliador)	Nota: 10,0
DIOGENES MENESES DOS SANTOS (2º avaliador)	Nota: 10,0
(3º avaliador)	Nota: _____

5. Título do Trabalho:  
DESENVOLVIMENTO DE MICRODISPOSITIVO A BASE DE  
PAPEL PARA AVALIAÇÃO DA ACIDEZ DO LEITE

6. Local: SALA DE REUNIÕES DO IQB

7. Apresentação: Horário início: 10:15' Horário final: 10:33'  
Arguição: Horário início: 10:35' Horário final: 11:37'

8. Nota final: 10,0 (Dez)

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 18 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 60 minutos, tendo como resultado:

APROVADO

( ) APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

( ) NÃO APROVADO.



**Universidade Federal de Alagoas (UFAL)**  
**Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)**

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,  
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.  
www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 23 de Fevereiro de 2020

Presidente: Fabiane Cavaco de Alencar Galdino  
1º Avaliador: Fabrizia da Rocha Ferreira  
2º Avaliador: Diego Gomes de Jesus  
3º Avaliador: \_\_\_\_\_  
Candidato: Enzo de Santos Naveiro

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida e por me conceder a graça de chegar até aqui.

Aos meus amados pais Anunciada e Everaldo pelo exemplo de vida, amor, dedicação e alegria com a qual sempre me incentivaram, por me ensinarem que a educação é sempre o melhor caminho.

À minha orientadora professora Fabiane Caxico pelas oportunidades, paciência, alegria, ensinamentos e compreensão.

Aos meus tios Aladel e Ceíça pela acolhida, carinho, incentivo e cuidados, conquistei um novo lar aqui em Maceió.

Aos meus irmãos Hélder, Gláucia, Bento e a minha prima Natalha pelo carinho e companheirismo de sempre.

Ao meu primo Rafael por ser o melhor guarda-costas que eu poderia ter, por todos os dias que foi me buscar no ponto de ônibus tarde da noite.

Aos meu amigo Angladis pela paciência, amizade, pelas discussões e contribuições neste trabalho.

Aos meus bem-humorados irmãos do LEMAN que sempre estiveram dispostos a ajudar, apoiar, incentivar, falar da vida dos outros e rir, em especial a Leyllanne, Elvis, Emanuella, Samaysa, João Victor, Guimarães, Caio, Alysson, Ygor, Iago e ao nosso melhor agregado Ivis.

Aos amigos de graduação pelas alegrias e dificuldades compartilhadas Artur, Mayana e Simone.

Ao técnico Aldir por sempre estar disposto a ajudar.

Por fim, agradeço a todos os professores e colegas que contribuíram com a minha formação durante esse curso.

## RESUMO

O leite é um produto de grande valor nutricional e relevância econômica. Sua acidez é um dos parâmetros essenciais para verificação da qualidade higiênico-sanitária, apresentando-se normalmente com pH = 6,6 – 6,8. Variações nesse parâmetro podem indicar presença de: colostro; mastite; neutralizantes; excesso de microrganismos, inviabilizando seu processamento. Dada a importância desse parâmetro, é importante o desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e de fácil interpretação que possibilitem triagem inicial desse insumo, o uso de microdispositivos a base de papel apresenta vantagens como baixo custo, facilidade de uso e portabilidade, tornando-os promissores a avaliação desse parâmetro. Este trabalho objetiva o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico analítico a base de papel para avaliação colorimétrica da acidez do leite. O dispositivo foi elaborado através da integração de papel de filtro e fitas adesivas, utilizou-se cortador de papel para obtenção de dispositivos com 0,5 cm de diâmetro. Para avaliar a eficiência do microdispositivo proposto foram avaliados dois suportes do material base (fita adesiva e plástico) e a adição de diferentes volumes de solução indicadora (5, 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$ ). Utilizou-se como indicador colorimétrico solução comercial de alizarol (72°GL), a qual foi adicionada ao dispositivo, seca em temperatura ambiente e em seguida foi adicionada a amostra em mesmo volume. Para avaliação quantitativa do analito, foi realizada uma curva analítica com os seguintes valores de pH: 6,0; 6,4; 6,6; 6,8 e 7,0, estes foram obtidos através da adição de soluções de HCl e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em amostra de leite comercial e acompanhamento em aparelho pHmetro devidamente calibrado. A captura das imagens e avaliação dos dados foi realizada de duas maneiras: através de câmera de smartphone em caixa de ABS associada ao software PhotoMetrix Pro®, e em scanner Samsung Xpress, tratamento das imagens software CorelDRAW 2018 e análise dos dados em software OriginPro 9.0. Utilizando o suporte de plástico foi possível a adição de solução indicadora e amostra de leite sem vazamentos, gerando produto com design inovador e eficaz. O uso de 5  $\mu\text{L}$  de solução indicadora possibilitou preenchimento de todo dispositivo e permitiu avaliação colorimétrica. O dispositivo permitiu a avaliação qualitativa da acidez do leite através da variação das cores: amarelo – pH ácido, laranja claro – pH ótimo e lilás – pH básico. Foi possível a avaliação quantitativa da análise em triplicata, obtendo-se coeficiente de correlação linear de 0,99737, demonstrando o potencial do método desenvolvido com baixo custo como alternativa aos métodos convencionais.

**Palavras chaves:** acidez do leite; alizarol; dispositivo microfluídico; análise quantitativa.

## ABSTRACT

Milk is a product of great nutritional value and economic relevance. Its acidity is one of the essential parameters for verifying the hygienic-sanitary quality, presenting normally with  $\text{pH} = 6.6 - 6.8$ . Variations in this parameter may indicate the presence of: colostrum; mastitis; neutralizing; excess of microorganisms, making their processing unfeasible. Due to the importance of this parameter, it is important to develop inexpensive, faster and easy-to-interpret methods that enable initial screening of this input. The use of paper-based microdevices has advantages such as low cost, ease of use and portability, making them promising the evaluation of this parameter. This work aims to develop a paper-based analytical microfluidic device for colorimetric evaluation of milk acidity. The device was elaborated through the integration of filter paper and adhesive tapes. A paper cutter was used to obtain devices with diameter of 0.5 cm. To evaluate the efficiency of the proposed microdevice, two supports of the base material (adhesive tape and plastic) and the addition of different volumes of indicator solution (5, 10, 15 and 20  $\mu\text{L}$ ) were evaluated. A commercial alizarol solution (72 ° GL) was used as a colorimetric indicator, which was added to the device, dried at room temperature and then the sample was added in the same volume. For quantitative evaluation of the analyte, an analytical curve was performed with the following pH values: 6.0; 6.4; 6.6; 6.8 and 7.0, obtained by adding  $\text{HCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  and  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  solutions in a commercial milk sample and monitoring in a properly calibrated pH meter. The images capture and data evaluation were performed in two ways: using a smartphone camera in an ABS box associated with the PhotoMetrix Pro® software; and using a Samsung Xpress scanner, image processing using CorelDRAW 2018 software and data analysis using OriginPro 9.0 software. Using the plastic support, it was possible to add an indicator solution and a milk sample without leaks, generating a product with an innovative and effective design. The use of 5  $\mu\text{L}$  of the indicator solution made it possible to fill the entire device and allowed colorimetric evaluation. The device allowed a qualitative assessment of the acidity of the milk by varying the colors: yellow - acidic pH; light orange - optimum pH; and lilac - basic pH. Quantitative evaluation of the triplicate analysis was possible, obtaining a linear correlation coefficient of 0.99737, demonstrating the potential of the method developed at low cost as an alternative to conventional methods.

