



Universidade Federal de Alagoas
Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Emitido em 14/09/2024 às 19:05

Projeto de Pesquisa

Dados do Projeto Pesquisa	
Código:	PVCA2980-2024
Título do Projeto:	Desenvolvimento e aplicação de microchip eletroforese interfaceado à detecção eletroquímica para determinação e monitoramento de resíduos de antibióticos em amostras de leite in natura de rebanho bovino do sertão e agraste de Alagoas
Tipo do Projeto:	INTERNO (Projeto Novo)
Natureza do Projeto:	Projeto de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Tipo de Pesquisa:	Pesquisa Aplicada
Situação do Projeto:	EM ANDAMENTO
Unidade de Lotação do Coordenador:	CAMPUS ARAPIRACA (11.00.43.63)
Unidade de Execução:	CAMPUS ARAPIRACA (11.00.43.63)
Centro:	CAMPUS ARAPIRACA (11.00.43.63)
Palavra-Chave:	Microchip eletroforese; Detecção Eletroquímica; Antibióticos
E-mail:	diogenes.meneses@arapiraca.ufal.br
Editais:	Editais 01 Pibic Ufal 2024-2025
Cota:	Cota Edital 01 Pibic Ufal 2024-2025 (01/09/2024 a 31/08/2025)
Objetivos de Desenvolvimento Sustentável	
3	Saúde e Bem-Estar
9	Indústria, Inovação e Infraestrutura
Área de Conhecimento, Grupo e Linha de Pesquisa	
Área de Conhecimento:	Química Analítica
Grupo de Pesquisa:	Microsistemas de Análise
Linha de Pesquisa:	Sistemas Microfluidicos
Comitê de Ética	
Nº do Protocolo:	Não possui protocolo de pesquisa em Comitê de Ética.
Resumo	
<p>Eletroforese Capilar é uma técnica de separação altamente eficiente e amplamente utilizada por diversos estudos científicos, logo, será usado nesse projeto um sistema de análise baseado em microchip eletroforese (ME), devido a facilidade de injeção e de separação de espécies de interesse através da aplicação de alta-voltagem em sistemas de microcanais sem complicações mecânicas. Detecções eletroquímicas (DE) vem sendo amplamente utilizadas nas últimas décadas, por serem versáteis, simples, rápidos, baratos, sensíveis e portáteis. Esses dispositivos são amplamente utilizados nas áreas da saúde, ambiental, alimentos, dentre outras, pois apresenta fácil manipulação e detecção de baixa concentração de analito. Com o advento das técnicas fotolitográficas possibilitou o fabrico do microchip e a integração dos de detectores eletroquímicos ao ME, adiciona-se a isso a produção de eletrodos, e tudo isso são relevantes vantagens. ME-DE é uma ferramenta fundamental para a análise de espécies químicas de interesse, em razão de requerer baixo volume de reagentes e tempo de análise, possibilidade de integração das etapas de preparação da amostra no próprio microchip. Diante do exposto, esse projeto tem como proposta o desenvolvimento e aplicação de um microsistema de análise para detecção e monitoramento de antibióticos em amostras de leite bovino in natura, usando ME-DE de resina e híbrido PDMS/vidro de duplo canal, que permitirá aplicar potenciais de detecção diferentes simultaneamente. E para avaliar a eficiência do método, os resultados adquiridos serão comparados e validados com outras metodologias, sobretudo as metodologias oficiais. Esse microdispositivo será de relevante impacto socioeconômico e favorecerá aos pequenos e médios produtores de leite do sertão e agreste alagoano.</p>	
Introdução/Justificativa	
<p>(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da UFAL em geral)</p> <p>INTRODUÇÃO Eletroforese Capilar é uma técnica de separação altamente eficiente [11], consequentemente, faz com que seja o principal método de separação escolhido para ser utilizado em sistemas de análise baseados em microchip, devido à facilidade de injeção e de separação através da aplicação de alta-voltagem em sistemas de microcanais sem complicações mecânicas. A literatura mostra que o primeiro sistema ineterfaceando a detecção eletroquímica com eletroforeses capilar de zona [12], [31] foi proposto em 1987 e a primeira miniaturização de um dispositivo, em 1979. A vantagem dos detectores eletroquímicos integrados ao microchip eletroforeses (ME) está no fato de as mesmas técnicas fotolitográficas poderem ser usado para a fabricação do microchip e do eletrodo. Das técnicas usadas para detecção eletroquímica integradas à ME é amperometria a mais largamente utilizada [24], [30]. O ME é uma ferramenta poderosa para a análise de compostos biológicos importantes. Requer baixo volume de reagentes e tempo de análise. Outro fator importante é a possibilidade de integração das etapas de preparação da amostra no chip, e a detecção eletroquímica (DE) é muito útil para esse fim, por ser seletivo e sensível, e os eletrodos podem ser microfabricados [25]. A maioria dos estudos utilizando ME-DE emprega um único eletrodo de trabalho colocado no canal de separação. Ele pode ser muito tedioso para executar e é impossível obter bons</p>	

dados voltamétricos para espécies transitórias. Uma abordagem alternativa para obter informações potenciométricas para um analito é a utilização de um detector de múltiplos eletrodos em que cada eletrodo é fixado a um potencial diferente. Esta abordagem é mais complicada, mas faz com que seja possível controlar vários potenciais diferentes simultaneamente [24], [21].

