UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Desenvolvimento de um teste rápido microfluídico para detecção de
sulfonamidas em leite a partir de ensaios colorimétricos**

Aluna: Ana Carolina Rafanhin Sousa
Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos
2016

ANA CAROLINA RAFANHIN SOUSA

Desenvolvimento de um teste rápido microfluídico para detecção de sulfonamidas
em leite a partir de ensaios colorimétricos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para a obtenção do título de mestre em
Química Analítica e Inorgânica.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2016

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nilcéia e José Augusto, e
ao meu irmão, André, por todo apoio,
compreensão e auxílio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, por todos os momentos de intuição, pela saúde e por me possibilitar conduzir essa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, pela oportunidade de trabalho, por toda orientação, aprendizagem, confiança, auxílio e compreensão.

Aos meus pais, José Augusto e Nilcéia, e ao meu irmão, André, por todo apoio, incentivo, por toda compreensão e ajuda em todos os momentos. Agradeço a vocês pela pessoa que sou e por tudo que conquistei.

À Ana Carolina Urbaczek, pela amizade, compreensão e ajuda nos momentos difíceis.

A todos os membros do Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações (BioMicS).

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do IQSC e da USP.

A todos que me acompanharam, apoiaram e ajudaram nesses sete anos em São Carlos.

RESUMO

O uso de antibióticos em animais de produção pode ser ministrado de diferentes formas: *i)* como método de prevenção de doenças, *ii)* como tratamento e combate de doenças como mastite, infecções respiratórias, genitais e oftálmicas, e *iii)* aplicados às rações, a fim de aumentar o ganho de peso, promovendo também a eficiência de aproveitamento dos alimentos e tornando menores os índices de morbidez e mortalidade. No entanto, alguns produtores utilizam os antibióticos de forma inadequada, ministrando o mesmo em dosagens superiores às recomendadas ou até mesmo adicionando os antibióticos diretamente no leite, a fim de inibir o crescimento indesejável de bactérias, o que pode causar graves riscos à saúde humana. Uma das maneiras de se detectar resíduos de antibióticos (sulfonamidas) em leite é a partir da reação enzimática entre a anidrase carbônica e um éster (4-nitrofenil acetato), que gera uma coloração amarelo brilhante. As sulfonamidas inibem tal reação, impedindo o surgimento de cor. Dispositivos microfluídicos fabricados em papel (μ PAD) foram desenvolvidos como um novo método simples, rápido, portátil e de baixo custo, a fim de se detectar a presença ou ausência das três principais sulfonamidas (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol), como exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A imobilização de uma fina camada uniforme de pasta de metil celulose, nos *spots* dos microdispositivos, permitiu maior estabilidade na superfície reacional do papel, de forma a alcançar limites de detecção (LOD) menores, equivalentes a $2,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($7,79 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) para a sulfametazina, $2,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($8,37 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) para a sulfadimetoxina e $2,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($6,38 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) para o sulfatiazol. O método apresentou, como principal vantagem, a análise das amostras de leite bovino sem qualquer tratamento prévio. Além disso, o método apresentou boa linearidade e repetitividade nos ensaios realizados intra-dia e inter-dia, além de se mostrar seletivo para compostos da classe das sulfonamidas, mostrou-se também robusto com relação a alterações na temperatura do leite bovino. Dessa forma, o teste pode ser transportado para a área rural, sem a necessidade de um profissional especializado, a fim de se obter um diagnóstico local rápido, simples e de baixo custo, para a qualidade do leite.

ABSTRACT

The use of antibiotics in animal production can be delivered in different ways: *i*) as a method of preventing disease in animals, *ii*) as treatment and combat diseases such as mastitis, respiratory infections, genital infections and ophthalmic infections, and *iii*) applied to the feed in order to increase the weight gain of the animals, promoting the efficiency of food utilization, and making lower the morbidity and mortality. However, some producers use antibiotics improperly, administering it in doses higher than those recommended or even directly adding antibiotics to the milk, in order to inhibit the unwanted growth of bacteria. This fact alone can cause serious risks to human health. One way of detecting antibiotic residues (sulfonamides) in milk, is using the enzymatic reaction between an ester (4-nitrophenyl acetate) and carbonic anhydrase, which gives a bright yellow color. The sulfonamides inhibit this reaction, preventing color appearance. Paper-based microfluidic devices (μ PAD) have been developed as a new simple, fast, portable and inexpensive, in order to detect the presence or absence of the three most common sulfonamides (sulfamethazine, sulfadimethoxine and sulfathiazole), as required by the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA). The immobilization of a uniform thin layer of methyl cellulose pulp on the spots of microdevices, allowed greater stability in the reaction surface of the paper, and achieved lower limits of detection (LOD) than without the additive, equivalent to $2.80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($7.79 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) for sulfamethazine, $2.70 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($8.37 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) for sulfadimethoxine and $2.50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($6.38 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) for sulfathiazole. The principal advantage of this method is that allows the analysis of bovine milk samples without any prior treatment. Furthermore, the method *i*) has good linearity and repeatability in tests performed intra-day and inter-day, *ii*) shows selectivity for compounds of the sulfonamide class, and *iii*) is robust to changes in bovine milk temperature. Thus, the test can be transported to the rural area, without a specialized professional, providing locally a fast, simple and low cost diagnostic for the presence of sulfonamide antibiotics in milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do primeiro dispositivo microfluídico em papel, desenvolvido por Müller e colaboradores (1949)	21
Figura 2 -	Espectro de infravermelho do papel de cromatografia (Whatman® nº 1) e nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran), à temperatura ambiente.....	23
Figura 3 -	Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran) e papel de cromatografia (Whatman® nº 1)	24
Figura 4 -	Difração de raios-X da nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran) e do papel de cromatografia (Whatman® nº 1).....	25
Figura 5 -	Estrutura química da sulfanilamida, a qual deriva as sulfonamidas.....	28
Figura 6 -	Estrutura química do ácido p-aminobenzóico, competidor das sulfonamidas.....	28
Figura 7 -	Glóbulos de gordura presentes no leite.....	32
Figura 8 -	Estrutura química da lactose, constituída pela galactose e glicose.....	33
Figura 9 -	Representação genérica de inibição do sítio ativo da anidrase carbônica por sulfonamida.....	38
Figura 10 -	Vista detalhada dos componentes de uma impressora a cera.....	39
Figura 11 -	Transferência da tinta fundida para o cilindro de impressão....	40
Figura 12 -	Transferência da imagem do cilindro de impressão para o papel.....	41
Figura 13 -	Deteção de ensaio colorimétrico por análise em <i>software</i> comercial.....	42
Figura 14 -	Reação química entre anidrase carbônica (AC) e 4-nitrofenil acetato, na ausência e presença de sulfonamida.....	47
Figura 15 -	Representação dos <i>layouts</i> de microdispositivos desenhados e suas respectivas zonas reacionais.....	48

Figura 16 -	Esquema geral da fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD).....	49
Figura 17 -	Representação das possíveis ordens de imobilização dos reagentes (enzima e éster) nos <i>spots</i> dos microdispositivos.....	51
Figura 18 -	<i>Layout</i> do μ PAD otimizado e suas respectivas dimensões em milímetros (mm).....	52
Figura 19 -	Plataformas μ PAD para dois tipos de ensaios analíticos: zonas reacionais isoladas ou teste de fluxo lateral. Contraste entre as regiões hidrofóbicas (cera em coloração preta) e hidrofílicas (canais capilares) em dispositivos microfluídicos de papel.....	58
Figura 20 -	Avaliação do pH ideal para atividade das enzimas anidrase carbônica e anidrase carbônica II.....	59
Figura 21 -	Ensaio esquemático, utilizando hidróxido de amônio como solvente preliminar das sulfonamidas. As concentrações de sulfonamida (3; 5; 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) utilizadas em cada dispositivo apresentam-se nos mesmos.....	60
Figura 22 -	Ensaio esquemático para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol, respectivamente, todas em alta concentração e previamente diluídas em hidróxido de amônio.....	60
Figura 23 -	Avaliação da interferência do hidróxido de amônio como solvente.....	61
Figura 24 -	Avaliação da interferência da acetona como solvente.....	61
Figura 25 -	Ensaio realizado com imobilização da enzima no primeiro <i>spot</i> e do éster no segundo <i>spot</i> , em volumes diferentes. (A) Ensaio antes da aplicação da amostra. (B) Ensaio após aplicação da amostra.....	62
Figura 26 -	Ensaio realizado com imobilização do éster no primeiro <i>spot</i> e da enzima no segundo <i>spot</i> , em volumes diferentes. (A) Ensaio antes da aplicação da amostra. (B) Ensaio após aplicação da amostra.....	62
Figura 27 -	Ensaio para avaliação da ordem de imobilização dos reagentes no papel. (A) Imobilização da enzima no primeiro <i>spot</i> e do éster no segundo <i>spot</i> , ambos em mesmo volume; (B) Imobilização do éster no primeiro <i>spot</i> e da enzima no segundo <i>spot</i> , ambos em mesmo volume.....	63
Figura 28 -	Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, em papel cromatográfico Whatman [®] n° 1.....	64

Figura 29 -	Curva analítica para a sulfametazina. (A) Curva analítica para ensaio usando anidrase carbônica. (B) Curva analítica para ensaio usando anidrase carbônica II.....	64
Figura 30 -	Curva analítica para a sulfadimetoxina. (A) Curva analítica para ensaio usando anidrase carbônica. (B) Curva analítica para ensaio usando anidrase carbônica II.....	65
Figura 31 -	Curva analítica para o sulfatiazol. (A) Curva analítica para ensaio usando anidrase carbônica. (B) Curva analítica para ensaio usando anidrase carbônica II.....	65
Figura 32 -	Ensaio realizado em microdispositivo fabricado em papel de filtro comum.....	66
Figura 33 -	Análise do tempo de fluxo do leite em função da largura dos microcanais capilares, no novo <i>layout</i> de microdispositivo fabricado em papel cromatográfico Whatman® nº 1.....	67
Figura 34 -	Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando baixa concentração de anidrase carbônica.....	68
Figura 35 -	Curva analítica do ensaio usando baixa concentração de anidrase carbônica. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.....	68
Figura 36 -	Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando alta concentração de anidrase carbônica.....	70
Figura 37 -	Curva analítica do ensaio usando alta concentração de anidrase carbônica. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.....	70
Figura 38 -	Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando gelatina comercial incolor imobilizada no <i>spot</i> reacional do papel.....	72
Figura 39 -	Curva analítica do ensaio usando gelatina comercial incolor imobilizada no <i>spot</i> reacional do papel. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.....	72
Figura 40 -	Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando metil celulose imobilizada no <i>spot</i> reacional do papel.....	73
Figura 41 -	Curva analítica do ensaio usando metil celulose imobilizada no <i>spot</i> reacional do papel. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.....	74
Figura 42 -	Avaliação da linearidade referente aos ensaios com sulfametazina, a partir do gráfico de resíduos.....	76

Figura 43 - Avaliação da linearidade referente aos ensaios com sulfadimetoxina, a partir do gráfico de resíduos.....	77
Figura 44 - Avaliação da linearidade referente aos ensaios com sulfatiazol, a partir do gráfico de resíduos.....	77
Figura 45 - Ensaio colorimétrico para avaliação da seletividade do método. (A) Ensaio com leite sem sulfonamida (branco). (B) Ensaio com água desionizada sem sulfonamida.....	78
Figura 46 - Ensaio colorimétrico para avaliação da especificidade do método desenvolvido. (A) Sulfametazina com sulfadimetoxina. (B) Sulfametazina com sulfatiazol. (C) Sulfadimetoxina com sulfatiazol. (D) Todas as sulfonamidas. (E) Branco.....	79
Figura 47 - Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 0$	79
Figura 48 - Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 30$ min.....	80
Figura 49 - Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 1$ h.....	80
Figura 50 - Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 2$ h.....	80
Figura 51 - Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 4$ h.....	81
Figura 52 - Avaliação da estabilidade colorimétrica em função do tempo, para a sulfametazina, considerando os tempos $t = 0$; $t = 1$ h; $t = 4$ h..	81
Figura 53 - Avaliação da robustez do método quanto à temperatura, para a sulfametazina. (A) Ensaio colorimétrico. (B) Curva analítica para o leite a 4°C . (C) Curva analítica para o leite à temperatura ambiente. (D) Curva analítica para o leite morno (28 a 29°C)...	82
Figura 54 - Avaliação da robustez do método quanto à temperatura, para a sulfadimetoxina. (A) Curva analítica para o leite a 4°C . (B) Curva analítica para o leite à temperatura ambiente. (C) Curva analítica para o leite morno (28 a 29°C).....	83
Figura 55 - Avaliação da robustez do método quanto à temperatura, para o sulfatiazol. (A) Curva analítica para o leite a 4°C . (B) Curva analítica para o leite à temperatura ambiente. (C) Curva analítica para o leite morno (28 a 29°C).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação entre os diferentes métodos de detecção para análises em dispositivos microfluídicos de papel.....	18
Tabela 2 -	Sulfonamidas indicadas para monitoramento em alimentos de origem animal.....	29
Tabela 3 -	Tipos de solução e tamanho das partículas dos constituintes do leite.....	30
Tabela 4 -	Quantidades percentuais dos principais componentes do leite.....	31
Tabela 5 -	Distribuição dos sais do leite entre as fases solúvel e coloidal..	34
Tabela 6 -	Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente aos ensaios usando anidrase carbônica (AC) e anidrase carbônica II (AC II).....	66
Tabela 7 -	Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando baixa concentração de anidrase carbônica.....	69
Tabela 8 -	Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando alta concentração de anidrase carbônica.....	71
Tabela 9 -	Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando gelatina comercial incolor imobilizada no <i>spot</i> reacional do papel.....	73
Tabela 10 -	Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando metil celulose imobilizada no <i>spot</i> reacional do papel.....	74
Tabela 11 -	Tabela ANOVA para avaliação da linearidade de cada sulfonamida nos ensaios usando alta concentração de anidrase carbônica e imobilização de metil celulose no <i>spot</i> reacional do papel.....	76
Tabela 12 -	Avaliação da robustez do método quanto à temperatura da amostra (leite), para as três sulfonamidas analisadas.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μPAD: Dispositivo analítico microfluídico em papel (*Microfluidic Paper-based Analytical Devices*)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE: Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