**Keywords:** milk acidity; alizarol; microfluidic device; quantitative analysis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa da Bacia Leiteira e Pólo Leiteiro do Estado de Alagoas em 2015. 14
- Figura 2** – Estrutura da alizarina em meio básico e em meio ácido. .... 18
- Figura 3** – Teste do alizarol, da esquerda para direita: leite ácido, normal e básico 19
- Figura 4** – Elaboração do dispositivo de papel ..... 23
- Figura 5** – Diferentes suportes utilizados para o dispositivo ..... 24
- Figura 6** – Caixa ABS utilizada para obtenção e análise das imagens. .... 25
- Figura 7** – Uso de suportes diferentes na elaboração do dispositivo baseado em papel e da retenção de diferentes volumes, da esquerda para direita: 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$ . Em a) suporte de plástico e em b) suporte de fita adesiva. .... 26
- Figura 8** – Teste do alizarol utilizando dispositivo baseado em papel, análise em triplicata, em a) dispositivos após secagem da solução indicadora, b) dispositivo após aplicação das amostras de leite e em c) dispositivos após a secagem da amostra. . 27
- Figura 9** – Em a) estruturas da alizarina (preto) e possíveis etapas de protonação e desprotonação dos grupos hidroxilas, em azul formas mono-aniônicas e em verde di-aniônicas, juntamente com os comprimentos de absorção máximos e em b) Espectros UV-Vis da alizarina em diferentes pH. .... 28
- Figura 10** – Curva analítica da análise em dispositivo baseado em papel obtida através do software PhotoMetrix Pro®. .... 29
- Figura 11** – Análise em triplicata da acidez do leite utilizando dispositivo em papel a) imagens obtidas através do scanner, b) média de pixels e em c) curva analítica. .... 31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°D	grau Dornic
° GL	grau Gay Lussac
°SH	graus Soxhlet-Henkel
°Th	graus Thorner
μPADs	Microfluidic Paper-based Analytical Devices - Microdispositivos Analíticos Baseados em Papel
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene - Acrilonitrila Butadieno Estireno
IV-TF	Infravermelho Médio por Transformada de Fourier
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
IN	Instrução Normativa
pH	Potencial Hidrogeniônico
POCT	Point of Care Testing - Teste no Ponto de Atendimento
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UV-vis	Ultravioleta-visível

## SÚMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
2.1 Atividade leiteira em Alagoas .....	14
2.2 Composição e parâmetros de qualidade do leite .....	15
2.3 Métodos de avaliação da acidez do leite .....	17
2.4 Dispositivos microfluídicos analíticos a base de papel ( $\mu$ PADs) .....	20
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
3.4 Objetivo geral .....	22
3.5 Objetivos específicos.....	22
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.4 Desenvolvimento do dispositivo .....	23
4.5 Acidez do leite .....	24
4.6 Obtenção das imagens.....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>33</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A palavra leite deriva do latim lacte, e define um líquido branco secretado pelas glândulas mamárias, um pouco antes e após o parto dos animais mamíferos (FENIMAN; PASINI; MUCELIN, 2003). De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA – Art. 475) é chamado leite o produto obtido da ordenha de vacas, e o leite de outros animais deve denominar-se de acordo com a espécie, como por exemplo: leite de cabra, leite de ovelha (BRASIL, 2017).

Esse produto apresenta grande relevância econômica, tendo a produção atingido 798 bilhões de litros no mundo e 35,1 bilhões de litros no Brasil em 2017 (EMBRAPA, 2018). A produção leiteira no estado de Alagoas atingiu cerca de 352 mil litros em 2015, classificando esse estado como o 6 maior produtor de leite da região e responsável por 1% da produção do país (ESTADO DE ALAGOAS, 2017).

O leite é um alimento de grande valor nutricional, sendo considerado um alimento completo. Constitui de matéria prima para elaboração de diversos produtos, dentre eles: queijos, iogurtes, doces e sobremesas lácteas, o que ressalta seu importante valor econômico (ORDÓÑEZ, 2005). A qualidade do leite para obtenção de bons produtos é essencial, desta forma, para a verificação da mesma algumas análises são realizadas na plataforma de recepção dos laticínios, dentre elas, a acidez titulável – expressa em gramas de ácido láctico por 100 mL.

A acidez do leite é um dos parâmetros essenciais para verificação de sua qualidade higiênico-sanitária, podendo fornecer informações sobre a saúde do rebanho. Em condições normais o pH do leite encontra-se entre 6,6 e 6,8 e acidez em nível de ácido láctico entre 0,14 a 0,18 g de ácido láctico por 100 mL (BRASIL, 2018).

Quando essa matéria-prima apresenta acidez incompatível com as exigências de qualidade, este produto não pode ser inserido no processo de

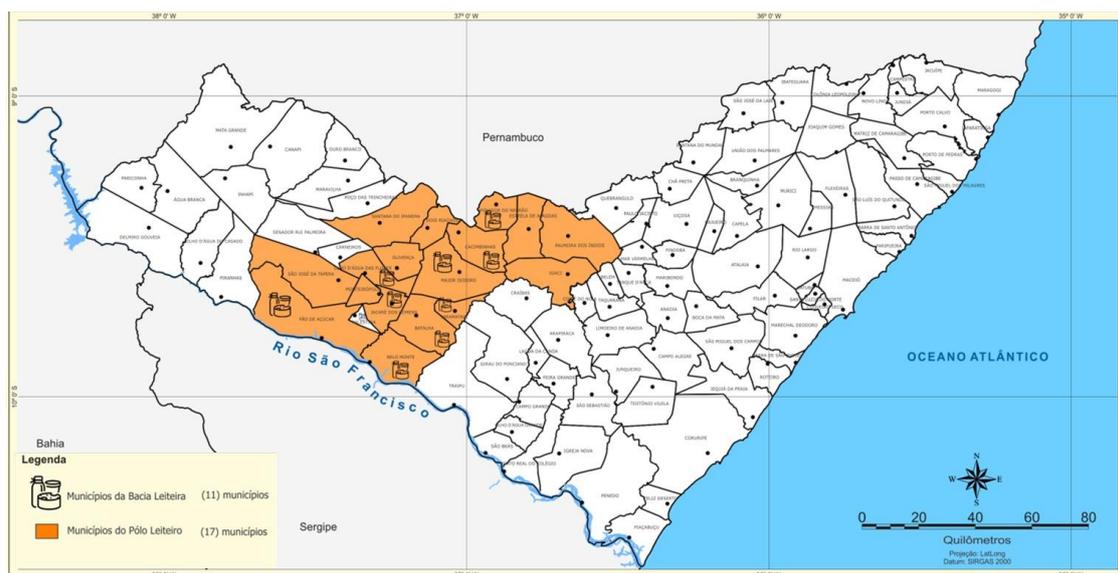
beneficiamento e produção, sendo assim é de grande importância e interesse para a indústria, a criação de métodos rápidos, baratos, limpos e de fácil interpretação que possam fazer uma triagem inicial desse insumo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Atividade leiteira em Alagoas

Em Alagoas, a pecuária leiteira é constituída majoritariamente por pequenos produtores (86%), estes têm essa atividade como principal fonte de renda, a qual é caracterizada pela carência de tecnologia e investimentos (ESTADO DE ALAGOAS, 2017). A atividade leiteira está presente em todos os municípios alagoanos, se destinando a ampla comercialização a produção do semiárido, nas regiões da Bacia Leiteira (37,4%) e do Pólo Leiteiro (61,1%) (Figura 1).