Sulfametoxazol (SMX) é um antibiótico sulfonamida [1] de amplo espectro que inibe competitivamente a enzima bacteriana dihidropteroato sintetase [3], já a trimetoprima (TMP) é um inibidor da diidrofolato-redutase. Em medicamentos veterinários, o TMP é comumente administrado em combinação com uma sulfonamida [8]. Ambas os fármacos bloqueiam o metabolismo do ácido fólico e produzem uma atividade antibacteriana sinérgica. Assim, SMXTMP é comumente usado em gado leiteiro para tratamento ou prevenção de infecções respiratórias e mastite [14], [22], porém, seu uso pode levar à presença de resíduos indesejados no leite, seus derivados e na carne [2], [5], [7]. E o consumo de alimentos contaminados com esses fármacos, estando com o limite máximo de resíduos (LMR) acima do permitido por regulamentação, podem causar sérios problemas de saúde, como deficiência de folato, insuficiência renal, síndrome de Stevens-Johnson, anafilaxia, angiodema, agranulocitose, trombocitopenia e indução de resistência em cepas de bactérias patogênicas [28], [29]. Assim, é de suma importância desenvolvimento de metodologias para o monitoramento constante dessas espécies em alimentos como leite, seus derivados e carnes de bovinos.

No Brasil, é estabelecido programa de monitoramento para determinar os níveis de sulfonamida em carnes, mel e leite, e o LMR no leite foi fixado em 100 µg/g de sulfonamidas totais/kg, o qual é o mesmo valor exigido nos EUA através da FDA. A Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos estabeleceu 50 µg/kg como LMR de TMP em carne e leite [14].

Esse projeto tem como proposta desenvolver e aplicar metodologias analíticas para detecção e monitoramento de SMX e TMP utilizando ME-DE híbrido PDMS/vidro e de resina e configuração de duplo canal de separação para detecções simultâneas e usando potenciais diferentes, podendo ainda ser utilizado para determinar espécies redutoras e oxidantes simultaneamente. O sistema desenvolvido será aplicado em amostras de leite bovino in natura em coletado na região agreste e sertão de Alagoas. E para avaliar validar a eficiência do método, os resultados adquiridos serão comparados com outras metodologias, sobretudo metodologias oficiais.

JUSTIFICATIVA

A produção de leite movimenta a economia do estado de Alagoas e é fonte de renda de vários produtores. Foram produzidos em 2020 cerca 615,2 milhões de litros, que renderam R\$ 955,7 milhões, segundo o IBGE e dados da Agência Alagoas. Alagoas possui hoje cerca de 250 mil vacas e é considerada a maior produtividade do Nordeste e a quinta maior por animal ordenhado do país. Outro fator importante em Alagoas é a produção de leite feita por produtores familiares de leite, cerca de 32.000 produtores.

E para garantir uma produção de leite nessas proporções, faz-se necessário o uso de diversas categorias de medicamentos veterinários visando o controle de doenças, como infecções respiratórias e mastite que interferem no desempenho reprodutivo e na produção do leite, um exemplo típico é o tratamento de enfermidades por meio do uso de antibióticos,

que apesar de serem utilizados visando benefícios, podem gerar resíduos e promover má qualidade do leite comercializado e comprometer a saúde do consumidor. E mesmo com adesão de programas de boas práticas de fabricação atreladas a incentivos monetários pelos produtores, em muitos casos, são encontradas quantidades de resíduos de antibiótico acima do limite máximo recomendado, mesmo pós industrializados. No Brasil, é estabelecido programa de monitoramento para determinar os níveis de sulfonamida em carnes, mel e leite, e o limite máximo de resíduos (LMR) no leite é fixado em 100 µg/g de sulfonamidas totais/kg, o qual é o mesmo valor exigido nos EUA através da FDA. A Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos estabelece 50 µg/kg como LMR de trimetoprima em carne e leite.

O consumo de leite e seus derivados contaminados com antibióticos, como as sulfametoxazol e trimetoprima, que são objeto de estudo desse projeto, com o LMR acima do supramencionado podem causar sérios problemas à saúde humana, como deficiência de folato, hiperpotassemia, insuficiência renal, exantema, síndrome de Stevens-Johnson, anafilaxia, angiodema, cristalúria, oligúria, anúria, agranulocitose, trombocitopenia, anemia hemolítica, neurite periférica e indução de resistência em cepas de bactérias patogênicas. Assim, por motivos de saúde pública e econômico, a busca por técnicas e metodologias analíticas que sejam versáteis, simples, rápidas, baratas, sensíveis e portáteis tem sido cada vez mais necessária. E esse projeto propõe o desenvolvimento e aplicação de uma ferramenta alternativa extremamente eficaz para determinar e monitorar sulfametoxazol e trimetoprima em leite bovino in natura, um microchip eletroforese interfaceado à detecção eletroquímica, pois apresenta vantagens, tais como: simplicidade de instrumentação; custo relativamente baixo; economia no consumo de amostras e reagentes (~ 100 µL / amostragem); análises rápidas (~ 1 min / amostragem) e práticas devido à injeção das amostras automatizadas por programas de computador já pré-estabelecidos; possibilidade de tratamento de amostras em linha; dispersão controlada da amostra injetada; possibilitar separação de espécies; técnica de elevada versatilidade; alta reprodutibilidade de eventos; elevada repetitividade de sinal; excelente sensibilidade (~ fM, dependendo das espécies, do potenciostato e da metodologia aplicada) e precisão; detecção de espécies instáveis e transientes. Essas vantagens fazem com que esta linha de pesquisa tenha um crescimento exponencial comprovado pelas publicações encontradas em jornais como Journal Lab-on-Chip.