CMYK: Sistema de cores ciano, magenta, amarelo e preto (*Cyan, Magenta, Yellow, Key (Black)*)

DARPA: Agência de Projetos e Pesquisa Avançada de Defesa (*Defense Advanced Research Projects Agency*)

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*)

FDA: Associação de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

FTIR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GC: Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

LOD: Limite de detecção (*Limit of Detection*)

LOQ: Limite de quantificação (*Limit of Quantitation*)

LMR: Limite máximo de resíduos

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

PABA: Ácido p-aminobenzóico

PAMVet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PC: Policarbonato

PDMS: Poli(dimetilsiloxano)

PMMA: Polimetilmetacrilato

PNCRC: Programa Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes

PS: Poliestireno

SDM: Sulfadimetoxina

SMZ: Sulfametazina

STZ: Sulfatiazol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Princípios da microfluídica e desenvolvimento da microfluídica em papel.....	19
1.2	Papel e suas propriedades.....	22
1.3	Resíduos de antibióticos contaminantes em alimentos de origem animal.....	26
1.3.1	Sulfonamidas.....	27
1.4	O leite.....	30
1.4.1	Gordura do leite.....	31
1.4.2	Proteínas do leite.....	32
1.4.3	Açúcar do leite.....	33
1.4.4	Sais do leite.....	34
1.4.5	Vitaminas do leite.....	34
1.4.6	Produção de leite no Brasil.....	35
1.5	Principais métodos analíticos para determinação de resíduos e contaminantes em leite.....	35
1.6	Biossensores.....	37
1.6.1	Anidrase carbônica.....	37
1.7	Fabricação de dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD) através de impressão com cera.....	38
1.8	Deteção de ensaios colorimétricos.....	41
1.9	Motivações para o desenvolvimento de μ PAD.....	43
2	OBJETIVOS GERAIS.....	45
2.1	Objetivos específicos.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Reagentes.....	46
3.2	Materiais e equipamentos.....	46
3.3	Princípios da reação.....	46
3.4	<i>Layout</i> dos dispositivos.....	47
3.5	Impressão e tratamento térmico.....	48
3.6	Análise do pH ideal para atividade da enzima anidrase carbônica.....	49
3.7	Avaliação do efeito do solvente na diluição das sulfonamidas.....	50

3.7.1	Diluição em hidróxido de amônio.....	50
3.7.2	Diluição em acetona.....	50
3.8	Ordem de imobilização dos reagentes no papel.....	51
3.9	Análise com amostras de leite bovino.....	51
3.10	Otimização do dispositivo microfluídico em papel (μ PAD).....	52
3.10.1	Dimensões do dispositivo, volume e tempo de fluxo do leite.....	53
3.11	Otimização da análise em microdispositivos de papel (μ PAD).....	53
3.11.1	Otimização usando baixa concentração de enzima.....	53
3.11.2	Otimização usando alta concentração de enzima.....	53
3.12	Aplicação de reagentes para otimização da superfície reacional do papel.....	54
3.12.1	Imobilização de gelatina comercial incolor no papel.....	54
3.12.2	Imobilização de metil celulose no papel.....	54
3.13	Análise das imagens por <i>software</i> comercial.....	55
3.14	Figuras de mérito e análise da viabilidade no método.....	56
3.14.1	Curva analítica, linearidade e sensibilidade.....	56
3.14.2	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	56
3.14.3	Seletividade e especificidade.....	56
3.14.4	Estabilidade colorimétrica.....	57
3.14.5	Robustez.....	57
3.15	Descarte de resíduos gerados.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD).....	58
4.2	Análise do pH ideal para atividade da anidrase carbônica.....	58
4.3	Avaliação do efeito do solvente na diluição das sulfonamidas.....	59
4.3.1	Diluição em hidróxido de amônio.....	59
4.3.2	Diluição em acetona.....	61
4.4	Ordem de imobilização dos reagentes no papel.....	61
4.5	Análise com amostras de leite bovino.....	63
4.6	Otimização dos dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD).....	67
4.7	Otimização das concentrações de reagentes imobilizados no papel.....	67
4.7.1	Otimização usando baixa concentração de enzima.....	68
4.7.2	Otimização usando alta concentração de enzima.....	69

4.8	Aplicação de reagentes para a otimização da superfície reacional do papel.....	71
4.8.1	Imobilização de gelatina comercial incolor no papel.....	71
4.8.2	Imobilização de metil celulose no papel.....	73
4.9	Figuras de mérito e análise da viabilidade do método.....	75
4.9.1	Curva analítica, linearidade e sensibilidade.....	75
4.9.2	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	78
4.9.3	Seletividade e especificidade.....	78
4.9.4	Estabilidade colorimétrica.....	79
4.9.5	Robustez.....	82
5	CONCLUSÃO.....	85
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Dispositivos microfluídicos são sensores que permitem uma análise fácil, rápida e não invasiva de fluidos biológicos, os quais incluem diagnósticos de saúde, monitoramento ambiental e controle de qualidade de alimentos em geral [1-3]. Os dispositivos microfluídicos em papel, mais conhecidos por μ PAD (*Microfluidic Paper-based Analytical Devices*) [4], podem ser bidimensionais ou tridimensionais. No mercado existem vários tipos de papel utilizados na confecção desse tipo de sensor, de forma que cada papel apresenta características, físicas e químicas, mais ou menos favoráveis para as análises desejadas (tipo de analito, matriz, fluidez, entre outros fatores).

A detecção das análises realizadas em dispositivos microfluídicos fabricados em papel é ampla e pode ser colorimétrica, eletroquímica, por condutividade elétrica, quimiluminescente ou eletroquimiluminescente [2]. Os métodos de detecção podem ser escolhidos de acordo com o que se deseja obter de informação em cada análise realizada (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre os diferentes métodos de detecção para análises em dispositivos microfluídicos de papel.

Método de Detecção	Tipo de Análise
Colorimétrica	Semi-quantitativa e quantitativa
Eletroquímica	Quantitativa
Condutividade elétrica	Semi-quantitativa e quantitativa
Quimiluminescência e eletroquimiluminescência	Quantitativa

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de DEVI, D. L.; BURKHARD, R.; GOODING, J. J. CHOW, E. Recent Advances in paper-based sensor. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 11505-11526, 2012.

1.1 Princípios da microfluídica e desenvolvimento da microfluídica em papel

A microfluídica é a ciência e tecnologia de sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos, usando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros [5].

As aplicações da microfluídica atendem a uma variedade de áreas e podemos citar quatro principais: análise molecular, biodefesa, biologia molecular e microeletrônica [5].

Pode-se considerar que a origem da microfluídica teve inspiração nas técnicas analíticas de alta resolução: Cromatografia Gasosa (GC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Eletroforese Capilar (CE). Esses métodos, combinados com a potência do laser na detecção óptica, tornou possível alcançar análises com alta sensibilidade e resolução, usando quantidades muito pequenas de amostra. O sucesso desses métodos de microanálise serviu de base para o desenvolvimento de novos formatos, mais compactos e mais versáteis, para outras aplicações de métodos em microescala nas áreas de química e bioquímica [5].

A segunda motivação para o desenvolvimento de micro sistemas ocorreu após o fim da Guerra Fria, quando armas químicas e biológicas apresentavam-se como ameaças terroristas. A fim de combater essas ameaças, a “*Defense Advanced Research Projects Agency*” (DARPA), do Departamento de Defesa dos Estados Unidos, apoiou uma série de programas na década de 1990, os quais visavam desenvolver sistemas microfluídicos para detecção de ameaças químicas e biológicas. Estes programas foram o principal estímulo para o rápido crescimento da microfluídica como tecnologia em ambientes acadêmicos [5].

A terceira motivação nasceu a partir da biologia molecular. O auge da genômica na década de 1980, seguido pelo advento de outras áreas de microanálise relacionados com a biologia molecular, tais como o seqüenciamento de DNA de alto rendimento, métodos analíticos necessários com maior rendimento, sensibilidade e resolução, já havia sido contemplado na biologia. Assim, a microfluídica oferecia abordagens para ultrapassar estes problemas [5].

A quarta contribuição surgiu da microeletrônica. O avanço da microfluídica estava relacionado ao fato da fotolitografia e outras tecnologias associadas, as quais haviam sido tão bem sucedidas em microeletrônica e sistemas microeletromecânicos, ser diretamente aplicável a microfluidos. Alguns dos

primeiros trabalhos com sistemas microfluídicos usaram silício e vidro. Entretanto, esses materiais foram em grande parte substituídos por plásticos e polímeros. Para análises de amostras biológicas em água, os dispositivos fabricados em vidro e silício são geralmente desnecessários ou inapropriados. O silício, em particular, é caro e opaco à luz visível e ultravioleta, de forma que não pode ser utilizado como método óptico convencional de detecção. É mais fácil fabricar os componentes requeridos para sistemas de microanálise – especialmente bombas e válvulas – em elastômeros do que em materiais rígidos. Tanto vidro quanto silício, não possuem todas as propriedades, principalmente a permeabilidade a gases, necessárias para o trabalho com células de mamíferos [5].

Dessa forma, grande parte da pesquisa exploratória em sistemas microfluídicos foi realizada, e ainda é, em um polímero específico, o poli(dimetilsiloxano), também conhecido por PDMS, que possui propriedades inteiramente distintas das do silício [5-7].

O PDMS é um elastômero macio opticamente transparente. A facilidade com que novos conceitos podem ser ensaiados em PDMS e a sua capacidade para suporte, tornam este material muito útil, como válvulas pneumáticas por exemplo. Entretanto, a estabilidade mecânica do silício e do vidro ainda são úteis no campo da nanofluídica (o estudo de fluidos em canais com escala nanométrica, de preferência com menos de 50 nm de dimensão), em que canais com paredes rígidas podem ser mais apropriados [5,8,9].

Algumas desvantagens do PDMS incluem *i)* sua hidrofobicidade, *ii)* a propensão para a absorção de proteínas, *iii)* dificuldades para a produção em massa e *iv)* possível contaminação dos derivados do monômero cíclico de silicone [10-12]. Devido a sua elevada flexibilidade, canais fabricados utilizando PDMS tendem a se expandir e contrair com diferentes pressões [13]. Embora esta propriedade seja benéfica para algumas aplicações, suas propriedades elastoméricas podem ser prejudiciais para outras [10-12].

Materiais termoplásticos, como polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), poliestireno (PS) e polímeros de olefinas cíclicas são comumente usados em pesquisas laboratoriais, incluindo microtitulação e placas de Petri. Esses plásticos mostram-se atraentes, uma vez que são baratos, robustos, possuem boas propriedades ópticas e as suas superfícies podem ser facilmente modificadas

[10,14]. A moldagem em larga escala para estes plásticos é extremamente acessível.

Os primeiros indícios para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em papel ocorreram a partir de 1940, época em que a cromatografia em papel foi utilizada a fim de separar clorofila a partir de folhas de plantas. Müller e seus colaboradores foram os primeiros a dar origem a canais confinados em superfícies de papel por meio da infusão de papel de filtro comum com parafina, em 1949 (Figura 1). Assim, usaram um molde de metal quente para impregnar a parafina no papel, de forma a criar barreiras hidrofóbicas as quais mantinham o fluxo do fluido confinado [15].

Figura 1 – Esquema do primeiro dispositivo microfluídico em papel, desenvolvido por Müller e colaboradores (1949).

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. **AIP Biomicrofluidics**, v. 6, n. 1, p. 011301-011301-13, 2012.

Todavia, o campo de pesquisa com dispositivos microfluídicos de papel teve seu nascimento e novas funcionalidades apenas em 2007, com Whitesides e colaboradores. O objetivo era desenvolver a manipulação e análise de fluidos biológicos com vasta aplicação em diagnósticos de saúde, monitoramento ambiental, assim como testes de qualidade de alimentos [1,16,17].

1.2 Papel e suas propriedades

Há uma imensa variedade de papéis disponíveis (materiais) para diversas aplicações e funcionalidades. Entretanto, a escolha baseia-se essencialmente nas etapas necessárias para desenvolver um dispositivo analítico [2].

Quando se trata da aplicação de fluidos em papel, algumas propriedades críticas são: química de superfície, porosidade e propriedades ópticas. Química de superfície e porosidade influenciam na imobilização de biomoléculas, como anticorpos e oligonucleotídeos, bem como na absorção do fluido [18,19]. O conhecimento das propriedades ópticas do papel também é importante, pois pode influenciar nos resultados dos testes visuais ou com detecção óptica [18].

Para o desenvolvimento de sensores e tecnologias microfluídicas, o papel de filtro comum foi bastante utilizado nos últimos anos na fabricação de sensores baseados em papel, devido sua capacidade de absorção [2,20-23]. Em particular, o papel Whatman® apresenta parâmetros importantes os quais o diferenciam do papel de filtro comum, como: porosidade, retenção de partículas e vazão.