**Figura 1** – Mapa da Bacia Leiteira e Pólo Leiteiro do Estado de Alagoas em 2015.



**Fonte:** Adaptado de ESTADO DE ALAGOAS, 2017.

A Bacia Leiteira existe há mais de 80 anos, apresentando grande relevância à economia local; em 1990 formava o maior centro produtor de leite do Nordeste e atualmente constitui a zona de abastecimento formada por propriedades agrícolas dedicadas a atividade de produção leiteira, localizadas

em uma região canalizada para processar e destinar a um centro de consumo. Engloba os seguintes municípios: Batalha, Belo Monte, Cacimbinhas, Jacaré dos Homens, Jaramataia, Major Izidoro, Minador do Negrão, Monteirópolis, Olho D'Água das Flores, Palestina e Pão de Açúcar (ESTADO DE ALAGOAS, 2017).

A região do Pólo Leiteiro é formada por grande número de produtores que geralmente usam tecnologia de ordenha mecânica, apresentando-se na ponta do processo de produção, inclui os municípios da Bacia Leiteira (Exceto Palestina), junto com os municípios de Dois Riachos, Estrela de Alagoas, Igaci, Olivença, Palmeira dos Índios, Santana do Ipanema e São José da Tapera (ESTADO DE ALAGOAS, 2017).

A produção de leite e as cadeias produtivas de derivados como queijos; iogurtes; doces; suplementos alimentares e sobremesas lácteas, desempenham importante papel na economia alagoana, atuando no suprimento de alimentos, geração de emprego e renda, representando atividade alternativa ao comércio, serviços e indústria açucareira (ESTADO DE ALAGOAS, 2017). Sendo fundamental conhecimento e investimentos acerca da composição e parâmetros de avaliação de qualidade dessa matéria-prima, para obtenção de produtos com propriedades nutricionais e higiênicas preservadas.

## **2.2 Composição e parâmetros de qualidade do leite**

O leite é uma das únicas substâncias na natureza destinada exclusivamente a servir de alimento, é caracterizado como fonte de proteínas de alto valor biológico e cálcio, tem sido considerado um alimento básico e valioso para crianças; e um complemento indispensável na dieta dos adultos (SANTOS, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2015).

A composição do leite pode ser influenciada por diversos fatores como: espécie, raça, período de lactação, idade, alimentação e saúde (ORDÓÑEZ, 2005). De maneira geral, esse alimento é constituído por 87% água e 13% componentes sólidos, estes últimos são distribuídos em: carboidratos (4-5%),

proteínas (3%), lipídeos (3-4%), minerais (0,8%) e vitaminas (0,1%) (ORDÓÑEZ, 2005).

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiene. Afim de garantir a qualidade dessa matéria-prima, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dispõe das Instruções Normativas nº 76 e 77 de 2018, a nº 76 trata de regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, enquanto a nº 77 estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru.

Um dos parâmetros físico-químicos mais importantes para avaliar a qualidade do leite é a acidez titulável. Esse parâmetro é regulamentado pela IN 76 (2018) devendo apresentar-se entre 0,14 e 0,18 expressa em gramas de ácido láctico/100 mL, sendo vedado o uso de neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico.

Após ordenha, o leite apresenta-se ligeiramente ácido com pH entre 6,6 e 6,8. Essa acidez, ocorre devido a presença de grupos ácidos das caseínas, fosfatos, ácido carbônico e ácidos orgânicos como citratos; estes, apresentam concentrações influenciadas por respostas fisiológicas a diferentes fatores, como alimentação e estresse, capazes de alterar a síntese proteica, a composição das caseínas e o grau de fosforilação de suas frações, promovendo consequente efeito na acidez titulável (CALAMARI; GOBBI; BANI, 2016).

O pH do leite é um indicativo da saúde do rebanho, nos casos de mastite (inflamação das glândulas e tecidos mamários) pode apresentar-se em torno de 7,5, nesse estágio da doença o organismo libera substâncias alcalinizantes em resposta a acidificação bacteriana (NETO; ZAPPA, 2011). A mastite é o principal entrave a pecuária leiteira, sua ocorrência está relacionada ao manejo sanitário dos animais e ordenha, ela causa prejuízos econômicos, dos quais o leite deve ser descartado por oferecer risco a saúde pública e os animais devem ser

isolados para evitar contágio do rebanho e tratados com antibióticos (LANGONI et al., 2017).

O leite pode ser encontrado com acidez superior a 0,18 g de ácido láctico por 100 mL (pH < 6,6), a causa mais provável dessa condição é o elevado nível de ácido láctico produzido pela fermentação da lactose (açúcar do leite) por bactérias ou a presença de colostro (pH 6,0) (KOBBLITZ, 2011). O colostro é a primeira secreção produzida pelas glândulas mamárias após o parto e apresenta composição responsável por auxiliar o sistema imunológico e o desenvolvimento gastrointestinal, sendo exclusivo ao consumo da cria (GOMES et al., 2017). A alta acidez promove a perda da estabilidade do leite, provocando a floculação das proteínas, o que impede o processamento adequado do mesmo e de seus derivados (ORDÓNEZ, 2005).

Dada a importância da determinação da acidez titulável ao processamento dos laticínios, a IN 77 (2018) define que os estabelecimentos de recepção de leite cru refrigerados devem realizar em cada compartimento do tanque do veículo transportador a análise da acidez titulável e do teste de alizarol; a avaliação desse parâmetro físico-químico também é obrigatório em granjas leiteiras antes de cada beneficiamento.

### **2.3 Métodos de avaliação da acidez do leite**

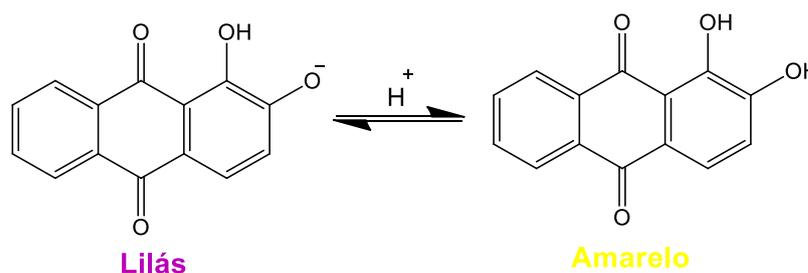
O MAPA determina a titulação volumétrica como o método oficial para análise da acidez do leite fluido através do “Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal” em conformidade com a AOAC International (2016). Essa técnica consiste na neutralização do ácido láctico da amostra através do uso de solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), utilizando solução alcoólica de fenolftaleína 1% (m/v) como indicador e solução de fucsina ( $1,776 \text{ mmol L}^{-1}$  em etanol e 0,5% ácido acético) como padrão de coloração.