Para alcançar os propósitos deste projeto serão otimizados os parâmetros experimentais, levando em consideração a separação eletroforética das espécies através da aplicação de alta-voltagem e detecção eletroquímica e diagnóstico colorimétrica. Posteriormente, serão definidos os parâmetros analíticos do procedimento proposto, e sua eficácia será avaliada e validado comparando-se os resultados obtidos nas análises das amostras reais (leite bovino in natura do agreste e sertão alagoano) com os revelados através de método oficial.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo desenvolver e aplicar um microsistema de análise baseado em eletroforese e com detecção eletroquímica para determinação e monitoramento de antibióticos em amostras de leite in natura em rebanhos bovinos, na região do agreste e sertão de Alagoas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o sistema de análise e validar a metodologia desenvolvida e proposta através de métodos padrões oficiais.

Comparar os resultados adquiridos com a metodologia proposta com outras metodologias, sobretudo por espectrofotometria e eletroforese capilar;

Confeccionar os eletrodos de trabalho de Pt, carbono pirrolisado e Hg;

Construção dos microdispositivos eletroforeses de PDMS/Vidro e resina;

Desenvolver e aplicar um spot test do tipo µPAD com impressora de jato de cera para testes

qualitativos iniciais de antibióticos em leite in campo
Empregar o sistema proposto em amostras de leite bovino in natura, para determinação e monitoramento de resíduos dos antibióticos sulfametoxazol (SMX) e o trimetoprima (TMP) utilizados no tratamento de infecções respiratórias e mastite de rebanho bovino;
Otimizar o posicionamento dos eletrodos de trabalho nos canais para avaliar a necessidade de um desacoplador, o potencial dos eletrodos de trabalho em cada canal, a performance de separação, e a relação sinal/ruído;
Realizar estudos de extração, do tipo QuEChERS, dos antibióticos da amostra de leite in natura para análise.

Metodologia

Este projeto foi escrito considerando seu desenvolvimento em um período de dois anos por um aluno de pós-graduação, em nível de doutoramento ou mestrado, na área de Química e Biotecnologia (PPGQB/UFAL) e Materiais (PPGMateriais), e quatro alunos em nível de graduação (PIBIC/UFAL). Haverá colaborações: com a University of Kansas, USA, através da professora doutora Susan Marie Lunte (Research Centers - Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Higuchi Biosciences Center, Director of R.N. Adams Institute for Bioanalytical Chemistry KU USA); com a Universidade Estadual de Campinas, através do professor doutor José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP); com o Instituto Federal de Alagoas (IFAL) através do professor doutor Phabyanno Rodrigues Lima (MARECHAL/IFAL); com a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul com o professor doutor Bruno Gabriel Lucca (IQ/UFMS); e com outras unidades acadêmicas dessa IES através dos professores doutores Marcos Vinícius Dias Vermelho (IF/IFAL), Anielle Christine Almeida Silva (IF/IFAL) e Fabiane Caxico de Abreu (IQB/UFAL).

Inicialmente será feito um estudo do design dos canais do microchip usando o COMSOL Multiphysics, em parceria com o Prof. Dr. Marcos Vinícius Dias Vermelho e Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva, que é um simulador dos prováveis efeitos físicos e químicos que ocorrerão na prática, tais como a interação do fluido com a estrutura dos canais, acoplamento eletroquímico, piezoelectricidade, campo eletromagnético, reações químicas, transferência de calor e fluxo do fluido.