Muitos grupos usaram papel cromatográfico Whatman® nº 1, com média retenção e taxa de fluxo [2,4,20-22,24-30]. No entanto, Li e colaboradores utilizaram papel cromatográfico Whatman® nº 4, revestido com um agente hidrofóbico como uma base para a impressão de canais hidrofílicos [2,23]. Este tipo de papel de filtro possui um tamanho de poro maior do que o padrão e foi escolhido a fim de impedir a penetração de líquidos, pois o inchaço das fibras de celulose pelo solvente é capaz de restringir os poros capilares [2].

Embora o papel cromatográfico seja largamente utilizado, nem sempre possui as características físicas desejadas para outros tipos de modificação da superfície do mesmo. Um exemplo são as membranas hidrofóbicas de nitrocelulose que exibem um elevado grau de ligação não específica para biomoléculas e são, portanto, adequadas para imobilização de proteínas e DNA [2,4,21,31].

A nitrocelulose é obtida através da reação entre celulose e ácido nítrico, substituindo os grupos hidroxila da celulose por grupos nitrato. Isto pode ser observado por meio de uma análise de infravermelho, FTIR (Figura 2).

Figura 2 – Espectro de infravermelho do papel de cromatografia (Whatman® n° 1) e nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran), à temperatura ambiente.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de COSTA, M. N.; VEIGAS, B.; JACOB, J. M.; SANTOS, D. S.; GOMES, J.; BAPTISTA, P. V.; MARTINS, R.; INÁCIO, J.; FORTUNATO, E. A low-cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing, lab-on-paper. *Nanotechnology*, v. 25, n. 9, p. 1-12, 2013.

Lu e colaboradores exploraram o uso da membrana de nitrocelulose como substrato para a construção de sensores baseados em papel. Primeiramente, por formação de uma barreira de cera sobre a membrana através de impressão e aquecimento, seguida pela deposição de uma enzima para ensaio colorimétrico [2,32,33]. Embora as membranas de nitrocelulose sejam suaves e apresentem um tamanho de poro razoavelmente uniforme, equivalente a 0,45 μm , o que resulta num fluxo de líquido mais estável e reproduzível na superfície do papel, a penetração da cera é lenta em comparação com papel de filtro. A segunda tentativa de exploração foi com o uso de fibras de celulose quimicamente modificadas, já que comercialmente, existem papéis de celulose de troca iônica e papéis compostos por celulose e poliéster [2,29].

Em vez de usar papel de filtro como material principal para criar dispositivos de detecção baseados em papel, outros tipos, como papel plastificado, foram relatados como uma plataforma apropriada em tecnologia de sensores. O papel plastificado é um substrato flexível feito de fibras de celulose misturadas com um material de enchimento inorgânico [2].

Arena e colaboradores utilizaram papel plastificado a fim de desenvolver um

sensor de papel flexível para a detecção de etanol, usando nanopartículas de óxido de índio e estanho em pó como material de detecção, e nanotubos de carbono de paredes múltiplas como eletrodos [2,34]. Devido à superfície não degradável e relativamente lisa do papel plastificado, este mostrou-se como um bom substituto para o papel de filtro comum, especialmente quando se modifica nanomateriais sobre uma superfície [2].

Alguns estudos realizaram análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, (Figura 3) comparativas entre papel de cromatografia (Whatman® nº 1) e papel a base de nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran).

Figura 3 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran) e papel de cromatografia (Whatman® nº 1).

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de COSTA, M. N.; VEIGAS, B.; JACOB, J. M.; SANTOS, D. S.; GOMES, J.; BAPTISTA, P. V.; MARTINS, R.; INÁCIO, J.; FORTUNATO, E. A low-cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing, lab-on-paper. **Nanotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1-12, 2013.

É evidente que apesar de apresentarem uma microestrutura bastante diferenciada, o papel de cromatografia Whatman® nº 1 possui porosidade superior (aproximadamente 68%), com um diâmetro de poro superior correspondente (100 µm) em relação à nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran), com diâmetro de poro de aproximadamente 0,45 µm, a qual corresponde a um ângulo de contato menor, equivalente a 12° [18].

O papel Whatman® nº 1 é fabricado a partir de fibras de algodão de alta qualidade, tratadas de modo a se alcançar um elevado teor de α -celulose (maior que 98%), o que garante qualidade, reprodutibilidade e uniformidade na superfície do papel. A celulose é um polímero formado por uma longa cadeia de moléculas de glicose ligadas por pontes de oxigênio. A celulose de algodão difere da celulose da madeira, principalmente por ter um maior grau de polimerização e cristalinidade. A cristalinidade indica que as moléculas das fibras são compactadas e paralelas umas às outras (Figura 4) [18].

Figura 4 – Difração de raios-X da nitrocelulose (Whatman® BA85 Protran) e do papel de cromatografia (Whatman® nº 1).

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de COSTA, M. N.; VEIGAS, B.; JACOB, J. M.; SANTOS, D. S.; GOMES, J.; BAPTISTA, P. V.; MARTINS, R.; INÁCIO, J.; FORTUNATO, E. A low-cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing, lab-on-paper. *Nanotechnology*, v. 25, n. 9, p. 1-12, 2013.

A partir da análise de difração de raios-X mostrada acima, é possível avaliar qualitativamente que o papel Whatman® nº 1 possui celulose com caráter semicristalino, a qual é corroborada pelos picos de difração característicos em $2\theta = 14,7^\circ$, $16,8^\circ$ e $22,7^\circ$, correspondentes aos planos cristalográficos (110), (110) e (200) de celulose monolítica tipo I, respectivamente, com um grau de cristalinidade de 86% [18,35].

Embora a nitrocelulose tenha sido amplamente utilizada em ensaios clínicos

e biológicos, ela não se apresenta como matriz ideal para dispositivos de fluxo lateral, pois possui características como elevada capacidade de se ligar a proteínas, além de ser altamente inflamável e apresentar baixas propriedades mecânicas [18,36]. O papel a base de celulose não apresenta tais desvantagens e possui as propriedades ideais para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico colorimétrico [18].

1.3 Resíduos de antibióticos contaminantes em alimentos de origem animal

O uso de antibióticos em animais de produção pode ser ministrado por meio de três dosagens. As altas dosagens, conhecidas como dosagens terapêuticas, têm como finalidade o tratamento e combate de doenças como mastite, infecções respiratórias, genitais e oftálmicas. As dosagens menores, denominadas dosagens profiláticas, são utilizadas como método de prevenção de doenças. Já nas dosagens muito baixas, conhecidas por dosagens subterapêuticas, os antibióticos são aplicados às rações a fim de aumentar o ganho de peso, promovendo também a eficiência de aproveitamento dos alimentos e tornando menores os índices de morbidez e mortalidade [37-46].

Dessa forma, o uso de antibióticos na produção animal propicia maior disponibilidade de alimentos de origem animal, baixa possibilidade de transferência de infecções de animais para seres humanos e, conseqüentemente, aumento nos ganhos econômicos [37,38]. No entanto, alguns produtores utilizam os antibióticos de forma inadequada, ministrando o mesmo em dosagens superiores às recomendadas ou até mesmo adicionando os antibióticos diretamente no leite, a fim de inibir o crescimento indesejável de bactérias, o que pode proporcionar graves riscos à saúde humana [41,45-48].

Entre os possíveis riscos à saúde do homem, a resistência bacteriana desenvolvida no organismo humano é a principal. Por isso, desde 1977, a *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, considerou banir a utilização de alguns antibióticos, como a penicilina e tetraciclina, em dosagens subterapêuticas [37,38]. Entretanto, algumas pesquisas mostram que a prática do uso de antibióticos não foi totalmente erradicada, sendo que em 1999 foram utilizadas na União Européia cerca de 13.288 toneladas de antibióticos, dos quais 65% correspondentes à medicina humana, 29% ministrados na medicina

veterinária e 6% utilizados como aditivo alimentar, a fim de propiciar o crescimento animal [37,49].

Os resíduos de antibióticos presentes no leite não são eliminados no processo de pasteurização, nem por fervura ou esterilização, de forma que podem facilmente alcançar os consumidores. Assim, além da resistência bacteriana, exposições extensas a esses antibióticos podem provocar intoxicações e reações alérgicas, como rinites, dermatites, urticárias, que, após um período de sensibilização, podem ser desencadeadas por doses bastante pequenas [41,47]. No caso de mulheres gestantes, alguns estudos evidenciam um aumento das possibilidades de ocorrer deformidades no feto [37,50].

A ANVISA e o FDA estabelecem concentrações máximas de antibióticos em alimentos de origem animal, sem comprometer a saúde humana [37,38,41,42,46]. O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), originado pela ANVISA, determinou o leite como primeira matriz de análise, devido seu elevado consumo pela população brasileira. De acordo com o PAMVet, o limite máximo de resíduos (LMR) de antibióticos em alimentos de origem animal corresponde a 0,1 mg kg⁻¹ de carne [37].

1.3.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas, também conhecidas como sulfas, são antibióticos bacteriostáticos, ou seja, agem sobre as bactérias inibindo o seu crescimento, inibidores da síntese de ácido fólico, sendo que muitas delas apresentam atividade antimicrobiana [52,53]. Quando aplicadas em altas concentrações, apresentam efeito bactericida, ou seja, atuam nas bactérias causando a sua destruição. Entretanto, nesse caso podem gerar graves reações adversas nos animais medicados [54,55]. As sulfas são bastante utilizadas para prevenir e controlar uma série de doenças em práticas veterinárias, tais como infecções respiratórias e gastrointestinais. Elas são administradas por via oral ou misturadas em alimentos para animais, com fins terapêuticos ou profiláticos, devido ao seu largo espectro de atividade e os seus baixos custos [52].

As sulfonamidas são derivados da sulfanilamida (Figura 5), apresentando em comum um anel benzênico substituído por dois grupos orientados nas posições 1 e 4, respectivamente. Assim, caracterizam-se por apresentar grupos R-SO₂-NR'-

R"-, sendo que diferentes grupos R, R' e R" determinam propriedades químicas, físicas e farmacológicas distintas [41,54,56,57].

Figura 5 – Estrutura química da sulfanilamida, a qual deriva as sulfonamidas.

Fonte: Domínio público.

As sulfas são competitivas diretas do ácido p-aminobenzóico (Figura 6), também conhecido por PABA, apesar de suas estruturas químicas serem análogas [54,55].

Figura 6 – Estrutura química do ácido p-aminobenzóico, competidor das sulfonamidas.

Fonte: Domínio público.

O mecanismo de ação das sulfonamidas no combate às bactérias ocorre por meio da sua competição com o ácido p-aminobenzóico, de forma que este não é utilizado pelas bactérias durante a síntese de ácido fólico, essencial para a síntese de ácidos nucleicos pelas bactérias. Assim, ao inibir a absorção do PABA, inibe-se também a reprodução e o desenvolvimento bacteriano [54,58].

O Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em leite (PNCRC) [41,59] e o PAMVet, criado pela ANVISA [41,60], determinaram que as sulfonamidas indicadas para monitoramento são sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol (Tabela 2).

Tabela 2 – Sulfonamidas indicadas para monitoramento em alimentos de origem animal.

Sulfonamida	Sigla	Massa molar (g mol ⁻¹)	Estrutura Química
Sulfametazina	SMZ	278,33
Sulfadimetoxina	SDM	310,33
Sulfatiazol	STZ	255,32

Fonte: Autoria própria.

A sulfametazina (SMZ) é a sulfonamida mais utilizada como medicamento no tratamento de doenças humanas. Entretanto, ela pode provocar reações alérgicas, além de efeitos tóxicos devido a sua carcinogenicidade. Estudos comprovaram por meio de bioensaios com roedores que a sulfametazina provoca tumor na tireóide [52,53].

Assim, foi estabelecido pelo regulamento europeu um limite máximo de resíduos de sulfonamidas equivalente a 100 µg kg⁻¹ em tecidos animais comestíveis, incluindo o leite [52,53]. De acordo com o FDA, a tolerância de sulfadimetoxina (SDM) em leite é de 10 ng mL⁻¹, e considera este nível seguro para as seguintes sulfonamidas: sulfametazina (SMZ), sulfatiazol (STZ), sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfapiridina e sulfaquinoxalina [53,61].

1.4 O leite

O leite pode ser quimicamente definido como um fluido complexo, em que mais de cem compostos quimicamente separados podem ser encontrados. Os principais componentes do leite são água, gordura, lactose, caseína, proteínas do soro do leite e minerais, em quantidades de variam com o leite das várias espécies de animais. Entretanto, para quaisquer espécies de animais mamíferos, o intervalo de valores para os componentes do leite é razoavelmente constante [62].

Do ponto de vista fisiológico, o leite é a secreção do funcionamento das glândulas mamárias das fêmeas de todos os mamíferos, o qual é produzido um tempo após o parto, para a nutrição dos filhotes da espécie, durante o período inicial de crescimento [62].

Em termos físico-químicos, o leite é um fluido opaco, esbranquiçado de fases múltiplas dispersas. A solução contém lactose, vitaminas, ácidos, enzimas e alguns sais inorgânicos. A fase coloidal contém caseína, fosfato de cálcio, e proteínas globulares. A gordura existe sob a forma de emulsão “óleo em água” [62].

Aproximadamente 87% do leite é composto por água [63]. Os demais constituintes do leite podem ser distinguidos de acordo com o tipo e o tamanho das partículas presentes no líquido (Tabela 3).

Tabela 3 – Tipos de solução e tamanho das partículas dos constituintes do leite.