A titulação volumétrica é amplamente utilizada para análise da acidez do leite em todo o mundo, embora o princípio seja o mesmo, existem variações entre os métodos decorrentes do uso de fatores como: diferentes concentrações

da solução alcalina; do volume de leite titulado e da concentração do indicador, outro fator relevante é que são utilizadas diferentes unidades para expressar os resultados como grau Dornic ( $1^{\circ}\text{D} - 0,1 \text{ g de ácido láctico L}^{-1}$ ), graus Soxhlet-Henkel ( $1^{\circ}\text{SH} - 0,225 \text{ g de ácido láctico L}^{-1}$ ) e graus Thorner ( $1^{\circ}\text{Th} - 0,09 \text{ g de ácido láctico L}^{-1}$ ) (FABRO *et al.*, 2006). Apesar da técnica ser de fácil condução, alguns fatores constituem fontes de erro comum, como o indicador selecionado e sua concentração, a solução alcalina selecionada e sua concentração, a velocidade de titulação, a temperatura de trabalho e a diluição do leite (FABRO *et al.*, 2006).

Para avaliação qualitativa da acidez do leite, a IN 77 (2018) determina o teste do álcool/alizarol (72 % v/v), que consiste na adição de volumes iguais de leite e solução de alizarol (1,2 dihidroxiantraquinona – alizarina (Figura 2) – a 0,2 % m/v em álcool etílico 72 % v/v), onde o indicador apresenta um resultado colorimétrico e a presença do álcool no leite ácido promove a coagulação por desidratação, devido à instabilidade das caseínas a perda de cálcio.

**Figura 2** – Estrutura da alizarina em meio básico e em meio ácido.



**Fonte:** Autora, 2020.

Podendo ser observados os seguintes resultados: coloração vermelho tijolo sem grumos ou com grumos finos – leite com acidez normal e estável ao álcool 72% v/v; coloração amarela ou marrom claro, ambas com grumos – leite com acidez elevada e não estável ao álcool 72% v/v; coloração lilás a violeta – leite alcalino sugerindo a presença de mastite ou de neutralizantes (BRASIL, 2018) (Figura 3).

**Figura 3** – Teste do alizarol, da esquerda para direita: leite ácido, normal e básico.



Apesar de amplamente utilizado, o teste do álcool (álcool etílico 72% v/v) que relaciona a presença e características dos grumos no leite à estabilidade térmica têm sido questionado, muitas vezes as amostras de leite apresentam boa estabilidade, mas apresentam resultado positivo na prova do leite (com grumos), estando a coagulação do leite associada a outros fatores que alteram o balanceamento de sais, e que diferem da acidez (EMBRAPA, 2018).

Trabalhos como os de MANUELIAN *et al.*, (2019) e CALAMARI; GOBBI; BANI, (2016) tem evidenciado o potencial do uso de espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier (IV-TF) associada a modelos estatísticos para análise rotineira de componentes do leite, incluindo a avaliação da acidez titulável e pH. Apesar dessa técnica exigir mão de obra qualificada, equipamentos modernos e custos significativamente maiores do que a verificação do pH por potenciometria e a titulação volumétrica, ela possibilita o registro de informações fenotípicas do rebanho em larga escala, permitindo seleção genética.

A relevância da avaliação da acidez em amostras de leite como método inicial de verificação de sua qualidade, ressalta o interesse de pequenos produtores, indústrias e órgãos de fiscalização pelo desenvolvimento de tecnologias para análise desse parâmetro de forma ainda mais econômica e prática, um método promissor é o uso de microdispositivos analíticos a base de papel.

## 2.4 Dispositivos microfluídicos analíticos a base de papel ( $\mu$ PADs)

O desenvolvimento tecnológico impulsionou o desenvolvimento de sistemas miniaturizados como os sistemas microfluídicos, estes atualmente constituem ferramentas poderosas para detecção e quantificação de diversos analitos, podendo englobar em um único dispositivo diversos processos analíticos como o pré-tratamento de amostras, separação, reações químicas e quantificação (KANT et al., 2018).

O uso do papel como material suporte para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos permite que processos analíticos sejam realizados com facilidade, devido à características como a natureza hidrofílica desse material, dando origem aos Microdispositivos Analíticos Baseados em Papel (Microfluidic paper-based analytical devices -  $\mu$ PADs), que quando comparados aos dispositivos microfluídicos convencionais fabricados em materiais como vidro, silício e polímeros, apresentam vantagens como acessibilidade; facilidade de uso; não requerem instrumentos complexos a fabricação; alta propriedade de absorção; alta porosidade; descartabilidade; atoxicidade, biodegradabilidade; biocompatibilidade, se tornando uma plataforma de teste no ponto de atendimento (Point of Care Testing – POCT) amplamente estimulada na literatura (XIA; SI; LI, 2016).

A técnica se baseia no uso do papel como barreira física e limite hidrofóbico para a dispersão da amostra em zonas hidrofílicas, permitindo ação capilar passiva para a zona de detecção, a qual é usualmente revestida com receptores para detecção dos analitos (SRIRAM et al., 2017).

A detecção consiste em uma das etapas mais relevantes para quantificar e/ou identificar o analito, podendo ser realizada por via colorimetria, fluorescência, eletroquímica, fotoeletroquímica, quimioluminescência, eletroquimioluminescência, espectrometria de massa, ressonância magnética, espectroscopia Raman e sensores capacitivos (FU; WANG, 2018). Destas, a detecção colorimétrica é a mais comumente utilizada, devido a vantagens como leitura visual, rápida detecção, viabilidade em aplicações remotas, operação

direta e estabilidade, permitindo captura por dispositivos eletrônicos, como câmeras, scanners ou foto-sensores (FU; WANG, 2018; SRIRAM et al., 2017).

Usualmente a fabricação dos  $\mu$ PADs envolve a formação de áreas hidrofóbicas específicas, para restringir o fluxo do líquido e direcionar a zona de detecção, desde o seu desenvolvimento em 2007 por MARTINEZ *et al.*, diversos métodos tem sido empregados, como a impressão em cera, gravação a jato de tinta, impressão 3D, carimbo de tinta, tratamento a laser, corte e modelagem de papel, serigrafia, entre outros (FU; WANG, 2018).

As vantagens associadas ao uso de  $\mu$ PADs para diagnóstico de diversas matrizes, aliada a importância da avaliação da acidez do leite de forma rápida, prática, portátil e econômica, torna essa plataforma ideal para avaliação desse parâmetro na qualidade do leite nas plataformas de recepção dos laticínios. Sendo a proposta desse trabalho o desenvolvimento de  $\mu$ PAD que atenda às necessidades de avaliação da acidez do leite.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.4 Objetivo geral**

Desenvolver dispositivo microfluídico analítico a base de papel para avaliação colorimétrica da acidez do leite.