Após os estudos realizados no COMSOL, serão feitos os moldes para a modelagem dos chips de PDMS e as bases de vidro para as confecções dos três tipos de microeletrodos, que serão de platina, de carbono pirolisado e de mercúrio, em colaboração com a Profa. Dra. Susan M. Lunte (The University of Kansas -USA), Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu (IQBPPGQB-UFAL) e Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP). Os microchips eletroforese híbrido de PDMS/Vidro e os microeletrodos de platina, carbono pirolisado e mercúrio serão construídos por processo fotolitográfico conforme literatura já bem descrita e dominada pelo grupo da Profa. Susan Lunte. Brevemente, o fotorresiste negativo SU-8 10 (para os canais eletroforéticos) será revestido por rotação em um wafer de Si de 100 mm para uma espessura de 15±1 m usando um revestidor de rotação 100 Cee. A máscara (wafer) será então transferido para uma chapa quente programável para assar suavemente a 65 °C durante 2 minutos e depois a 95 °C durante 5 min. Os designs dos canais microfluídicos serão criados usando um AutoCad LT 2004 e impresso em um filme de transparência com uma resolução de 50.000 dpi. O wafer revestido será coberto com máscara de filme de transparência e expostas a 344 mJ/cm² utilizando uma fonte de UV de fluxo i-line. Após a exposição à radiação UV, o wafer será pós-cozido a 65 °C durante 2 min e 95 °C durante 10 min. O wafer será, então, desenvolvido em SU-8 revelador, lavado com álcool isopropílico (IPA), e secado sob atmosfera de Nitrogênio. Um último "hard bake" será realizado a 175 °C durante 2 h. A espessura do fotorresiste aumentado (levantado), o que corresponde à profundidade dos canais de PDMS, será medida com um perfilador de superfície. As microestruturas de PDMS serão feitas por moldagem de uma mistura 10:1 de PDMS elastômero e agente de cura, respectivamente, sobre a master modelador de Si. Já a fabricação dos eletrodos de carbono de filme fotorresistente pirolisado (PPF) será feita da seguinte maneira, resumidamente, o fotorresiste positivo AZ-151& será depositado em uma placa de vidro de quartzo limpa (2,5 x 4 polegadas) usando o spin coater Cee 100 a 100 rpm por 10 s. O spin coater será aumentado para 2000 rpm e mantido por 20 s. A placa revestida será então cozida por 3 min a 100°C em uma placa quente. A placa de vidro revestida será coberta com uma fotomáscara positiva que contenha as características do eletrodo e exposta à luz UV (15 mW/cm²) por 13 s. A placa será revelada usando revelador AZ 300 MIF e enxaguada com água NANOpura, seguida de secagem com gás nitrogênio. A placa com o recurso fotorresistente será pós-cozida a 100 °C por 10 min e, em seguida, colocado dentro de um forno tubular Linden-Blue 3 Zone (Cole-Palmer, Vernon Hill, IL, EUA) sob fluxo de gás nitrogênio de 5 psi. A temperatura do forno será aumentada da temperatura ambiente para 925°C a uma taxa de 5,5°C/min e mantida a 925°C por 1 hora. As dimensões finais dos eletrodos nas placas de vidro foram de 35 μm de largura e 420-480 nm de altura, que será determinada por um perfilômetro óptico Profil3D (Filmetrics, San Diego, CA, EUA). Os eletrodos de platina serão fabricados de forma semelhante. Constituirá de uma camada de adesão de 200 Å de Ti seguido por uma camada de 2000 Å de Pt depositado em um substrato de vidro. O fotorresiste positivo (AZ 1518) será dinamicamente aplicado à placa de vidro com revestimento de Pt a 100 rpm durante 5 s. A rotação do coater será então realizada em rampa até uma velocidade final de 3500 rpm e mantido por 30 s para produzir um fotorresiste de espessura de 2,0 - 2,2 m. O fotorresiste será suavemente cozido a 100 °C durante 2 min e, em seguida, exposto a 86 mJ/cm² usando uma fonte de inundação UV inline e a máscara de uma transparência adequada. Após a exposição, a placa será desenvolvida durante 30 s em revelador 300 MIF e em seguida enxaguadas completamente com 18,2 M-cm água NANOpura e secada com gás nitrogênio. Em seguida um cozimento rígido final será realizado a 100 °C durante 10 min e a platina metálica em excesso será removida por imersão em água régia a 85 °C durante 30 s e o titânio metálico, também, é removido por imersão da placa de Ti em produto corrosivo realizada a 95 °C durante 45 s. Após a conclusão do processo de corrosão do metal, o fotorresiste remanescente será removido por lavagem da placa com acetona, seguido de isopropanol (IPA), e secou-se com gás nitrogênio. Por último será feito o terceiro eletrodo em estudo que é o de mercúrio por eletrodeposição em eletrodos de platina.

O uso de impressoras 3D vem sendo recentemente explorado na ciência para fabricação de diferentes dispositivos analíticos. A utilidade da impressão 3D em química analítica abrange uma ampla gama de tópicos, como evidenciado pelo número de aplicações publicadas na literatura. A seleção do tipo de impressora que melhor atenderá a aplicação específica depende dos requisitos do objeto impresso final, especificamente, biocompatibilidade do material, resistência, composição, rugosidade da superfície e dimensões dos recursos [10], [13], [15], [16], [19]. Assim, será proposto e fabricado, também, microchip de resina com detecção eletroquímica utilizando impressora 3D de resina com tecnologia SLA ou LCD com fonte de luz de 120W, na tentativa de baratear todo o processo de construção do microsistema de análise e torná-lo mais acessível para os pequenos produtores de leite, em colaboração com os professores doutores Bruno Gabriel Lucca (IQ/UFMS) e Phabyanno Rodrigues Lima (MARECHAL/IFAL). Uma vez já confeccionados os moldes e eletrodos, será feita o interfaceamento do bipotenciostato com a fonte de alta-tensão para automatizar as aplicações eletroforéticas, em

seguida a construção do microchip eletroforese híbrido PDMS/vidro e de resina, serão integrado ao detector para a realização de testes preliminares, tais como aplicação de voltametria cíclica usando Ferri-Ferro para observar as respostas eletroquímicas nos eletrodos, com o auxílio de um microscópio verificar se existem imperfeições nos microcanais de PDMS, caracterização eletrocínico dos canais microfluídico para observar a simetria nas injeções de amostra, testes simples com cátions para observar a eficiência de separação do sistema, dentre outros.