Tipo de solução	Diâmetro da partícula (nm)
Solução iônica	0,01 - 1
Solução molecular	0,1 - 1
Colóide (dispersão fina)	1 - 100
Suspensão ou emulsão (dispersão grosseira)	50 - 100

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de JOHN WALSH, Milk chemistry - An introduction. Disponível em: <https://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ilca_manual4/Milkchemistry.htm>. Acesso em: 11 de março de 2016.

No leite bovino, os principais fatores que interferem na sua qualidade e quantidade dos principais componentes (Tabela 4) são: raça do animal; sua

alimentação, a qual é responsável por até 50% da variação nos teores de gordura e proteínas do leite [64]; idade; número de parições e tempo de lactação, além das variações climáticas [37,62,63,65,66].

Tabela 4 – Quantidades percentuais dos principais componentes do leite.

Componentes	Quantidade (%)
Água	87,4
Sólidos	12,6
Gordura	3,70
Sólidos não gordurosos	8,90
Mineral	0,700
Lactose	4,80
Proteína	3,40
Caseína	2,80
Proteína do soro do leite	0,600

Fonte: Adaptação de Rafanin (2016) a partir de RAMESH CHANDAN, Dairy-Based Ingredients, Chapter 1: Properties of Milks and Its Components. Disponível em: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/book/10.1094/9780913250945>>. Acesso em: 11 de março de 2016.

1.4.1 Gordura do leite

Quando o leite é deixado em repouso, observa-se a formação de uma camada cremosa sobre a superfície. Essa camada difere consideravelmente em aparência quando comparada à camada inferior de leite desnatado. O creme é constituído por várias esferas de diversos tamanhos, os quais flutuam no leite. Cada esfera encontra-se rodeada por uma fina camada (membrana do glóbulo de gordura) que atua como agente emulsionante para a gordura suspensa no leite (Figura 7). A gordura apresenta-se como uma emulsão “óleo em água”, a qual pode ser destruída por ação mecânica, tal como agitação [63].

Figura 7 – Glóbulos de gordura presentes no leite.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de RAMESH CHANDAN, Dairy-Based Ingredients, Chapter 1: Properties of Milks and Its Components. Disponível em: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/book/10.1094/9780913250945>>. Acesso em: 11 de março de 2016.

Cerca de 98% da gordura do leite é uma mistura de triglicerídeos. Há também lipídeos neutros, vitaminas solúveis em gordura e pigmentos (como o caroteno, que lhe confere a cor amarelo manteiga), esteróis e ceras. As gorduras suprem o corpo com uma fonte de energia concentrada: a oxidação da gordura no corpo rende $9,0 \text{ cal g}^{-1}$. A gordura do leite age como um solvente para as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, além de fornecer os ácidos graxos essenciais: linoléico, linolênico e araquidônico [63-65].

1.4.2 Proteínas do leite

As proteínas do leite representam uma das maiores contribuições do leite para a nutrição humana. As proteínas são polímeros de aminoácidos, sendo que apenas 20 aminoácidos diferentes ocorrem regularmente nas proteínas. No leite existem dois grupos de proteína: a caseína e as proteínas do soro do leite. A caseína foi separada do leite pela primeira vez em 1830, pela adição de ácido ao

leite, estabelecendo assim a sua existência como uma proteína distinta. Em 1895, as proteínas de soro foram separadas em frações de globulina e albumina. Em seguida, foi demonstrado que a caseína é constituída por um número de frações e é, dessa forma, heterogênea [63].

As proteínas de soro do leite são diversas, sendo as mais importantes α -lactoglobulina e β -lactoglobulina. A α -lactoglobulina é responsável por cerca de 50% das proteínas do soro do leite e tem um alto teor de aminoácidos essenciais. Ela forma um complexo com a β -caseína quando o leite é aquecido a mais de 75 °C, e este complexo interfere nas propriedades funcionais de leite. A desnaturação de α -lactoglobulina origina o sabor cozido de leite aquecido [63].

Quando o pH do leite é alterado, os grupos ácidos ou básicos das proteínas são neutralizados. No pH em que a carga positiva de uma proteína se iguala à carga negativa, a carga líquida total da proteína é zero. Este pH é denominado ponto isoelétrico da proteína (pH 4,6 para a caseína). Assim, quando se adiciona um ácido ao leite, ou quando as bactérias produtoras de ácidos não têm seu crescimento inibido no leite, o pH do mesmo reduz. Uma vez que o pH diminui, a carga sobre a caseína também diminui e esta precipita, o que coalha e azeda o leite [63,66].

1.4.3 Açúcar do leite

A lactose é a maior fração de carboidratos do leite. Ela é constituída por dois tipos de açúcar, a glicose e a galactose (Figura 8). O teor de lactose do leite em média varia entre 4,7 e 4,9%. A mastite reduz a secreção de lactose [63].

Figura 8 – Estrutura química da lactose, constituída pela galactose e glicose.

A lactose é uma fonte de energia para o bezerro e fornece cerca de 4 cal g⁻¹ de lactose metabolizada. Este açúcar é menos solúvel em água do que a sacarose, além de ser menos doce. A lactose pode ser dividida em glicose e galactose por bactérias que possuem a enzima β -galactosidase. A glicose e a galactose, em seguida, podem ser fermentadas para ácido láctico. Isso ocorre quando o leite azeda. Sob condições controladas, também podem ser fermentadas para outros ácidos a fim de dar o sabor desejado, tal como a fermentação do ácido propiônico na fabricação de queijo suíço [63,65].

1.4.4 Sais do leite

Os sais do leite são, principalmente, cloretos, fosfatos e nitratos de sódio, cálcio e magnésio [63,64]. Embora os sais compreendam menos de 1% do leite, eles influenciam na sua taxa de coagulação e de outras propriedades funcionais. Cálcio, magnésio, fósforo e nitrato são distribuídos entre as fases solúveis e coloidais (Tabela 5). Os equilíbrios são alterados por meio de aquecimento, arrefecimento e por alteração no pH do leite [63].

Tabela 5 – Distribuição dos sais do leite entre as fases solúvel e coloidal.

Sais do leite	Fase solúvel (mg mL ⁻¹ de leite)	Fase coloidal (mg mL ⁻¹ de leite)	Total (mg mL ⁻¹ de leite)
Cálcio	0,52	0,80	13,2
Magnésio	0,08	0,03	0,11
Fosfatos	0,36	0,60	0,96
Citrato	1,42	0,15	1,57

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de JOHN WALSH. Milk chemistry - An introduction. Disponível em: <https://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ilca_manual4/Milkchemistry.htm>. Acesso em: 11 de março de 2016.

1.4.5 Vitaminas do leite

O leite contém vitaminas solúveis em gordura, como as vitaminas A, D, E e K, em associação com a fração gorda, e complexo solúvel em água, vitaminas B e C, em associação com a fase aquosa. As vitaminas são instáveis e qualquer processamento pode, portanto, reduzir o teor de vitamina eficaz do leite [63].

1.4.6 Produção de leite no Brasil

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o Brasil produziu vinte e cinco milhões de toneladas de leite bovino em 2007, cerca de 4,8% da quantidade total mundial [67,68]. Uma pesquisa com os cem maiores produtores brasileiros [67,69] mostrou que a produção de leite em 2008 foi de 5,7% superior à de 2007, com um novo aumento em 2009. Esta pesquisa identificou uma melhor produção de leite no sistema *free stall* (29,3 kg/dia por vaca), também conhecido como sistema baia livre, que são baias individuais, nas quais os animais entram e saem espontaneamente para repousarem sobre um piso coberto por uma cama [67].

O resultado da pesquisa representa 44% das explorações. O sistema de estabulação livre é usado em 42% das explorações, com um rendimento médio de 21,8 kg/dia por vaca, enquanto o sistema de pastoreio é adotado em 14% das explorações, com um rendimento médio de 19,3 kg/dia por vaca. A raça de gado principal é a Friesian Dutch (57%), com o decréscimo da participação das raças Girolando, Jersey, Gir e Pardo Suíço. Cruzamentos são frequentes e cerca de 25% das explorações utilizam duas ou mais raças [67].

De acordo com o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, durante o ano de 2009 o Brasil exportou mais de 6.500 toneladas de produtos lácteos, o que permitiu obter uma renda de mais de US\$ 146 milhões [37,70]. Atualmente o Brasil é o sexto maior produtor de leite, correspondendo a 5% da produção mundial, e perde apenas para União Européia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia [37,70,71].

Os valores citados anteriormente demonstram que o leite é um produto de elevada importância econômica e, assim, é necessário um elevado comprometimento com a qualidade do leite bovino produzido.

1.5 Principais métodos analíticos para determinação de resíduos e contaminantes em leite

A grande dificuldade em análises de resíduos e contaminantes em uma matriz tão complexa como o leite, é a alta quantidade de gordura e proteína presentes na mesma, as quais podem interferir nos resultados analíticos [37,72].

Alguns estudos determinaram que existem quatro principais fatores os quais

dificultam a análise de resíduos e contaminantes em leite: as concentrações muito baixas em que as substâncias se encontram; as diferentes classes de compostos que possuem propriedades químicas distintas; a formação de metabólitos; a alta complexidade da matriz [37,72].

As sulfonamidas são geralmente detectadas em alimentos de origem animal por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa (GC) e Eletroforese Capilar (CE) [52,53,73].

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, conhecida como HPLC ou CLAE, é a técnica mais empregada na determinação de resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal, como leite, carne, ovos e mel [52,54,74].

Geralmente, a separação é realizada utilizando-se modo reverso de eluição. Assim, as colunas empregadas são de sílica, quimicamente modificadas com os grupos de caráter apolar butilsilano (C_4), octilsilano (C_8) ou octadecilsilano (C_{18}) [54,56,76,77]. Em alguns casos, também é realizada Cromatografia de Par Iônico, com colunas revestidas por polímeros de troca iônica [54,78]. A fase móvel usada na separação das sulfas consiste em uma mistura de solventes, que pode ser metanol:água, acetonitrila:água ou acetonitrila:metanol:água. A fim de otimizar a separação cromatográfica, compostos como acetato e dodecil sulfato de sódio (SDS) podem ser adicionados à fase móvel [54,79,80]. Um fator determinante na separação das sulfonamidas é o pH da fase móvel, já que a retenção das sulfas depende da ionização das mesmas. Com exceção da sulfanilamida, as sulfas costumam apresentar boa retenção em pH 4,4 [54,56].

A Cromatografia Gasosa (GC) é pouco utilizada devido à difícil volatilização dos antibióticos e exige processos de derivatização da amostra antes da análise cromatográfica, para que as mesmas tornem-se termicamente estáveis [74,75]. Essa derivação normalmente ocorre por metilação, ou metilação seguida de acilação [54,81].

Nas análises por Eletroforese Capilar (CE), o preparo de amostras é semelhante ao descrito para os métodos realizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a separação é controlada com o ajuste adequado do pH do tampão utilizado [54,56].

É importante destacar que os três métodos citados apresentam alto custo, requerem um profissional previamente treinado para execução dos experimentos, requerem preparo da amostra e não podem ser levados ao campo.

1.6 Biossensores

Um biossensor é uma denominação curta de sensor biológico, e consiste em dois componentes: um bioreceptor, que pode ser uma enzima, um anticorpo ou um ácido nucleico, e um transdutor. O bioreceptor é uma biomolécula que reconhece e interage com o analito alvo, enquanto o transdutor converte o reconhecimento em um sinal elétrico mensurável. A singularidade de um biossensor é que os dois componentes são integrados em um mesmo e único sensor. Essa combinação faz com que seja possível detectar o analito alvo sem o uso de reagentes. Em um ensaio convencional, muitas etapas são utilizadas e cada etapa pode requerer um reagente para tratamento da amostra. Assim, a simplicidade e a rapidez da medição são as principais vantagens de um biossensor [85-87].

As principais considerações a serem feitas para o desenvolvimento de um biossensor são: seleção de uma molécula bioreceptora adequada; seleção de um método de imobilização adequado; seleção de um transdutor adequado; projeção do biossensor considerando faixa de medição, linearidade e minimização de interferências; embalagem do biossensor [85-87].

Os biossensores têm se tornado cada vez mais sofisticados, principalmente devido a uma combinação de avanços em dois campos tecnológicos: a microeletrônica e a biotecnologia. A atual tendência é a miniaturização e a produção em massa. Assim, biossensores são dispositivos altamente valiosos para a medição de um amplo espectro de analitos, incluindo compostos orgânicos, gases, íons, bactérias [82-84].

1.6.1 Anidrase carbônica

Anidrases carbônicas são metaloenzimas, usualmente contendo um íon zinco (II) no sítio ativo, que catalisam a hidratação reversível entre dióxido de carbono e água, para gerar bicarbonato e prótons, uma reação de fundamental importância em muitos organismos vivos [85-87]. Elevadas quantidades dessas enzimas são encontradas em diferentes células e tecidos dos organismos mais investigados [85].

São conhecidas quatorze isoformas de anidrase carbônica em mamíferos, sendo cinco as principais geneticamente distintas: alfa-, beta-, gama-, delta- e

zeta-anidrase carbônica [85,88]. O íon metálico encontra-se coordenado com três resíduos de histidina nas isoformas alfa-, gama- e delta-anidrases carbônicas. Já nas zeta-anidrases carbônicas, a coordenação do íon metálico com o sítio ativo é bastante similar às beta-anidrases carbônicas, com uma histidina, duas cisteínas e uma molécula de água agindo como ligante dos íons zinco (II) ou cádmio (II) [86].