#### **3.5 Objetivos específicos**

- Desenvolver um novo design de dispositivo microfluídico de papel, com o custo de produção inferior aos dispositivos atuais;
- Realizar estudo com indicador ácido-base que possibilite a avaliação da acidez do leite;
- Avaliar materiais base para uso como suporte do dispositivo em papel;
- Investigar a viabilidade do uso de diferentes dispositivos na captura e tratamento das imagens.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.4 Desenvolvimento do dispositivo

Para elaboração do material base dos dispositivos utilizou-se papel de filtro com porosidade 14  $\mu\text{m}$  e espessura 205  $\mu\text{m}$ . Na parte inferior do papel foram anexadas fita adesiva acrílica e fita adesiva acrílica de face dupla. Esse material adquiriu formato utilizando um furador de papel comercial, gerando circunferências de 0,5 cm de diâmetro conforme Figura 4.

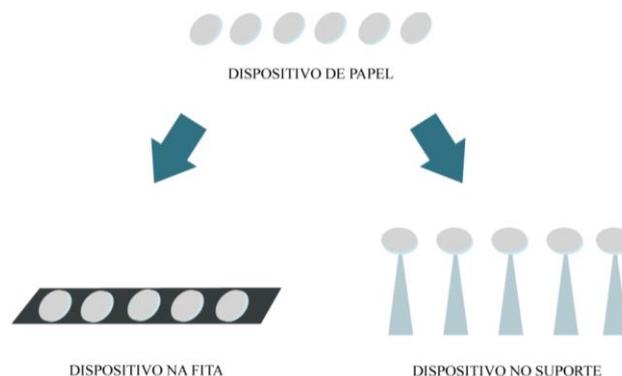
**Figura 4** – Elaboração do dispositivo de papel



**Fonte:** Autora, 2020.

Avaliou-se qual o suporte mais adequado à suspensão do material base e sua influência na retenção do líquido, removendo a parte inferior da fita adesiva acrílica de face dupla e acoplado a outra fita adesiva ou a um suporte de plástico (Figura 5), nessa etapa avaliou-se também o volume necessário para preencher todo o compartimento de modo a evitar vazamentos, utilizando-se os seguintes volumes: 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$ .

**Figura 5** – Diferentes suportes utilizados para o dispositivo



Fonte: Autora, 2020.

#### 4.5 Acidez do leite

Para análise de acidez utilizou-se aparelho medidor de pH Hanna® Instruments (precisão  $\pm 0,01$ ), devidamente calibrado a temperatura ambiente. Para avaliação colorimétrica da acidez nas amostras de leite utilizou-se solução comercial de alizarol (72° GL - CapLab) e amostras de leite comercial, estas foram adicionadas após a secagem do indicador no dispositivo e na mesma proporção da solução de alizarol conforme recomenda a IN 77 (BRASIL, 2018). Para obtenção de faixas ácidas (pH = 6,0; 6,4; 6,6; 6,8) e básica (pH = 7,0), foram adicionadas à amostra de leite soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Colorimétrica

#### 4.6 Obtenção das imagens

Para obtenção das imagens os dispositivos a base de papel foram removidos do suporte de plástico após a secagem das amostras de leite. As imagens foram obtidas utilizando smartphone Redmi 3s, acoplado a caixa de ABS (7,5 cm x 10,2 cm) com cavidade superior (2,2 cm x 1,5 cm), permitindo a obtenção das imagens com bloqueio da iluminação exterior, Figura 6. Utilizou-se o software PhotoMetrix Pro® ([www.photometrix.com.br](http://www.photometrix.com.br)) para obtenção das imagens e tratamento dos dados, as configurações para captura das imagens

foram ajustadas para 5 amostras, região de interesse 64 x 64, resolução 640 x 480 e flash automático.

**Figura 6** – Caixa ABS utilizada para obtenção e análise das imagens.



**Fonte:** Autora, 2020.

Para captura das imagens também se utilizou aparelho scanner Samsung Xpress (série SL-M2070). Para análise da intensidade de cor utilizou-se o software CorelDRAW 2018, o qual permite a obtenção da média aritmética dos pixels da região onde desejava-se efetuar o teste colorimétrico, com auxílio de uma máscara de corte. Os gráficos foram processados utilizando o software OriginPro 9.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento do dispositivo baseado em papel, foram analisados como suporte fita adesiva e suporte de plástico, avaliando-se também nessa etapa qual o volume necessário para preencher todo o dispositivo de modo a evitar vazamentos, utilizando-se os volumes: 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$ , obtendo-se a Figura 7, onde se observa que todos os volumes avaliados preencheram toda a superfície do dispositivo baseado em papel.

**Figura 7** – Uso de suportes diferentes na elaboração do dispositivo baseado em papel e da retenção de diferentes volumes, da esquerda para direita: 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$ . Em a) suporte de plástico e em b) suporte de fita adesiva.