A próxima etapa será o estudo de separação eletroforética dos antibióticos, uma vez que será determinado os dois fármacos simultaneamente. Dentre os antibióticos utilizados mais largamente em rebanho bovino e possuem processo redox, conseqüentemente tornam-se viáveis a aplicação do sistema eletroforético com detecção eletroquímica, são o sulfametoxazol (SMX) e o trimetoprima (TMP). O estudo será feito a partir do comportamento eletroquímico e separação eletroforética deles em meio tamponado.

Cumprindo as etapas estabelecidas acima, a próxima etapa do projeto será a otimização dos parâmetros experimentais, visando alcançar as melhores condições de análise. Esta etapa será realizada empregando o método de comparação univariado, ou seja, será avaliado um parâmetro por vez e mantendo os demais fatores experimentais constantes. Seja físico, como por exemplo temperatura ideal, potencial aplicado nos eletrodos de trabalho a partir de voltametrias hidrodinâmicas das espécies propostas, o posicionamento dos eletrodos de trabalho em relação à saída do canal de separação, a alta-voltagem aplicada nos canais de separação para o procedimento eletroforético otimizando a performance da separação das espécies analisadas; ou químico, como por exemplo a escolha da melhor solução tampão como eletrólito suporte e seu pH, concentração dos reagentes padrão assim como seu volume a partir da injeção da amostra. Em seqüência, e diante das condições experimentais otimizadas, os parâmetros analíticos serão definidos, visando caracterizar analiticamente o procedimento desenvolvido. Assim, serão determinados: relação sinal/ruído, limites de detecção e quantificação, linearidade, faixa de trabalho, frequência de amostragem, repetitividade, reprodutibilidade, robustez, dentre outros.

Irá ser feito também um estudo avaliativo do uso de duplo e simples canal e da eficiência dos resultados entre os três tipos de eletrodos, platina, carbono pirolisado e mercúrio, para realizar análises de amostras reais.

A penúltima etapa desse projeto será direcionada para o tratamento da amostra, a qual é tão importante quanto o desenvolvimento do microsistema de análise, pois é necessário ter certeza que será determinada a quantidade, de forma representativa, dos fármacos na amostra. Assim será avaliado o QuEChERS como método de extração, pois vem sendo considerada uma promissora metodologia na extração de diversos compostos em matrizes alimentícias. E para validar este método de extração será com posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos, para a determinação dos antibióticos em leite bovino in natura. Nesse método, a acetoneitrila é utilizada para extração dos analitos e precipitação das proteínas, com remoção da água e separação de fases por salting out com sulfato de magnésio e cloreto de sódio.

Posteriormente, o extrato é submetido à etapa de clean up por EFS dispersivo usando PSA (amina primária e secundária) e analisado, porém, em análise de matrizes de origem animal, alterações têm sido propostas como a adição de ácido acético e Na₂EDTA à acetoneitrila e substituição do cloreto de sódio por acetato de sódio. Após a etapa de centrifugação, os extratos são diluídos com metanol, acidificados com ácido fórmico [4], [23]. Após a extração será feita a detecção direta no ME-DE. Frise-se que será feito o estudo de recuperação para o método de extração proposto e validado por métodos oficiais.

Portanto, nessa etapa do projeto, após a plena otimização do sistema proposto, serão feitas as coletas das amostras de leite in natura através de pequenos e médios produtores na região do agreste e sertão de Alagoas.

A eficácia do método será comprovada através de dois testes:

- Comparação dos resultados obtidos nas análises das amostras reais com o procedimento proposto e os revelados através de métodos oficiais;
- Teste de recuperação de padrão;

Por fim, elaborar relatórios parciais e final para fins de validação do procedimento proposto e publicar os resultados alcançados nesse projeto em jornais especializados em âmbito nacional e/ou internacional.

RESULTADOS ESPERADOS

Este projeto faz parte da interação com a pesquisadora Susan M. Lunte (Universidade of Kansas USA), referência internacional nessa área, resultado de realização do doutorado sandwich do coordenador deste projeto. Esta interação já permitiu a publicação de artigos em revistas de conceito internacional e apresentação de trabalhos versando sobre a utilização de sistemas microfluídicos para análises de compostos do estresse oxidativo.