A reação catalisada pelas anidrases carbônicas é essencial na regulação do balanço ácido-base nos organismos de toda árvore filogenética, o que justifica o fato de que essas enzimas se encontram presentes em uma vasta variedade de classes e isoformas. De fato, a reação de catálise auxilia na remoção de dióxido de carbono fora dos tecidos, sendo também envolvida em reações biossintéticas, como a gluconeogênese e a ureagênese [89].

Descobertas há cerca de oitenta anos, as anidrases carbônicas foram muito investigadas, principalmente devido às aplicações biomédicas apresentadas pelos seus inibidores. Medicamentos a base de sulfonamidas, os quais interferem na atividade das anidrases carbônicas, são clinicamente usados há quase 60 anos. A inibição da anidrase carbônica (Figura 9) possui aplicações farmacológicas em diversos campos, tais como agentes e ferramentas de diagnóstico antiglaucoma, anticonvulsivo, antiobesidade e anticancerígeno [85-87].

Figura 9 – Representação genérica de inibição do sítio ativo da anidrase carbônica por sulfonamida.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CASINI, A. Carbonic anhydrase inhibitors. **DOI 10.1002/med.** 10025, p. 146-188, Italy.

1.7 Fabricação de dispositivos microfluídicos em papel (μPAD) através de impressão com cera

O processo de fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel, μPAD, através de impressão com cera envolve duas principais etapas: a impressão da

cera sobre a superfície do papel e o derretimento da cera no papel, de modo a formar barreiras hidrofóbicas. O método de impressão com cera é rápido, barato e particularmente bem adequado para a produção de grandes quantidades (centenas e milhares) de μ PAD, além de envolver um menor número de etapas, quando comparado a outros métodos de fabricação de microdispositivos em papel [90].

Com a impressão de cera é possível fabricar cerca de 100 a 200 μ PAD em uma única folha de papel, com aquecimento em torno de 5 minutos. Assim, os microdispositivos podem ser produzidos por cerca de \$ 0,01/cm², usando papel de cromatografia Whatman® (\$7/m², aproximadamente). O custo da tinta sólida é em torno de \$ 0,0001/cm² de papel, assumindo 20% de cobertura de tinta [90].

Os principais componentes de uma impressora a cera do tipo Xerox Phaser (Figura 10) são mostrados a seguir [91].

Figura 10 – Vista detalhada dos componentes de uma impressora a cera.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir JAEGER, C. W. How does a solid ink printer work? 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 16/03/2016.

O processo de impressão com cera de uma imagem no papel se baseia em três etapas [91]:

(I) A superfície do cilindro de impressão é limpa, pelo *kit* de manutenção, de

qualquer tinta residual de alguma impressão anterior e aplica-se então uma camada extremamente fina de óleo de silicone na superfície do cilindro de impressão de alumínio anodizado limpo;

(II) Gotas microscópicas de tinta fundida (aquecimento uniforme a 135 °C) são depositadas sobre o cilindro de impressão rotativo, de maneira bastante precisa (Figura 11). O cilindro de impressão é então mantido a uma temperatura intermediária de 65 °C. Assim, quando as gotas de tinta atingem a superfície oleosa do cilindro de impressão, elas se modificam quase instantaneamente do estado de líquido fundido para o estado de semi-sólido maleável;

Figura 11 – Transferência da tinta fundida para o cilindro de impressão.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir JAEGER, C. W. How does a solid ink printer work? 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 16/03/2016.

(III) O papel a ser impresso passa através de um pré-aquecedor em uma zona de pressão formada por um rolo de pressão e o cilindro de impressão. Sob calor e pressão, ocorre a transferência de imagem do cilindro no papel, em uma única passagem (Figura 12). Por fim, quando o papel sai da impressora, a tinta (cera) está completamente definida e a impressão pode ser imediatamente utilizada.

Figura 12 – Transferência da imagem do cilindro de impressão para o papel.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir JAEGER, C. W. How does a solid ink printer work? 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 16/03/2016.

1.8 Detecção de ensaios colorimétricos

A detecção colorimétrica é amplamente utilizada em dispositivos microfluídicos de papel, nos casos em que saber se um fator é positivo ou negativo, ou resultado semi-quantitativo, é o suficiente para a análise. Trata-se da técnica mais simples, baseada na alteração de cor, a qual pode ser visualizada devido a interações químicas ou enzimáticas. O primeiro a utilizar a técnica foi Martinez e colaboradores, para análises de glicose e proteína, em que a alteração de cor era observada quando a amostra introduzida no microdispositivo alcançava a zona de reação do mesmo [2,92].

Embora esta técnica não exija instrumentação adicional, ela não é tão precisa em comparação a técnicas como espectroscopia UV-visível e espectroscopia de absorção atômica. Isto se deve principalmente ao fato da interpretação visível da cor ser diferente para cada indivíduo, além das condições de luz do ambiente e do substrato do papel (seco ou úmido) também influenciarem nas análises [2].

A fim de melhorar a precisão e sensibilidade deste método, Martinez e

colaboradores mediram alterações visíveis de cor utilizando uma câmera de celular ou *scanner*. A imagem foi capturada e transferida para um computador, onde as colorações foram interpretadas com auxílio de um *software* de imagem (Figura 13). Assim, um valor de pixel é relacionado com a concentração da substância analisada. Com este sistema, é possível construir gráficos de maneira que a análise dos dados pode ser facilmente interpretada [2,4].

Figura 13 – Detecção de ensaio colorimétrico por análise em software comercial.

Fonte: Adaptação de Rafanhin (2016) a partir de MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMASIII, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple telemedicine for developing regions: câmera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v.80, n. 10, p. 3699-3707, 2008.

1.9 Motivações para o desenvolvimento de μ PAD

Sensores fabricados em papel em micro escala apresentam-se como uma nova alternativa de tecnologia, por apresentarem as seguintes características e vantagens:

- São dispositivos extremamente simples, de fácil e rápida fabricação, de maneira que não necessitam de um profissional altamente treinado para a sua produção [1-3];
- Requerem uma mínima infra-estrutura, de forma que os equipamentos necessários para sua fabricação não apresentam custo elevado [1,3];
- São dispositivos de fácil utilização e podem ser usados remotamente, o que proporciona que pessoas comuns da população sejam capazes de utilizá-los a partir de simples instruções [1,3,17,93];
- São portáteis, descartáveis e biodegradáveis, podendo ser transportados para áreas carentes e de difícil acesso, com posterior descarte que não prejudique o meio ambiente [2,3,17,29,93,94];
- Apresentam baixo custo, de forma que com uma única folha de papel é possível fabricar até 200 microdispositivos (dependendo do *layout* que melhor atenda a análise a ser realizada), com um custo de impressão correspondente a menos de dez centavos de dólar [1-3,15,17,93-96];
- Requerem um baixo volume de reagentes e amostras, de forma que o volume de reagentes varia em torno de 0,5 μ L a 1,0 μ L, e o volume de amostras, de 10,0 μ L a 20,0 μ L, em média [3,29,93,95];
- São capazes de fornecer resultados semi-quantitativos de vários analitos em uma amostra desconhecida e soluções-padrão utilizando um conjunto de dispositivos [1,94];
- Possibilitam integrar diversos procedimentos analíticos em um único dispositivo [4,3,29];
- Mostram-se como um método analítico compatível com diversas aplicações nas áreas de química e bioquímica médica [3,17];
- Podem ser usados como moldes para materiais finos, como películas usadas para encapsular medicamentos [17];
- Podem ser usados como plataforma de cultura de células em 3D e análise de

células em 3D [17];

- São compatíveis com produtos químicos e bioquímicos, o que torna a utilização do papel como uma plataforma de detecção bastante interessante para vastas aplicações, como diagnósticos clínicos, controle de qualidade de alimentos e monitoramento ambiental [2].

Entre as limitações do uso do papel como método de análise em micro escala, destacam-se a precisão e a sensibilidade [17]. Ainda assim, como as vantagens desse método são inúmeras quando comparadas às limitações, o mesmo torna-se então um tipo de sensor bastante promissor.

2 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um biossensor como novo método analítico, simples e de baixo custo, para detecção de resíduos de antibióticos (sulfonamidas) em amostras de leite bovino no campo (diagnóstico *Point-of-Care*).

2.1 Objetivos específicos

- Fabricar os dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD);
- Determinar o melhor tipo de papel a ser usado na análise;
- Determinar o pH ótimo da enzima anidrase carbônica e da isoforma anidrase carbônica II, bem como avaliar qual apresenta o melhor desempenho na análise;
- Avaliar a ordem de imobilização dos reagentes nas diferentes regiões do microdispositivo;
- Analisar as três principais sulfonamidas que requerem controle segundo a ANVISA e o PAMVet: sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfatiazol;
- Otimizar os microdispositivos (melhorar tempo de análise, diminuir o volume de reagentes e amostras, melhorar o limite de detecção);
- Construir curvas analíticas e analisar a viabilidade do método.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; tampão tris-HCl; enzima anidrase carbônica, proveniente de eritrócitos bovinos (2000 W-A U g⁻¹); enzima anidrase carbônica II, proveniente de eritrócitos bovinos (3000 W-A U g⁻¹); 4-nitrofenil acetato (CH₃CO₂C₆H₄NO₂, MM: 181,15 g mol⁻¹); soluções para calibração do pHmetro; hidróxido de amônio (NH₄OH, MM: 35,05 g mol⁻¹); acetona (CH₃COCH₃, MM: 58,08 g mol⁻¹); gelatina comercial incolor; metil celulose; sulfametazina (C₁₂H₁₄N₄O₂S, MM: 278,33 g mol⁻¹); sulfadimetoxina (C₁₂H₁₄N₄O₄S, MM: 310,33 g mol⁻¹); sulfatiazol (C₉H₉N₃O₂S₂, MM: 255,32 g mol⁻¹); leite orgânico integral obtido no comércio local da cidade de São Carlos.

3.2 Materiais e equipamentos

Micropipetas; tubos Falcon; tubos Eppendorf; béquer; balança analítica; pHmetro; cronômetro; papel de filtro comum; papel cromatográfico Whatman® nº 1 (folhas grandes cortadas em tamanho de carta, no laboratório); digitalizador de mesa; impressora a cera Xerox® Phaser 8560; prensa térmica; microondas caseiro; computador com o *software* comercial Adobe Photoshop® CS2.

3.3 Princípios da reação

A anidrase carbônica em contato com ésteres, como o 4-nitrofenil acetato, origina acetato e nitrofenolato, o qual forma ânions de coloração amarelo brilhante. Na presença do inibidor (sulfonamida), essa reação não ocorre, não havendo assim o aparecimento da cor amarela (Figura 14) [97].

Figura 14 – Reação química entre anidrase carbônica (AC) e 4-nitrofenil acetato, na ausência e presença de sulfonamida.

Fonte: Autoria própria.

Assim, o microdispositivo de papel deve ser composto por dois *spots*, região onde são aplicados os reagentes e, posteriormente, observada a alteração de cor decorrente de reação química.

Quando aplicada no dispositivo, a amostra (leite) encontra o primeiro *spot* contendo anidrase carbônica (ou acetato de 4-nitrofenil), segue para o segundo *spot*, e ao entrar em contato com o acetato de 4-nitrofenil (ou anidrase carbônica), caso a sulfonamida esteja presente na amostra, a anidrase carbônica é inibida, impedindo a hidrólise do 4-nitrofenil acetato e, conseqüentemente, impedindo o aparecimento da coloração amarelo brilhante.

3.4 Layout dos dispositivos

Considerando os princípios de reação, dois *layouts* de microdispositivos foram desenhados utilizando-se o *software* Corel Draw X6®. O *layout* do tipo p-ELISA apresenta um único *spot* para uma mesma reação, enquanto o outro requer dois *spots* (Figura 15), sendo um para imobilização da enzima e outro para aplicação do éster.

Figura 15 – Representação dos layouts de microdispositivos desenhados e suas respectivas zonas reacionais.

Fonte: Autoria própria.

3.5 Impressão e tratamento térmico

Vários dispositivos correspondentes aos *layouts* previamente desenhados no computador foram impressos através de uma impressora a cera Xerox® Phaser 8560, em papel cromatográfico Whatman® nº 1 e em papel de filtro comum.

Com os microdispositivos já impressos, cada folha contendo um *layout* de microdispositivo foi submetida a um tratamento térmico de 150 °C durante 2 minutos, através de uma prensa térmica (Figura 16). Esta etapa tem como finalidade fazer com que a cera atravessasse as fibras do papel, originando canais hidrofóbicos e formando canais capilares hidrofílicos em ambos os lados do papel [96].

Figura 16 – Esquema geral da fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD).

Fonte: Autoria própria.

3.6 Análise do pH ideal para atividade da anidrase carbônica

Duas isoformas da anidrase carbônica foram avaliadas: anidrase carbônica e anidrase carbônica II, ambas provenientes de eritrócitos bovinos.

Inicialmente, preparou-se uma solução de 4-nitrofenil acetato $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em água desionizada. Em seguida, foi preparada uma solução tampão tris-HCl 50 mmol L^{-1} . Essa solução foi alíquotada em cinco tubos Falcon e o pH ajustado para 3,0; 5,0; 7,0; 7,5 e 9,0, respectivamente.

Em seguida, $1,0 \text{ mL}$ de cada solução foi alíquotado em dois tubos Eppendorf. Assim, para cada pH, foram feitas duas soluções de concentração $100,0 \text{ U mL}^{-1}$, sendo uma com a enzima anidrase carbônica e outra com a isoforma anidrase carbônica II.

No *spot* do microdispositivo do tipo p-ELISA, foram aplicados $5,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de 4-nitrofenil acetato $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Após secagem, aplicou-se a solução contendo enzima. O tempo de secagem foi cronometrado. A coloração final foi observada a fim de se estabelecer o pH ótimo para a atividade das enzimas anidrase carbônica e a isoforma anidrase carbônica II.