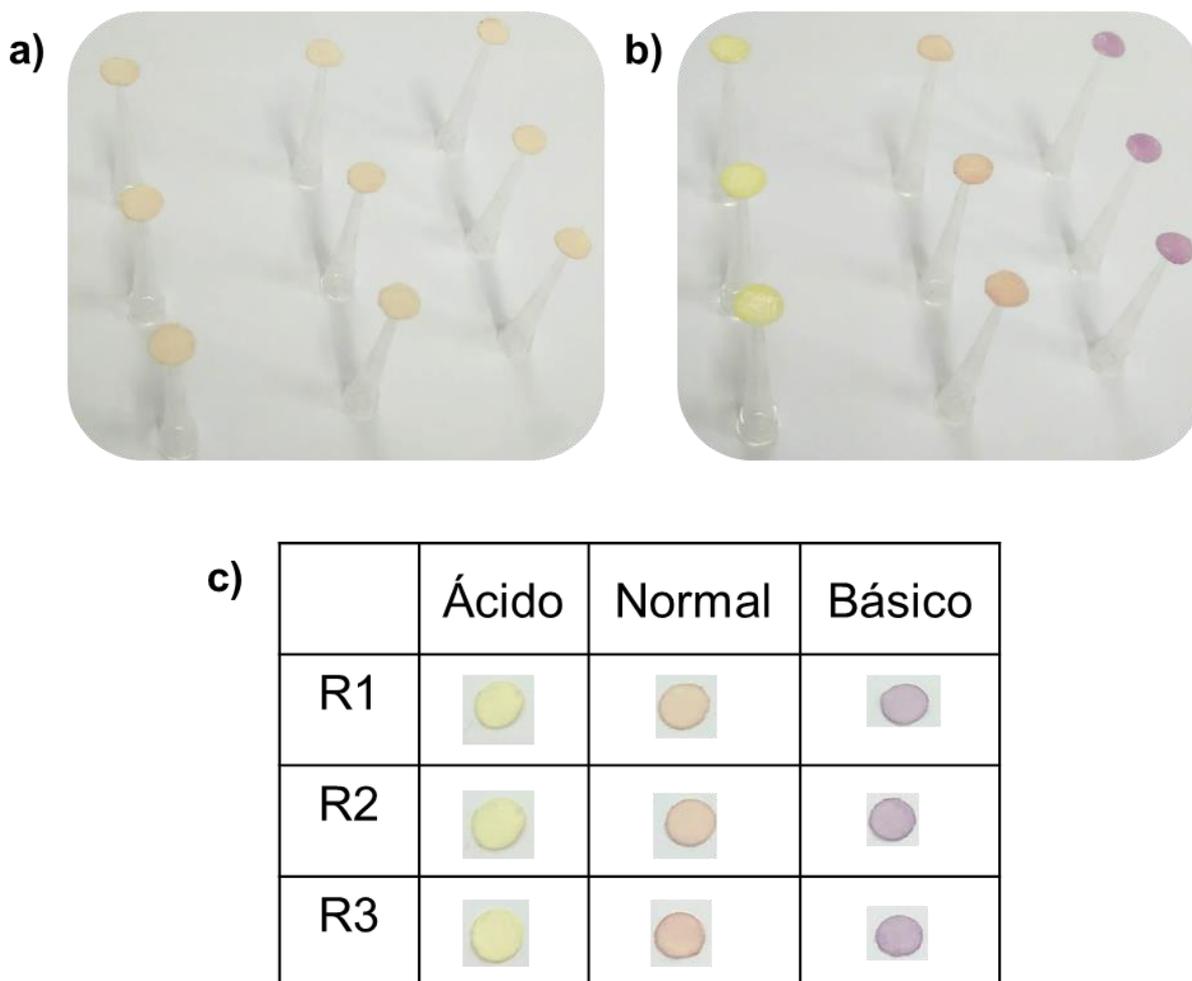


**Fonte:** Autora, 2020.

Quanto ao suporte, o material de plástico permitiu que em todos os volumes avaliados, toda a solução de indicador adicionada ao dispositivo permanece-se em região útil à avaliação colorimétrica, enquanto ao utilizar a fita adesiva como suporte, exceto a adição de 5  $\mu\text{L}$ , nos demais volumes as bordas do dispositivos não foram suficientes a retenção do líquido permitindo vazamento para a fita suporte, desde modo, como a próxima etapa da análise conta com a adição da amostra líquida, aumentando o volume total contido no dispositivo, utilizou-se como suporte o material plástico. Obtendo-se dispositivo com design inovador e eficaz.

O uso de 5  $\mu\text{L}$  da solução de alizarol (72° GL) ao dispositivo possibilitou que toda a superfície do mesmo fosse recoberta e reduziu o tempo de secagem em relação aos demais volumes analisados, após a secagem avaliou-se o efeito desse volume de solução indicadora na análise colorimétrica em amostras de leite (Figura 8). A análise foi realizada em triplicada, onde se utilizou leite ácido (pH = 5,0), em condições normais (pH = 6,8) e básico (pH = 9,0).

**Figura 8** – Teste do alizarol utilizando dispositivo baseado em papel, análise em triplicata, em a) dispositivos após secagem da solução indicadora, b) dispositivo após aplicação das amostras de leite e em c) dispositivos após a secagem da amostra onde R1, R2 e R3, se referem as três repetições analisadas.



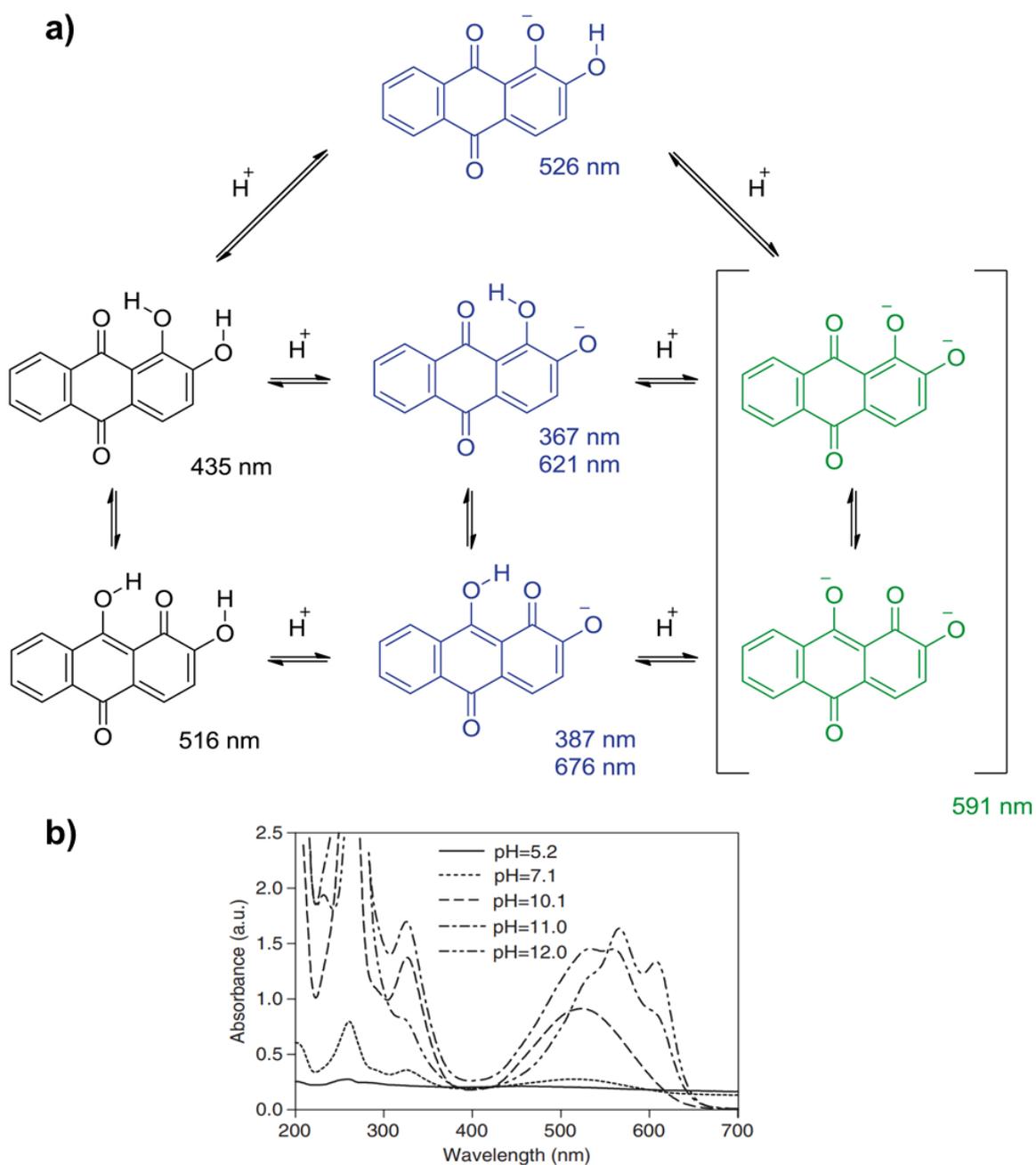
**Fonte:** Autora, 2020.

Observa-se que o volume de solução de alizarol e do leite foram suficientes para observação de diferentes colorações de acordo com a acidez do leite, essa variação permite sua avaliação qualitativa, a qual se deve a absorção de energia desse cromóforo na região do visível, apresentando coloração amarela em meio ácido e lilás em meio básico.