Como resultado deste projeto, espera-se desenvolver e aplicar uma metodologia analítica alternativa, eficaz, prática, de baixo custo e pouca geração de resíduos tóxicos, para a determinação e, conseqüente monitoramento, de resíduos dos antibióticos trimetoprima e sulfametoxazol em amostra de leite in natura de bovinos do sertão e agreste de Alagoas. Acredita-se que com o êxito do desenvolvimento e aplicação desse microdispositivo, após devidas validações, irá ajudar aos pequenos e médios produtores de leite do nosso Estado no monitoramento constante da provável contaminação e, conseqüentemente, poder tomar iniciativas de aumentar o tempo de isolamento do rebanho até que os resíduos dos antibióticos estejam em concentração permitidas por agências de saúde e órgãos de fiscalização antes da comercialização desse produto.

E espera-se que os microdispositivos desenvolvidos também possam ser aplicados para a quantificação desses analitos em outras matrizes de interesse, como os derivados de leite. Outros impactos seriam ainda: transferência de conhecimentos adquiridos ao longo do projeto em outras aplicações no setor e fora dele: novos produtos, serviços, patentes, e possibilidade de criar uma empresa incubada dentro do programa INCUBAL.

Desenvolvimento de novo produto de baixo custo que poderá ser comercializado, além de se obter novas Parcerias com empresas interessadas da área de laticínios, da saúde e da indústria de alimentos. Ainda há a possibilidade de realização de novos projetos/contratos, inclusive no desenvolvimento de novos materiais.

O produto poderá ser difundido através da comercialização em forma de microdispositivo de análises descartáveis, com base de PDMS e resina, e a análise será realizada através da confecção de microchip eletroforese com transdutor eletroquímico.

Com a concretização dessa proposta e após a sua validação analítica seguindo as normas estabelecidas na legislação e regulamentação nacional e internacional, buscar-se-á reduzir o custo das análises de tais fármacos possibilitando um monitoramento periódico e constante do leite in natura dos rebanhos bovinos dos pequenos e médios produtores de leite do sertão e agreste de Alagoas; buscar-se-á convênios com Prefeituras Municipais e o Governo do Estado de Alagoas através das Secretarias Municipal e Estadual correspondentes, os quais poderão contribuir com o financiamento do trabalho educativo junto aos produtores de leite quanto aos riscos e impactos gerados pela contaminação do leite pelos antibióticos e como fazer para evitar tal problema.