3.7 Avaliação do efeito do solvente na diluição das sulfonamidas

3.7.1 Diluição em hidróxido de amônio

Inicialmente, como recomendação do fabricante, cada sulfonamida (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi diluída em hidróxido de amônio e, posteriormente, adicionada em água desionizada, nas seguintes concentrações finais, em $\mu\text{mol L}^{-1}$: 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0.

Em seguida, um primeiro ensaio esquemático da análise das sulfonamidas em microdispositivos de papel foi realizado. Assim, no primeiro *spot* de cada μPAD foram adicionados 3,0 μL de solução 100,0 U mL^{-1} de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50 mmol L^{-1}), pH 7,5. No segundo *spot*, aplicou-se 4,0 μL de solução de 4-nitrofenil acetato 1,0 mg mL^{-1} . Após secagem dos reagentes, 20,0 μL de água desionizada contendo sulfametazina diluída em hidróxido de amônio foram introduzidos no dispositivo. Em cada μPAD foi testada uma concentração de sulfametazina.

O procedimento aqui descrito para a sulfametazina foi repetido de forma análoga para a sulfadimetoxina e sulfatiazol.

Após os resultados obtidos, prepararam-se novas soluções de cada sulfonamida, também diluídas em hidróxido de amônio, todas com concentração final em água desionizada de 1,0 mol L^{-1} . O mesmo procedimento acima foi repetido para as três soluções.

Em seguida dos resultados observados, 5,0 μL da solução 1,0 mg mL^{-1} de 4-nitrofenil acetato foram aplicados em um *spot* de p-ELISA. Após secagem, aplicou-se 5,0 μL de hidróxido de amônio (solvente puro, sem sulfonamida diluída) e o resultado foi observado.

3.7.2 Diluição em acetona

Com base nos resultados observados nos testes do item 3.7.1, em um *spot* de p-ELISA, foram aplicados 5,0 μL da solução 1,0 mg mL^{-1} de 4-nitrofenil acetato. Após secagem, aplicou-se 5,0 μL de acetona (solvente puro, sem sulfonamida diluída) e o resultado foi observado.

3.8 Ordem de imobilização dos reagentes no papel

Uma vez que o microdispositivo usado para esta análise apresenta dois *spots*, pode-se então imobilizar os reagentes (enzima e éster) em ordens distintas (Figura 17).

Figura 17 – Representação das possíveis ordens de imobilização dos reagentes (enzima e éster) nos *spots* dos microdispositivos.

Fonte: Autoria própria.

Assim, em um primeiro μ PAD foram aplicados 3,0 μ L de solução 100,0 U mL⁻¹ de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50 mmol L⁻¹), pH 7,5 no primeiro *spot* e 4,0 μ L de solução de 4-nitrofenil acetato 1,0 mg mL⁻¹, no segundo *spot*.

Em um segundo microdispositivo, a ordem de imobilização dos reagentes foi inversa. Aplicaram-se 3,0 μ L da solução de 4-nitrofenil acetato no primeiro *spot* e no segundo *spot*, 4,0 μ L da solução contendo anidrase carbônica.

Por fim, 20,0 μ L de água desionizada foram introduzidos em ambos os μ PAD. Os resultados foram observados após secagem completa.

O mesmo procedimento foi repetido, porém com volumes iguais (3,0 μ L) de solução contendo enzima e éster.

3.9 Análise com amostras de leite bovino

Inicialmente, cada sulfonamida (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi diluída em acetona e, posteriormente, adicionada ao leite orgânico integral, nas seguintes concentrações finais, em μ mol L⁻¹: 0,0 (branco); 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 20,0; 25,0 30,0; 35,0 e 40,0.

Em seguida, no primeiro *spot* de cada μ PAD foram adicionados 3,0 μ L de solução 100,0 U mL⁻¹ de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50

mmol L⁻¹), pH 7,5. No segundo *spot*, aplicou-se 4,0 µL de solução de 4-nitrofenil acetato 1,0 mg mL⁻¹. Após secagem dos reagentes, 20,0 µL de leite contendo sulfametazina foram introduzidos no dispositivo. Cada concentração de sulfametazina foi testada em um µPAD.

O procedimento aqui descrito para a sulfametazina foi repetido de forma análoga para a sulfadimetoxina e sulfatiazol. O mesmo procedimento foi executado com a isoforma anidrase carbônica II.

Procedimentos iguais foram executados em papel cromatográfico Whatman[®] nº 1 e papel de filtro comum.

3.10 Otimização do dispositivo microfluídico em papel (µPAD)

Um novo *layout* de microdispositivo foi desenhado utilizando-se o *software* Corel Draw X6[®] (Figura 18), variando-se a largura dos canais capilares em 2 mm (base) e 3 mm (tronco) – chip 1; 3 mm (base) e 2 mm (tronco) – chip 2; 4 mm (base e tronco) – chip 3. Além disso, a barreira hidrofóbica foi reforçada, de forma a cobrir toda a região do µPAD que não fosse canal capilar.

Figura 18 – Layout do µPAD otimizado e suas respectivas dimensões em milímetros (mm).

Fonte: Autoria própria.

Os dispositivos foram impressos em papel cromatográfico Whatman[®] nº 1, na impressora a cera Xerox[®] Phaser 8560 e, por fim, submetidos a tratamento térmico na prensa a 150 °C, durante 2 minutos.

3.10.1 Dimensões do dispositivo, volume e tempo de fluxo do leite

Em cada novo microdispositivo fabricado com respectiva largura de microcanal capilar, foram aplicados 15,0 μL de leite orgânico integral. O tempo de fluxo do leite foi cronometrado.

3.11 Otimização da análise em microdispositivos de papel (μPAD)

3.11.1 Otimização usando baixa concentração de enzima

Inicialmente, preparou-se uma solução 50,0 U mL^{-1} de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50 mmol L^{-1}), pH 7,5.

Em seguida, cada sulfonamida (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi diluída em acetona e, posteriormente, adicionada ao leite integral, nas seguintes concentrações finais, em $\mu\text{mol L}^{-1}$: 0,0 (branco); 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 20,0; 25,0 30,0; 35,0 e 40,0.

Assim, no primeiro *spot* de cada microdispositivo foram adicionados 3,0 μL da solução contendo a enzima anidrase carbônica e no segundo spot, 3,0 μL de solução 1,0 mg mL^{-1} de 4-nitrofenil acetato.

Após secagem dos reagentes, 15,0 μL de leite contendo sulfametazina foram introduzidos em cada dispositivo. Cada concentração de sulfametazina foi testada em um μPAD .

O procedimento descrito aqui para a sulfametazina foi repetido de forma análoga para a sulfadimetoxina e sulfatiazol.

3.11.2 Otimização usando alta concentração de enzima

Foi preparada uma solução 200,0 U mL^{-1} de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50 mmol L^{-1}), pH 7,5.

Posteriormente, cada sulfonamida (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi diluída em acetona e, posteriormente, adicionada ao leite integral, nas seguintes concentrações finais, em $\mu\text{mol L}^{-1}$: 0,0 (branco); 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 20,0; 25,0 30,0; 35,0 e 40,0.

Assim, no primeiro *spot* de cada microdispositivo foram adicionados 3,0 μL da

solução contendo a enzima anidrase carbônica e no segundo spot, 3,0 µL de solução 1,0 mg mL⁻¹ de 4-nitrofenil acetato.

Após secagem dos reagentes, 15,0 µL de leite contendo sulfametazina foram introduzidos em cada dispositivo. Cada concentração de sulfametazina foi testada em um µPAD.

O procedimento descrito aqui para a sulfametazina foi repetido de forma análoga para a sulfadimetoxina e sulfatiazol.

3.12 Aplicação de reagentes para otimização da superfície reacional do papel

3.12.1 Imobilização de gelatina comercial incolor no papel

Inicialmente, preparou-se gelatina comercial incolor no laboratório, com auxílio de microondas caseiro.

Em seguida, preparou-se uma solução 200,0 U mL⁻¹ de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50 mmol L⁻¹), pH 7,5.

Posteriormente, cada sulfonamida (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi diluída em acetona e, posteriormente, adicionada ao leite integral, nas seguintes concentrações finais, em µmol L⁻¹: 0,0 (branco); 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 20,0; 25,0 30,0; 35,0 e 40,0.

Antes de se adicionar os reagentes, foi aplicada com espátula uma fina camada uniforme da gelatina incolor, no segundo *spot* de cada µPAD. Após secagem da gelatina no papel, foram adicionados 3,0 µL da solução contendo a enzima anidrase carbônica no primeiro *spot*, e 3,0 µL de solução 1,0 mg mL⁻¹ de 4-nitrofenil acetato no segundo *spot* (por cima da gelatina).

Após secagem dos reagentes, 15,0 µL de leite contendo sulfametazina foram introduzidos em cada dispositivo. Cada concentração de sulfametazina foi testada em um µPAD.

O procedimento descrito aqui para a sulfametazina foi repetido de forma análoga para a sulfadimetoxina e sulfatiazol.

3.12.2 Imobilização de metil celulose no papel

Foi preparada uma pasta gelatinosa de metil celulose em água desionizada.

Posteriormente, preparou-se uma solução $200,0 \text{ U mL}^{-1}$ de enzima anidrase carbônica diluída em tampão tris-HCl (50 mmol L^{-1}), pH 7,5.

Em seguida, cada sulfonamida (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi diluída em acetona e, posteriormente, adicionada ao leite integral, nas seguintes concentrações finais, em $\mu\text{mol L}^{-1}$: 0,0 (branco); 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 20,0; 25,0 30,0; 35,0 e 40,0.

Antes de se adicionar os reagentes, foi aplicada com espátula uma fina camada uniforme da pasta gelatinosa de metil celulose, no segundo *spot* de cada μPAD . Após secagem dessa pasta no papel, foram adicionados $3,0 \mu\text{L}$ da solução contendo a enzima anidrase carbônica no primeiro *spot*, e $3,0 \mu\text{L}$ de solução $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de 4-nitrofenil acetato no segundo *spot* (por cima da metil celulose).

Após secagem dos reagentes, $15,0 \mu\text{L}$ de leite contendo sulfametazina foram introduzidos em cada dispositivo. Cada concentração de sulfametazina foi testada em um μPAD .

O procedimento descrito aqui para a sulfametazina foi repetido de forma análoga para a sulfadimetoxina e sulfatiazol.

3.13 Análise das imagens por software comercial

Após a realização de cada bioensaio, a imagem dos microdispositivos foi transferida para o computador através de um digitalizador de mesa (*scanner*). A região colorida em cada μPAD foi analisada com auxílio do software comercial Adobe Photoshop® CS2.

Assim, a área de interesse (*spot* colorido) foi selecionada e avaliou-se a intensidade média de pixels no canal de interesse em canal amarelo do CMYK (*Cyan, Magenta, Yellow, Key (Black)*), uma vez que este é o canal correspondente à coloração do teste, que também é amarela. Este canal em digitalização binária de 8 bits ($2^8 = 256$) varia em uma escala de 0 (correspondente à cor preta) a 255 (correspondente à cor branca) unidades arbitrárias (u.a.). Assim, quanto mais amarela a cor (sem inibição de sulfonamida), a média de pixels é mais próxima de 0, e quanto mais branca a cor (com inibição de sulfonamida), a média de pixels é mais próxima de 255.

Em seguida, curvas de padronização foram construídas a partir da intensidade média de pixels e os respectivos valores de concentração do analito (sulfonamidas).

A partir das curvas analíticas, as principais figuras de mérito foram determinadas, para avaliação da viabilidade do método desenvolvido.

3.14 Figuras de mérito e análise da viabilidade do método

3.14.1 Curva analítica, linearidade e sensibilidade

Para cada ensaio de determinada sulfonamida, construiu-se um gráfico que correlaciona as diferentes concentrações de sulfonamida no leite e o número médio de pixels, medido no canal amarelo do CMYK, referente a cada concentração.

Assim, para cada resultado, após a determinação da faixa linear de trabalho, construiu-se uma curva analítica e determinou-se a sensibilidade do método, através da equação obtida pela curva [98].

Para o melhor resultado obtido (aquele com menor limite de detecção), a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), pela tabela ANOVA (teste F) e pelo gráfico de resíduos.

3.14.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para cada ensaio realizado com determinada sulfonamida, foram estabelecidos os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), através dos gráficos que correlacionam as diferentes concentrações de sulfonamida no leite com o número médio de pixels referente a cada concentração, pelo método de regressão linear. Assim, o limite de detecção (LOD) foi determinado sendo três vezes o desvio padrão do branco, dividido pelo coeficiente angular da reta, e o limite de quantificação (LOQ), dez vezes o desvio padrão do branco, dividido pelo coeficiente angular da reta [98].

3.14.3 Seletividade e especificidade

A seletividade, ausência de interferências no teste decorrente de outros componentes da matriz que não seja o analito [98], foi avaliada aplicando-se leite orgânico normalmente nos dispositivos, porém sem prévia contaminação com qualquer sulfonamida (branco). O mesmo ensaio foi repetido usando-se água

desionizada ao invés de leite. As colorações de ambos os ensaios foram comparadas.

A especificidade, resposta do teste para um único analito [98], foi avaliada contaminando-se uma mesma amostra de leite orgânico com as três sulfonamidas testadas (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol). Em seguida, as mesmas sulfonamidas foram combinadas duas a duas, alternadamente, de maneira que a concentração final de sulfas no leite foi a mesma ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) para todos os ensaios.