Na Figura 9, podemos observar as possíveis etapas de protonação e desprotonação de grupos hidroxila na alizarina e os espectros na região do UV-Vis dessa estrutura em diferentes pH. Os espectros demonstram deslocamentos e variações na intensidade das bandas em torno de 500 – 600 nm, as quais

provavelmente correspondem a transições  $n - \sigma^*$  e  $\pi - \pi^*$  da estrutura (GONZALEZ et al., 2007).

**Figura 9** – Em a) estruturas da alizarina (preto) e possíveis etapas de protonação e desprotonação dos grupos hidroxilas, em azul formas mono-aniônicas e em verde di-aniônicas, juntamente com os comprimentos de absorção máximos e em b) Espectros UV-Vis da alizarina em diferentes pH.

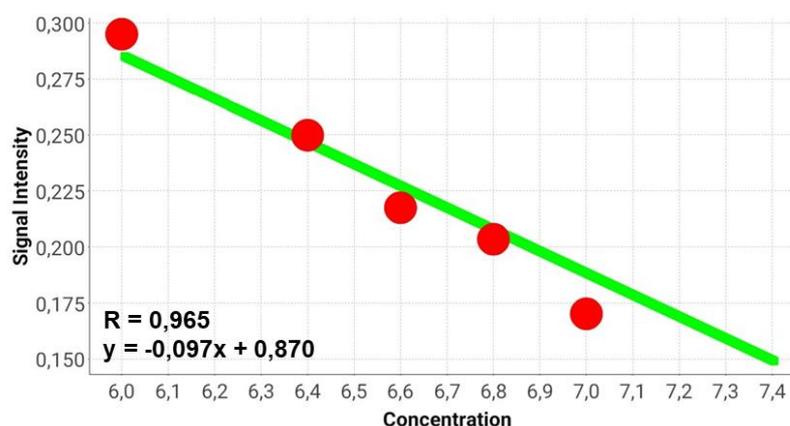


Fonte: Adaptado de BARBIERIKOV et al., (2016) e GONZALEZ et al., (2007).

O microdispositivo desenvolvido permite a avaliação qualitativa da acidez do leite utilizando a solução de alizarol como indicador, através do uso de volumes muito menores de amostra e indicador, conferindo assim um menor custo de análise, apresentando um método alternativo e prático a avaliação desse parâmetro. Entretanto, a crescente melhoria da qualidade higiênico-sanitária do leite e os cuidados a saúde dos animais, põe em questão a viabilidade o uso desse teste tradicionalmente aplicado, pois este método apresenta variação de cor expressiva apenas em condições extremas de acidez natural do leite e em condições severas de mastite. Sendo assim, um teste que permita a avaliação em faixas mais próximas a acidez normal desse alimento mais efetiva à avaliação de sua qualidade.

Visando atender a necessidade de avaliar a acidez do leite em faixa mais próxima das condições normais, utilizou-se o mesmo dispositivo para avaliação nas seguintes condições de pH: 6,0; 6,4; 6,6; 6,8 e 7,0. Entretanto, devido as semelhanças das colorações encontradas impossibilitam avaliação confiável a olho nu, para corrigir essa limitação natural do olho humano utilizou-se a câmera do smartphone auxiliada pelo software PhotoMetrix Pro® para obtenção das imagens e tratamento dos dados. Através desse recurso obteve-se uma curva analítica ( $y = -0,097x + 0,870$ ) (Figura 10), com coeficiente de correlação linear de 0,965, resultando assim em um método quantitativo eficiente para tal análise.

**Figura 10** – Curva analítica da análise em dispositivo baseado em papel obtida através do software PhotoMetrix Pro®.



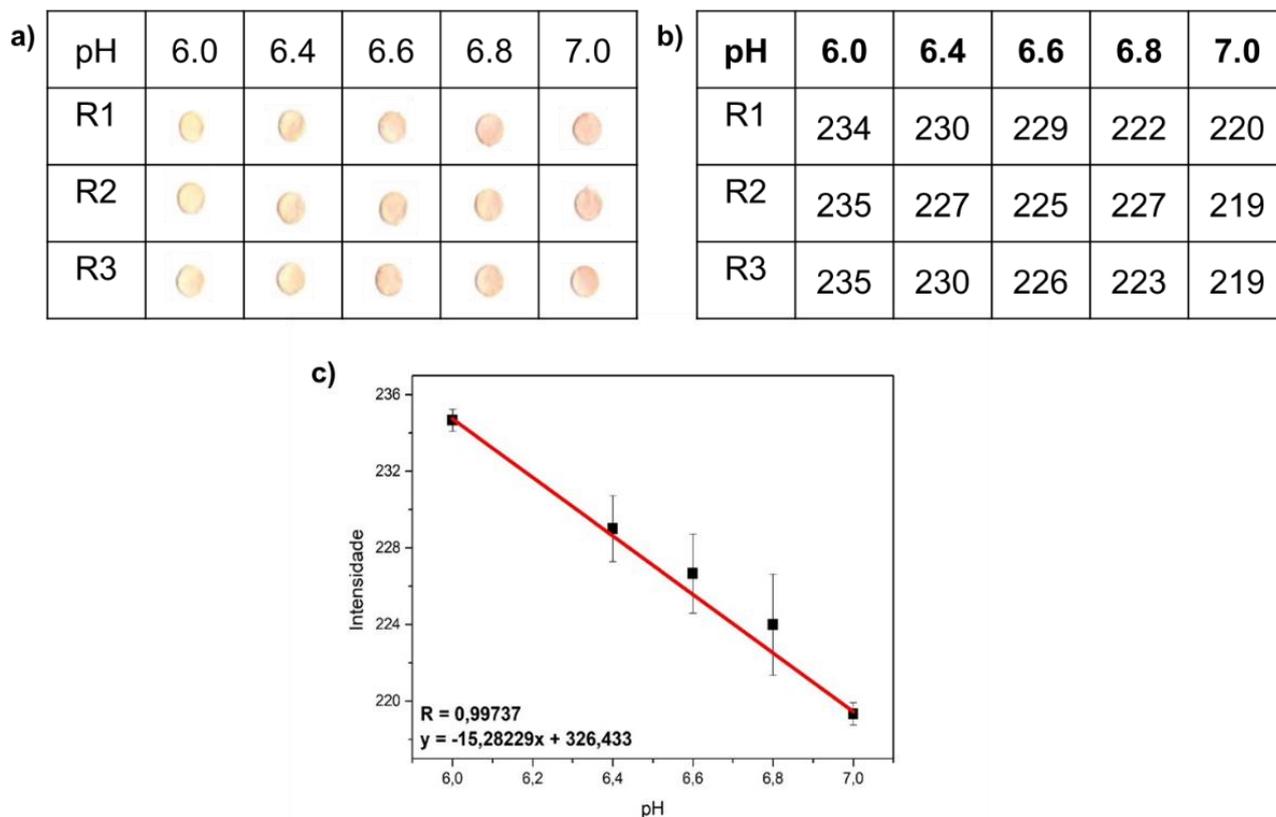
**Fonte:** Autora, 2020.