Referências

- AGARWAL, V. K. Application of solid-phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 16, p. 3793-3799, 1993.
- AGUILERA-LUIZ, M. M.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Multiresidue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1205, p. 10-16, 2008.
- ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; TIGLEA, P.; SABINO, M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 1587-1592, 2007.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International*, v. 86, p. 412-431, 2003.
- ANGELA, MATILDE DA SILVA ALVES ; PABLO, HENRIQUE DE SOUZA LIMA ; MARIO, ALBERTO SANTOS DA COSTA ; CRISTIAN, BERNARDO DA SILVA ; JONAS, DOS SANTOS SOUSA ; DANIELLE, DOS SANTOS TAVARES PEREIRA ; PHABYANNO, RODRIGUES LIMA ; JOHNNATAN, DUARTE DE FREITAS . Determination of aflatoxin M1 in bovine milk from the Alagoas/Brazil State dairy belt by high performance liquid chromatography (HPLC). *AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH*, v. 12, p. 580-586, 2018.
- AZOFRA, R. D.; SARABIA, L. A.; ORTIZ, M. C. Optimization of a solid-phase extraction procedure in the fluorimetric determination of sulfonamides in milk using second-order advantage of PARAFAC and D-optimal design. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 396, p. 923-935, 2010.
- BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 2, p. 69-73, 2001.
- BOHM, D. A.; STACHEL, C. S.; GOWIK, P. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8217- 8223, 2009.
- Caruso, G., et al., Microfluidics as a Novel Tool for Biological and Toxicological Assays in Drug Discovery Processes: Focus on Microchip Electrophoresis. *Micromachines*, 2020. 11(6): p. 28.
- CARVALHO, RAYAN MARCEL ; FERREIRA, VALDIR SOUZA ; LUCCA, BRUNO GABRIEL . A novel all-3D-printed thread-based microfluidic device with an embedded electrochemical detector: first application in environmental analysis of nitrite. *Analytical Methods*, v. 13, p. 1349-1357, 2021.
- CAXICO DE ABREU, FABIANE; COSTA, ELTON ELIAS M. . Electrochemical Detection Using an Engraved Microchip - Capillary Electrophoresis Platform. *Electroanalysis (New York, N.Y.)*, v. 28, p. 1-6, 2016.
- COSTA, BRENDA MARIA DE CASTRO ; GRIVEAU, SOPHIE ; D'ORLYE, FANNY ; BEDIQUI, FETHI ; da Silva, José Alberto Fracassi ; VARENNE, ANNE . Microchip electrophoresis and electrochemical detection: A review on a growing synergistic implementation. *ELECTROCHIMICA ACTA*, v. 391, p. 138928, 2021.
- COSTA, BRENDA M. C. ; COELHO, ALINE G. ; BEAUCHAMP, MICHAEL J. ; NIELSEN, JACOB B. ; NORDIN, GREGORY P. ; WOOLLEY, ADAM T. ; da Silva, José A. F. . 3D-printed microchip electrophoresis device containing spiral electrodes for integrated capacitively coupled contactless conductivity detection. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, v. 414, p. 545-550, 2021.
- DAMASCENO, V. S.; SILVA, F. M.; SANTOS, H. C. A. S. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda do Sul de Minas Gerais. *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, n. 11, p. 91409-91421, Nov. 2020.
- DA SILVEIRA, GÉSSICA DOMINGOS ; QUERO, REVERSON FERNANDES ; BRESSAN, LUCAS PAINES ; BONACIN, JULIANO ALVES ; de Jesus, Dossil Pereira ; da Silva, José Alberto Fracassi . Ready-to-use 3D-printed electrochemical cell for in situ voltammetry of immobilized microparticles and Raman spectroscopy. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, v. 1141, p. 57-62, 2021.
- DE C. COSTA, BRENDA M. ; GRIVEAU, SOPHIE ; BEDIQUI, FETHI ; ORLYE, FANNY D? ; DA SILVA, JOSÉ ALBERTO F. ; VARENNE, ANNE . Stereolithography based 3D-printed microfluidic device with integrated electrochemical detection. *ELECTROCHIMICA ACTA*, v. 407, p. 139888, 2022.
- DE FRANÇA, CAIO CÉSAR LIMA ; MENESES, DIÓGENES ; SILVA, ANIELLE CHRISTINE ALMEIDA ; DANTAS, NOELIO OLIVEIRA ; DE ABREU, FABIANE CAXICO ; PETRONI, JACQUELINE MARQUES ; LUCCA, BRUNO GABRIEL . Development of novel paper-based electrochemical device modified with CdSe/CdS magic-sized quantum dots and application for the sensing of dopamine. *ELECTROCHIMICA ACTA*, v. 367, p. 137486, 2021.
- DUARTE JUNIOR, GERSON FRANCISCO ; ISMAIL, ABDULGHANI ; GRIVEAU, SOPHIE ; D'ORLYE, FANNY ; Fracassi da Silva, Jose Alberto ; Coltro, Wendell Karlos Tomazelli ; BEDIQUI, FETHI ; VARENNE, ANNE . Integrated microfluidic device for the separation, decomposition and detection of low molecular weight S nitrosothiols. *ANALYST*, v. 144, p. 180-185, 2018.
- FERREIRA, PRISCILA ALVES ; DE OLIVEIRA, FABIANO MENDONÇA ; DE MELO, EDMAR ISAIAS ; DE CARVALHO, ADRIANA EVARISTO ; LUCCA, BRUNO GABRIEL ; FERREIRA, VALDIR SOUZA ; DA SILVA, RODRIGO AMORIM BEZERRA . Multi sensor compatible 3D printed electrochemical cell for voltammetric drug screening. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, v. 1169, p. 338568, 2021.
- GUIMARÃES F. JÚNIOR, JOSE ; ROBERTO BARBOSA DE LIMA, ALLYSSON ; JOHN DUARTE DE FREITAS, ALAN ; DUARTE DE FREITAS, JOHNNATAN ; RODRIGUES LIMAD, PHABYANNO ; CAXICO DE ABREU, FABIANE ; MENESES, DIOGENES . Paper based device (PAD) for colorimetric determination of ranitidine in Pharmaceutical Samples. *MICROCHEMICAL JOURNAL*, v. 178, p. 107336, 2022.
- Gunasekara, D.B., et al., Evaluation of dual electrode configurations for microchip electrophoresis used for voltammetric characterization of electroactive species. *Analyst (2020)*, 145(3) 865-872
- HAUBERT, L. ET AL. First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfg* and transposon family Tn916-1545. *Microbial Pathogenesis, International Journal of Antimicrobial Agents* vol. 113, p. 242247. Dec. 2017.
- LEHOTAY, S. J. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues. In: VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. (Eds.). *Methods in biotechnology*. Totowa: Humana Press, 2005. v. 19, p. 239-261.
- LUNTE, S. M. ; GUNASEKARA, D. B. ; PICHETSURNTORN, PANN ; MENESES, D. . DUALCHANNEL DUAL-ELECTRODE MICROCHIP ELECTROPHORESIS WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION FOR VOLTAMMETRIC IDENTIFICATION OF CELLULAR NITROSATIVE AND OXIDATIVE STRESS MARKERS. *Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, v. 18, p. 39-41, 2014.
- José A. F. ; DE ABREU, FABIANE C. ; Lunte, Susan M. . Evaluation of in-channel

amperometric detection using a dual-channel microchip electrophoresis device and a two-electrode potentiostat for reverse polarity separations. Electrophoresis (Weinheim. Print), v. 36, p. 441-448, 2015.

PETRONI, JACQUELINE MARQUES ; NEVES, MATHEUS MENEGUEL ; CANHETE DE MORAES, NATALIA ; BEZERRA DA SILVA, RODRIGO AMORIM ; FERREIRA, VALDIR SOUZA ; LUCCA, BRUNO GABRIEL . Development of highly sensitive electrochemical sensor using new graphite/acrylonitrile butadiene styrene conductive composite and 3D printing-based alternative fabrication protocol. ANALYTICA CHIMICA ACTA, v. 1167, p. 338566, 2021.