A seletividade e especificidade foram avaliadas apenas para o melhor resultado obtido (menor limite de detecção).

3.14.4 Estabilidade colorimétrica

Após a determinação do melhor resultado, ou seja, aquele que apresentou o menor limite de detecção, o mesmo foi observado e analisado (degradação ou não da cor) nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas.

3.14.5 Robustez

Após a determinação do melhor resultado (menor limite de detecção), o mesmo foi repetido com amostras de leite, contaminadas com as respectivas sulfonamidas, em três diferentes temperaturas: 4°C (leite armazenado em geladeira); temperatura ambiente (aproximadamente 25°C); leite morno (em torno de 28 a 29°C).

Assim, a robustez [98] do teste foi avaliada quanto a alterações na temperatura da amostra.

3.15 Descarte de resíduos gerados

Os dispositivos microfluídicos de papel (μPAD) são descartáveis e biodegradáveis. Entretanto, quando são utilizados para análise de compostos tóxicos (sulfonamidas), os mesmos não devem entrar em contato com o meio ambiente. Assim, após a realização dos ensaios, os microdispositivos foram facilmente incinerados em laboratório.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD)

O princípio fundamental da técnica de fabricação dos μ PAD consiste no contraste entre hidrofiliicidade e hidrofobicidade sobre uma folha de papel, a fim de criar canais capilares em micro escala [17]. Na Figura 19 são mostradas duas plataformas analíticas μ PAD de acordo com os desenhos projetados e mostrados na Figura 15.

Figura 19 – Plataformas μ PAD para dois tipos de ensaios analíticos: zonas reacionais isoladas ou teste de fluxo lateral. Contraste entre as regiões hidrofóbicas (cera em coloração preta) e hidrofílicas (canais capilares) em dispositivos microfluídicos de papel.

Fonte: Autoria própria.

4.2 Análise do pH ideal para atividade da anidrase carbônica

De acordo com a literatura [99], o pH ótimo da enzima anidrase carbônica, proveniente de eritrócitos bovinos, é 7,5. Os resultados da análise do pH da anidrase carbônica e da isoforma anidrase carbônica II são mostrados na Figura 20. Por se tratar apenas da avaliação do pH da enzima, o ensaio foi realizado somente em papel Whatman® nº 1.

Figura 20 – Avaliação do pH ideal para atividade das enzimas anidrase carbônica e anidrase carbônica II.

Fonte: Autoria própria.

Como se pode observar pela coloração amarela, apenas no pH 7,5 em contraste com as demais condições reacionais, foi determinado que o melhor pH de atividade das enzimas anidrase carbônica e anidrase carbônica II, é 7,5, como previsto pela literatura.

O tempo de origem da coloração foi de 2 minutos para a anidrase carbônica II e 3 minutos para a anidrase carbônica. Essa pequena diferença se deve ao fato da isoforma anidrase carbônica II apresentar uma cinética de reação mais rápida que a enzima anidrase carbônica.

Assim, os demais testes seguiram com valor de pH 7,5 para ambas as enzimas.

4.3 Avaliação do efeito do solvente na diluição das sulfonamidas

4.3.1 Diluição em hidróxido de amônio

Um primeiro ensaio esquemático utilizando água desionizada (ao invés de leite) contaminada com as respectivas sulfonamidas foi realizado, a fim de se testar a reatividade dos reagentes e também dos contaminantes (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol). Por se tratar se um ensaio esquemático, apenas a enzima anidrase carbônica foi testada, em papel Whatman[®] nº 1.

O ensaio foi realizado separadamente para cada sulfonamida e o resultado obtido foi o mesmo para todas, mostrado na Figura 21.

Figura 21 – Ensaio esquemático utilizando hidróxido de amônio como solvente preliminar das sulfonamidas. As concentrações de sulfonamida (3; 5; 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) utilizadas em cada dispositivo apresentam-se nos mesmos.

Fonte: Autoria própria.

O resultado, diferentemente do esperado, não apresentou inibição da enzima por parte das sulfonamidas em nenhuma das concentrações avaliadas. Acreditando-se que esse resultado tenha sido decorrente de uma falha no processo de inibição, extrapolou-se a concentração de cada sulfonamida em água desionizada para $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O resultado obtido (Figura 22) foi o mesmo para as três sulfonamidas.

Figura 22 – Ensaio esquemático para sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol, respectivamente, todas em alta concentração e previamente diluídas em hidróxido de amônio.

Fonte: Autoria própria.

Como observado, mesmo extrapolando-se as concentrações das sulfonamidas, as mesmas não inibiram a reação entre a enzima anidrase carbônica e o éster.

Realizou-se então um teste em um *spot* de microdispositivo do tipo p-ELISA, para avaliar uma possível interferência do hidróxido de amônio como solvente das sulfonamidas. No mesmo *spot*, foram aplicados apenas o éster 4-nitrofenil acetato e, em seguida, o solvente hidróxido de amônio puro. O resultado é mostrado na

Figura 23.

Figura 23 – Avaliação da interferência do hidróxido de amônio como solvente.

Fonte: Autoria própria.

Como se pode observar, a coloração amarela indica reação entre a enzima e o hidróxido de amônio usado como solvente das sulfonamidas. Assim, nos ensaios esquemáticos anteriores, a reação não ocorria entre a enzima e o éster, de forma que as sulfonamidas, mesmo em concentrações muito altas, não inibiam tal reação.

4.3.2 Diluição em acetona

Devido à interferência observada pelo hidróxido de amônio, um novo teste em *spot* de p-ELISA (Whatman® nº1) foi realizado, aplicando-se a enzima anidrase carbônica e, em seguida, acetona. O resultado é mostrado na Figura 24.

Figura 24 – Avaliação da interferência da acetona como solvente.

Fonte: Autoria própria.

Como observado, não houve alteração de cor, o que indica que a acetona não reage com o éster. Assim, os demais ensaios foram realizados com acetona como solvente prévio das três sulfonamidas.

4.4 Ordem de imobilização dos reagentes no papel

De acordo com os princípios da reação, descritos no item 3.3, havia duas possíveis ordens de aplicação da enzima e o do éster, em diferentes *spots* do μ PAD.

Inicialmente, em um μ PAD fabricado em papel cromatográfico Whatman® nº1,

a anidrase carbônica (3,0 μL) foi imobilizada no primeiro *spot* e o 4-nitrofenil acetato (4,0 μL), no segundo *spot*. O resultado é mostrado na Figura 25.

Figura 25 – Ensaio realizado com imobilização da enzima no primeiro *spot* e do éster no segundo *spot*, em volumes diferentes. (A) Ensaio antes da aplicação da amostra. (B) Ensaio após aplicação da amostra.

Fonte: Autoria própria.

Como observado, com esta ordem de imobilização dos reagentes, a reação entre a enzima e o éster ocorreu.

O procedimento foi repetido invertendo-se a ordem de aplicação dos reagentes. Assim, o 4-nitrofenil acetato (3,0 μL) foi imobilizado no primeiro *spot* e a anidrase carbônica (4,0 μL), no segundo *spot*. O resultado é mostrado na Figura 26.

Figura 26 – Ensaio realizado com imobilização do éster no primeiro *spot* e da enzima no segundo *spot*, em volumes diferentes. (A) Ensaio antes da aplicação da amostra. (B) Ensaio após aplicação da amostra.

Fonte: Autoria própria.

Nenhum indício de reação entre a enzima e o éster foi observado ao se inverter a ordem de imobilização dos reagentes nos *spots* do microdispositivo. A idéia inicial com relação a esse fato estava relacionada com as diferentes quantidades de enzima e éster aplicados nos *spots*.

Um novo ensaio foi repetido com as mesmas ordens de aplicação dos reagentes, porém ambos em mesmo volume (3,0 μL). O resultado é mostrado na

Figura 27.

Figura 27 – Ensaio para avaliação da ordem de imobilização dos reagentes no papel. (A) Imobilização da enzima no primeiro spot e do éster no segundo spot, ambos em mesmo volume. (B) Imobilização do éster no primeiro spot e da enzima no segundo spot, ambos em mesmo volume.

Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, pode-se concluir que os volumes de enzima e éster nada interferem. Este resultado não era esperado, no entanto, mostrou que a reação depende da ordem de imobilização dos reagentes e ocorre apenas quando a anidrase carbônica, por capilaridade, se encontra com o éster, que permanece imóvel durante toda a reação.

Assim, os ensaios seguintes foram realizados imobilizando-se a enzima no primeiro *spot* e o éster, no segundo *spot*.

4.5 Análise com amostras de leite bovino

Uma vez que os parâmetros básicos para o desenvolvimento do teste, como pH ótimo da enzima, melhor solvente para as sulfonamidas e ordem de imobilização dos reagentes no papel foram determinados, o desenvolvimento do método teve prosseguimento.

O primeiro ensaio completo foi realizado, utilizando-se leite orgânico integral bovino, obtido no comércio local da cidade de São Carlos.

O leite orgânico foi escolhido por não conter contaminantes, como as sulfonamidas. O animal, quando criado em sistema orgânico, encontra-se livre de dosagens de antibióticos além das recomendadas, o que não gera resíduos no leite nem na carne.

O leite orgânico também foi escolhido na forma integral para a realização dos ensaios, por conter um teor de gordura próximo ao do leite *in natura*, fator

importante na avaliação do tempo de fluxo do leite nos μ PAD.

Os ensaios foram realizados, como descrito no item 3.9, em microdispositivos fabricados em papel cromatográfico Whatman[®] n^o 1 e papel de filtro comum.

Os resultados obtidos pelos ensaios realizados em papel cromatográfico Whatman[®] n^o 1, são mostrados a seguir, para a sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol, respectivamente (Figuras 28 a 31).

Figura 28 – Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, em papel cromatográfico Whatman[®] n^o 1.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29 – Curva analítica para a sulfametazina. (A) Curva analítica para o ensaio usando anidrase carbônica. (B) Curva analítica para o ensaio usando anidrase carbônica II.

Fonte: Autoria própria.

Figura 30 – Curva analítica para a sulfadimetoxina. (A) Curva analítica para o ensaio usando anidrase carbônica. (B) Curva analítica para o ensaio usando anidrase carbônica II.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31 – Curva analítica para o sulfatiazol. (A) Curva analítica para o ensaio usando anidrase carbônica. (B) Curva analítica para o ensaio usando anidrase carbônica II.

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios colorimétricos realizados para a sulfadimetoxina e sulfatiazol mostraram-se semelhantes, visualmente, ao ensaio referente à sulfametazina. O

tempo total de análise variou de 25 a 30 minutos.

Os dados obtidos pelo método de regressão linear a partir das curvas analíticas para cada sulfonamida encontram-se sintetizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente aos ensaios usando anidrase carbônica (AC) e anidrase carbônica II (AC II).

Sulfonamida	Enzima	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade u.a.[log ($\mu\text{mol L}^{-1}$)] ⁻¹	R ²	Desvio padrão (branco)
Sulfametazina	AC	4,60	14,3	1,68	0,975	2,40
	AC II	3,80	12,7	1,73	0,971	2,20
Sulfadimetoxina	AC	4,40	14,7	1,63	0,984	2,40
	AC II	3,90	12,9	1,70	0,987	2,20
Sulfatiazol	AC	3,80	12,6	1,90	0,992	2,40
	AC II	3,60	11,9	1,85	0,996	2,20

Fonte: Autoria própria.

Como observado nos ensaios para as três sulfonamidas, as diferenças obtidas com relação à sensibilidade e ao coeficiente de determinação (R²) foram pequenas, para ensaios usando enzima anidrase carbônica e anidrase carbônica II. Uma vez que 100 mg de anidrase carbônica tem custo de R\$ 1435,00 [100] e 5 mg de anidrase carbônica II tem custo de R\$ 840,00 [101], os demais testes foram executados apenas com a enzima anidrase carbônica.

Em seguida, os ensaios foram repetidos utilizando-se microdispositivos fabricados em papel de filtro comum. Entretanto, o leite não fluíu nos canais capilares dos microdispositivos fabricados em papel de filtro comum (Figura 32). Isso ocorre porque o papel de filtro não apresenta como característica o fluxo lateral, o que dificulta que líquidos, principalmente gordurosos, percorram o μ PAD por capilaridade.

Figura 32 – Ensaio realizado em microdispositivo fabricado em papel de filtro comum.

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios seguintes foram então realizados apenas com microdispositivos fabricados em papel cromatográfico Whatman® nº 1, o qual apresentou fluidez adequada para o dispositivo.

4.6 Otimização do dispositivo microfluídico em papel (μPAD)

Após realização do primeiro ensaio em amostras de leite orgânico integral bovino, o dispositivo microfluídico fabricado em papel (μPAD) foi redesenhado, utilizando-se papel cromatográfico Whatman® nº 1, a fim de se otimizar o volume de reagentes e amostras e, principalmente, o tempo de fluxo do leite.

Assim, em μPAD com diferentes larguras de canal capilar, aplicou-se um volume menor (15,0 μL) de leite e o tempo de fluxo foi cronometrado (Figura 33).

Figura 33 – Análise do tempo de fluxo do leite em função da largura dos microcanais capilares, no novo layout de microdispositivo fabricado em papel cromatográfico Whatman® nº 1.

Fonte: Autoria própria.

Como se pode observar, o μPAD com 3,0 mm de largura de microcanal na base e 2,0 mm de largura no tronco (chip 2), foi o que apresentou menor tempo de fluidez. Assim, os ensaios prosseguiram com uso apenas desse microdispositivo.

4.7 Otimização das concentrações de reagentes imobilizados no papel

Com o intuito de otimizar o limite de detecção (LOD) das análises realizadas até então, as concentrações dos reagentes imobilizados no papel foram alteradas.