O uso do software PhotoMetrix Pro® mostrou ser uma ferramenta prática e rápida para a obtenção das imagens e tratamento de dados, entretanto, a indisponibilidade de recursos como a integração da análise em triplicata e a disponibilidade dos dados apenas na forma de gráficos dificulta a obtenção de resultados que expressem repetibilidade e confiança.

HELFER *et al.*, (2018) desenvolveu trabalho similar, utilizando o software PhotoMetrix Pro® avaliou a acidez de amostras de leite utilizando alizarol em matriz líquida, os resultados apresentaram concordância entre 95,0 e 100,9% em relação a potenciometria, entretanto, o trabalho foi desenvolvido em escala de pH de 3,0 a 12,0, com variação entre os pontos de 1,0 na escala de pH, sendo que a variação em que o leite deve ser rejeitado para processamento está na escala de 0,2, assim uma análise muito longa, além de não usual, que pode mascarar as pequenas variações que acontecem na faixa útil de análise do analito.

Visando avaliação em escala mais próxima a análise em amostras reais que permitisse avaliação de repetibilidade e confiança, foi realizada a captura das imagens em scanner Samsung Xpress, análise da intensidade de cor através do software CorelDRAW 2018 e tratamento dos dados utilizando OriginPro 9.0 Obtendo-se a Figura 11, onde constam as imagens, os dados de média aritmética dos pixels e a curva analítica ( $y = -15,28229x + 326,433$ ).

**Figura 11** – Análise em triplicata da acidez do leite utilizando dispositivo em papel a) imagens obtidas através do scanner, b) média de pixels e em c) curva analítica.



**Fonte:** Autora, 2020.

Observa-se que a análise proporcionou variação de coloração com o aumento do pH na faixa de 6,0 a 7,0, de amarelo pardo à vermelho claro, possibilitando identificação do leite em condições normais (pH 6,6 – 6,8) do leite ácido (6,4) e básico (7,0), os pontos analisados em pH 6,4, 6,6 e 6,8 apresentam barras de erros significativas, reforçando as dificuldades do uso de papel para análise quantitativa, entretanto, o método desenvolvido proporciona a análise quantitativa da acidez do leite através de coeficiente de correlação linear de 0,99737, que é um ótimo coeficiente linear, representando uma alternativa viável, de baixo custo, prática e inovadora às análises convencionais desse parâmetro, podendo ser utilizada como teste inicial na indústria de beneficiamento de leite e resultando em economia de tempo e dinheiro na cadeia produtiva.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho desenvolveu um novo design para microdispositivo a base de papel, este design foi testado como um microdispositivo para avaliação da acidez do leite. Foram avaliados dois suportes do material base: fita adesiva e plástico. Utilizando o suporte de plástico foi possível a adição de solução indicadora e da amostra de leite sem vazamentos, gerando produto com design inovador, eficaz e com o custo inferior aos microdispositivos de papel convencionais.

Utilizou-se como indicador colorimétrico solução de alizarol (72°GL), sendo adicionada solução e a amostra do leite na mesma proporção (5 µL), permitindo avaliação qualitativa da acidez do leite através da variação das cores: amarelo – ácido, laranja claro – normal e lilás – básico.

Foram obtidas análises quantitativas eficientes para pequenas variações de pH através do uso de softwares como PhotoMetrix e CorelDRAW com coeficiente de correlação de 0,99737 desenvolvendo assim um sistema que permite a avaliação quantitativa da amostra real, demonstrando o potencial do método desenvolvido com baixo custo como alternativa aos métodos convencionais.

## **7. PERSPECTIVAS**

Realizar análises em amostras reais utilizando o método desenvolvido.

Realizar estudos da estabilidade e vida útil do dispositivo.

Promover a validação do método proposto através de ensaios com o método oficial.

## 8. REFERÊNCIAS

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 947.05. 20 ed. Rockville: 2016.

BARBIERIKOV, Z. et al. Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV / vis spectroscopy. **Dyes and Pigments**, v. 132, p. 79–93, 2016.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Edição: 230. Seção 1. p. 3, publicado em 30/03/2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Institui o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e Leite Pasteurizado Tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Edição: 230. Seção 1. p. 9, publicado em 30/11/2018.

BRASIL. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Edição: 230. Seção 1. p. 10, publicado em 30/11/2018.

BRASIL. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 1ª edição, 2017.

CALAMARI, L.; GOBBI, L.; BANI, P. Improving the prediction ability of FT-MIR spectroscopy to assess titratable acidity in cow ' s milk. **Food Chemistry**, v. 192, p. 477–484, 2016.

EMBRAPA, **Anuário do leite 2018**. 1ª Edição, Embrapa gado de leite, Brasília-DF, 2018.

ESTADO DE ALAGOAS, **Estudo sobre a pecuária leiteira em Alagoas**. Secretaria de Estado do Planejamento, Gestão e Patrimônio. – Maceió: SEPLAG, 2017. 37p.

FABRO, M. A. et al. Technical Note : Determination of Acidity in Whole Raw Milk : Comparison of Results Obtained by Two Different Analytical Methods. **Journal of Dairy Science**, v. 14005, p. 859–861, 2006.

FENIMAN, C. M.; PASINI, G.; MUCELIN, C. A. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira - PR. **Higiene Alimentar**. v. 17.n 101/105, 2003.

FU, L.; WANG, Y. Trends in Analytical Chemistry Detection methods and applications of micro fluidic paper-based analytical devices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 107, p. 196–211, 2018.

GOMES, V. et al. Colostro bovino : muito além das imunoglobulinas. **Revista Academica de Ciência Animal**, v. 15, p. 99–108, 2017.

GONZALEZ, C. et al. **UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater**. 27. ed. [s.l.] Elsevier, 2007.

HELFER, G. A. et al. A New Tool for Interpretation of Thermal Stability of Raw Milk by Means of the Alizarol Test Using a PLS Model on a Mobile Device. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2022–2028, 2018.

KANT, K. et al. Microfluidic devices for sample preparation and rapid detection of foodborne pathogens. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 1003–1024, 2018.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017.

MANUELIAN, C. L. et al. Short communication : Fourier-transform mid-infrared spectroscopy to predict coagulation and acidity traits of sheep bulk milk. **Journal of Dairy Science**, p. 1–6, 2019.

MARTINEZ, A. W. et al. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low Volume, Portable Bioassays. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.

NETO, F. P.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 16, 2011.

ORDÓÑEZ, J. A.; DÍAZ, O.; COBOS, A.; HOZ, L. Tecnologia de alimentos - Alimentos de origem animal. Vol. 2. Tradução: Fátima Murad. Porto Alegre. **Artmed**, 2005.

SANTOS, M. B., **Elaboração e caracterização de queijo de leite de cabra "tipo coalho" com inclusão de leite de vaca**. Dissertação (Ciências da nutrição) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, **A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro**. 1ª Edição. São Paulo: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2015.

SRIRAM, G. et al. Trends in Analytical Chemistry Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions : A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 212–227, 2017.

XIA, Y.; SI, J.; LI, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing : A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 774–789, 2016.