PETRONI, J. M.; Lucca, B. G.; Ferreira, V. S. Simple approach for the fabrication of screenprinted carbon-based electrode for amperometric detection on microchip Electrophoresis. Analytica Chimica Acta, v. 954, p. 8896, 2017.

POGURSCHI, Elena et al. Identification of Antibiotic Residues in Raw Milk Samples Coming from the Metropolitan Area of Bucharest. Agriculture and Agricultural Science Procedia, v. 6, n. 2015, p. 242245, 2015.

RAMA, Adem et al. Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo. Journal of Food and Drug Analysis, v. 25, n. 3, p. 525532, 2017.

Schilly, K.M., et al., Biological applications of microchip electrophoresis with amperometric detection: in vivo monitoring and cell analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020. 412(24): p. 6101-6119.

Weerasekara D.B. and Lunte, S.M., Separation and Detection of Tyrosine and Phenylalanine-derived Oxidative Stress Biomarkers Using Microchip Electrophoresis with Electrochemical Detection, Electroanalysis. (2021)

ZHANG, Ying et al. Aptamer-modified sensitive nanobiosensors for the specific detection of antibiotics. Journal of Materials Chemistry B, [s. l.], v. 8, n. 37, p. 86078613, 2020.

Membros do Projeto

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Tipo de Participação
072.817.504-55	ADEILDO JUNIOR DE OLIVEIRA	SERVIDOR	2	COLABORADOR(A)
957.918.684-72	AILTON SOARES DA SILVA	DISCENTE	4	COLABORADOR(A)
014.782.371-47	BRUNO GABRIEL LUCCA	EXTERNO	2	COLABORADOR(A)
024.132.984-10	DIOGENES MENESES DOS SANTOS	DOCENTE	8	COORDENADOR(A)
048.699.694-83	ELVIS MAX XAVIER DE LIMA	DISCENTE	4	COLABORADOR(A)
460.304.255-87	FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO	DOCENTE	2	COLABORADOR(A)
091.897.294-98	JOSÉ GUIMARÃES FERREIRA DE LIMA JÚNIOR	EXTERNO	4	COORDENADOR(A) ADJUNTO(A)
023.046.054-27	LIBEL PEREIRA DA FONSECA	DISCENTE	2	COLABORADOR(A)
633.233.204-25	MARCELO CAPISTRANO COSTA	SERVIDOR	2	COLABORADOR(A)
094.301.064-06	NICHOLAS DEYMISSON DOS SANTOS	DISCENTE	4	COLABORADOR(A)
039.713.224-76	PHABYANNO RODRIGUES LIMA	EXTERNO	2	COLABORADOR(A)

2024

Atividades	Set	Out	Nov	Dez
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA				
ESCOLHA E DESENVOLVIMENTO DO LAYOUT DO DISPOSITIVO.				
REVISÃO DO MÉTODO DE DE DETECÇÃO E MODIFICAÇÃO DO DISPOSITIVO COM AUNPS.				
FINALIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DISPOSITIVO.				
VALIDAÇÃO DO DISPOSITIVO A PARTIR DE EXPERIMENTOS.				
TRATAMENTO E ABERTURA DA AMOSTRA				
APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.				
RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL				
PUBLIÇÃO EM REVISTAS ESPECIALIZADAS				

2025

Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA								
ESCOLHA E DESENVOLVIMENTO DO LAYOUT DO DISPOSITIVO.								
REVISÃO DO MÉTODO DE DE DETECÇÃO E MODIFICAÇÃO DO DISPOSITIVO COM AUNPS.								
FINALIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DISPOSITIVO.								
VALIDAÇÃO DO DISPOSITIVO A PARTIR DE EXPERIMENTOS.								
TRATAMENTO E ABERTURA DA AMOSTRA								
APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.								
RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL								
PUBLIÇÃO EM REVISTAS ESPECIALIZADAS								

Avaliações do Projeto

Situação/Parecer	Data da Avaliação	Média
AVALIAÇÃO REALIZADA O projeto está financiado por uma agência de fomento e já foi avaliado previamente.	04/06/2024	10.0

Histórico do Projeto

Data	Situação	Usuário
------	----------	---------

03/04/2024	GRAVADO	DIOGENES MENESES DOS SANTOS / 02413298410
06/04/2024	SUBMETIDO	DIOGENES MENESES DOS SANTOS / 02413298410
14/05/2024	DISTRIBUIÇÃO PARA AVALIAÇÃO (MANUALMENTE)	BERENICE CORREIA COSTA PIMENTEL / 41149025468
09/08/2024	APROVADO	BERENICE CORREIA COSTA PIMENTEL / 41149025468
05/09/2024	EM ANDAMENTO	DIOGENES MENESES DOS SANTOS / 02413298410

Documento emitido por: DIOGENES MENESES DOS SANTOS