4.7.1 Otimização usando baixa concentração de enzima

Os ensaios prosseguiram utilizando-se o novo *layout* já otimizado de μ PAD. A concentração da enzima anidrase carbônica para este teste foi equivalente a metade ($50,0 \text{ U mL}^{-1}$) da concentração usada até então. Os resultados obtidos para a sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol são mostrados nas Figuras 34 e 35.

Figura 34 – Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando baixa concentração de anidrase carbônica.

Fonte: Autoria própria.

Figura 35 – Curva analítica do ensaio usando baixa concentração de anidrase carbônica. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios colorimétricos realizados para a sulfadimetoxina e sulfatiazol mostraram-se semelhantes, visualmente, ao ensaio referente à sulfametazina. O tempo total de análise variou de 17 a 22 minutos.

Os dados obtidos pelo método de regressão linear a partir das curvas analíticas para cada sulfonamida, no ensaio usando baixa concentração de anidrase carbônica, encontram-se sintetizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando baixa concentração de anidrase carbônica.

Sulfonamida	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade u.a.[log ($\mu\text{mol L}^{-1}$)] ⁻¹	R ²	Desvio padrão (branco)
Sulfametazina	4,60	15,3	1,63	0,988	2,50
Sulfadimetoxina	4,70	15,5	1,61	0,984	2,50
Sulfatiazol	4,00	13,3	1,88	0,991	2,50

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios usando baixa concentração de anidrase carbônica não se mostraram eficazes, uma vez que os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos foram maiores.

4.7.2 Otimização usando alta concentração de enzima

A concentração da enzima anidrase carbônica para este teste foi equivalente ao dobro ($200,0 \text{ U mL}^{-1}$) da concentração usada nos primeiros ensaios. Os resultados obtidos para a sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol são mostrados nas Figuras 36 e 37.

Figura 36 – Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando alta concentração de anidrase carbônica.

Fonte: Autoria própria.

Figura 37 – Curva analítica do ensaio usando alta concentração de anidrase carbônica. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios colorimétricos realizados para a sulfadimetoxina e sulfatiazol mostraram-se semelhantes, visualmente, ao ensaio referente à sulfametazina. O tempo total de análise variou de 17 a 22 minutos.

Os dados obtidos pelo método de regressão linear a partir das curvas analíticas para cada sulfonamida, no ensaio usando alta concentração de anidrase carbônica, encontram-se sintetizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando alta concentração de anidrase carbônica.

Sulfonamida	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade u.a.[$\log(\mu\text{mol L}^{-1})$] ⁻¹	R ²	Desvio padrão (branco)
Sulfametazina	3,60	12,1	1,74	0,989	2,10
Sulfadimetoxina	3,90	12,9	1,63	0,978	2,10
Sulfatiazol	3,30	10,9	1,92	0,985	2,10

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios realizados com alta concentração de anidrase carbônica mostraram-se eficazes, pois os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram menores. Os ensaios seguintes prosseguiram então usando alta concentração de enzima.

4.8 Aplicação de reagentes para a otimização da superfície reacional do papel

Uma vez estabelecida a concentração ideal de anidrase carbônica, algumas modificações na zona reacional do papel foram realizadas por meio da aplicação de reagentes que melhor estabilizam a cor, a fim de se reduzir os limites de detecção (LOD).

4.8.1 Imobilização de gelatina comercial incolor no papel

Os ensaios com alta concentração ($200,0 \text{ U mL}^{-1}$) da enzima anidrase carbônica foram repetidos, porém com prévia aplicação de uma fina camada homogênea de gelatina incolor, obtida comercialmente, no segundo *spot* de cada microdispositivo. Os resultados obtidos para cada sulfonamida são mostrados nas Figuras 38 e 39.

Figura 38 – Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando gelatina comercial incolor imobilizada no spot reacional do papel.

Fonte: Autoria própria.

Figura 39 – Curva analítica do ensaio usando gelatina comercial incolor imobilizada no spot reacional do papel. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios colorimétricos realizados para a sulfadimetoxina e sulfatiazol mostraram-se semelhantes, visualmente, ao ensaio referente à sulfametazina. O tempo total de análise variou de 18 a 24 minutos.

Os dados obtidos pelo método de regressão linear a partir das curvas analíticas para cada sulfonamida, no ensaio usando gelatina comercial incolor imobilizada no *spot* reacional do papel, encontram-se sintetizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando gelatina comercial incolor imobilizada no spot reacional do papel.

Sulfonamida	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade u.a.[log ($\mu\text{mol L}^{-1}$)] ⁻¹	R ²	Desvio padrão (branco)
Sulfametazina	3,40	11,4	1,32	0,981	1,50
Sulfadimetoxina	3,20	10,6	1,42	0,987	1,50
Sulfatiazol	3,10	10,5	1,43	0,985	1,50

Fonte: Autoria própria.

O uso de gelatina comercial incolor nos *spots* (usando alta concentração de enzima) proporcionou uma diminuição nos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), para as três sulfonamidas. Isso pode ser justificado pelo fato da gelatina tornar a superfície de reação mais estável, facilitando então a diferenciação da cor em concentrações extremas.

Foi observado um decréscimo da sensibilidade do método. Assim, a estabilidade que a gelatina traz à superfície do papel dificulta a diferenciação da cor entre pequenas variações de concentração do analito (sulfonamida).

4.8.2 Imobilização de metil celulose no papel

Os ensaios foram novamente repetidos, utilizando-se alta concentração (200,0 U mL⁻¹) da enzima anidrase carbônica, porém com prévia aplicação de uma fina camada homogênea de pasta gelatinosa de metil celulose, feita em laboratório, no segundo *spot* de cada microdispositivo. Os resultados obtidos para cada sulfonamida são mostrados nas Figuras 40 e 41.

Figura 40 – Ensaio colorimétrico para a sulfametazina, usando metil celulose imobilizada no spot reacional do papel.

Fonte: Autoria própria.

Figura 41 – Curva analítica do ensaio usando metil celulose imobilizada no spot reacional do papel. (A) Sulfametazina. (B) Sulfadimetoxina. (C) Sulfatiazol.

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios colorimétricos realizados para a sulfadimetoxina e sulfatiazol mostraram-se semelhantes, visualmente, ao ensaio referente à sulfametazina. O tempo total de análise variou de 18 a 24 minutos.

Os dados obtidos pelo método de regressão linear a partir das curvas analíticas para cada sulfonamida, no ensaio usando metil celulose imobilizada no *spot* reacional do papel, encontram-se sintetizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados obtidos para cada sulfonamida, pelo método de regressão linear, referente ao ensaio usando metil celulose imobilizada no *spot* reacional do papel.

Sulfonamida	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade $\text{u.a.}[\log(\mu\text{mol L}^{-1})]^{-1}$	R ²	Desvio padrão (branco)
Sulfametazina	2,80	9,30	1,50	0,991	1,40
Sulfadimetoxina	2,70	9,40	1,49	0,986	1,40
Sulfatiazol	2,50	8,50	1,65	0,988	1,40

Fonte: Autoria própria.

O uso da pasta gelatinosa de metil celulose nos *spots* (usando alta concentração de enzima) tem função análoga à da gelatina, proporcionando uma diminuição nos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), para as três sulfonamidas. Isso pode ser justificado pelo fato da pasta de metil celulose tornar a

superfície de reação ainda mais estável do que a gelatina, facilitando então a diferenciação da cor em concentrações extremas.

As alterações na sensibilidade ocorreram porque, assim como a gelatina, ao mesmo tempo em que a metil celulose proporciona uma melhor identificação da cor em concentrações extremas, a estabilidade que ela traz à superfície do papel dificulta a diferenciação da cor entre pequenas variações de concentração do analito (sulfonamida).

4.9 Figuras de mérito e análise da viabilidade do método

Algumas figuras de mérito, como limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), linearidade e sensibilidade, foram determinadas em todos os ensaios realizados. As demais figuras de mérito (seletividade/especificidade, estabilidade e robustez), foram avaliadas apenas com relação ao melhor resultado obtido (menor limite de detecção), ou seja, ao último ensaio realizado em papel cromatográfico Whatman® nº 1, com alta concentração de enzima anidrase carbônica (200,0 U mL⁻¹) e prévia aplicação de uma fina camada uniforme de pasta gelatinosa de metil celulose no *spot* reacional de cada microdispositivo.

4.9.1 Curva analítica, linearidade e sensibilidade

A partir dos resultados obtidos para a sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol (Figura 41), a linearidade foi avaliada para cada sulfonamida, respectivamente, em função do coeficiente de determinação (R^2) e da tabela ANOVA (teste F).

Assim, os resultados para a sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Tabela ANOVA para avaliação da linearidade de cada sulfonamida nos ensaios usando alta concentração de anidrase carbônica e imobilização de metil celulose no spot reacional do papel.

Sulfonamida		DF	Soma dos quadrados	Quadrado da média	Valor F calculado	Valor F tabelado
Sulfametazina	Model	1	149,72	149,72	1070,93	10,56
	Erro	9	1,26	0,14		
	Total	10	150,98			
Sulfadimetoxina	Model	1	178,19	178,19	890,46	9,65
	Erro	11	2,20	0,20		
	Total	12	180,39			
Sulfatiazol	Model	1	170,05	170,05	677,02	12,25
	Erro	7	1,76	0,25		
	Total	8	171,81			

Fonte: Autoria própria.

No teste F, obtido a partir da tabela ANOVA, considera-se que há boa adequação da equação aos valores obtidos quando $F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{tabelado}}$. Uma vez que $F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{tabelado}}$ (com 99% de confiança) e $R^2 > 0,985$ para os três analitos (sulfonamidas), então todos encontram-se de acordo com os critérios de adequação da equação. Assim, o método é linear para esses analitos, nas respectivas faixas de concentração trabalhadas.

A linearidade também foi avaliada a partir dos gráficos de resíduos (Figuras 42 a 44), referentes à sulfametazina, sulfadimetoxina e ao sulfatiazol, respectivamente.

Figura 42 – Avaliação da linearidade referente aos ensaios com sulfametazina, a partir do gráfico de resíduos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 43 – Avaliação da linearidade referente aos ensaios com sulfadimetoxina, a partir do gráfico de resíduos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 44 – Avaliação da linearidade referente aos ensaios com sulfatiazol, a partir do gráfico de resíduos.

Fonte: Autoria própria.

Foi verificada uma distribuição aleatória dos resíduos, o que colabora para a conclusão de que o modelo proposto é adequado aos dados experimentais.

4.9.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados, pelo método de regressão linear, para todos os ensaios realizados descritos até o momento. Como foi observado, o menor limite de detecção obtido foi equivalente ao último ensaio, com alta concentração de anidrase carbônica e prévia aplicação de pasta gelatinosa de metil celulose nos *spots* reacionais dos μ PAD. Os limites de detecção (LOD) para a sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol foram, respectivamente, em $\mu\text{mol L}^{-1}$: 2,80; 2,70; 2,50. Já os limites de quantificação (LOQ) para as mesmas sulfonamidas foram, em $\mu\text{mol L}^{-1}$, iguais a 9,30; 9,40; 8,50, respectivamente.

4.9.3 Seletividade e especificidade

O resultado da avaliação da seletividade do método desenvolvido é mostrado na Figura 45.

Figura 45 – Ensaio colorimétrico para avaliação da seletividade do método. (A) Ensaio com leite sem sulfonamida (branco). (B) Ensaio com água desionizada sem sulfonamida.

Fonte: Autoria própria.

A média de pixels observada no ensaio (A) foi equivalente a $111,20 \pm 1,40$ u.a. e no ensaio (B), igual a $110,60 \pm 1,70$ u.a. Devido à pequena diferença entre os valores, pode-se afirmar que a matriz não apresenta interferentes e o método é, portanto, seletivo para sulfonamidas.

Com relação à especificidade, os ensaios foram realizados combinando-se as sulfonamidas duas a duas e, por fim, juntando as três sulfonamidas (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) na mesma amostra, com mesma concentração final. O resultado obtido é mostrado na Figura 46.

Figura 46 – Ensaio colorimétrico para avaliação da especificidade do método desenvolvido. (A) Sulfametazina com sulfadimetoxina. (B) Sulfametazina com sulfatiazol. (C) Sulfadimetoxina com sulfatiazol. (D) Todas as sulfonamidas. (E) Branco.

Fonte: Autoria própria.

Como observado, o método não é específico, pois não é capaz de identificar qual das três sulfonamidas encontra-se presente no leite, indicando apenas que há ou não compostos da classe das sulfonamidas na amostra, a partir da inibição da anidrase carbônica pela sulfa (não aparecimento de cor).

4.9.4 Estabilidade colorimétrica

Para avaliação da estabilidade da cor obtida no teste, um mesmo ensaio referente à imobilização da pasta gelatinosa de metil celulose na superfície reacional do microdispositivo foi monitorado pelo período imediato após o teste (Figura 47), após 30 minutos (Figura 48), 1 hora (Figura 49), 2 horas (Figura 50) e 4 horas (Figura 51).

Figura 47 – Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 0$.

Fonte: Autoria própria.

Figura 48 – Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 30$ min.

Fonte: Autoria própria.

Figura 49 – Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 1$ h.

Fonte: Autoria própria.

Figura 50 – Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 2$ h.

Fonte: Autoria própria.

Figura 51 – Avaliação da estabilidade colorimétrica do ensaio com sulfonamidas no tempo $t = 4\text{ h}$.

Fonte: Autoria própria.

O resultado quantitativo destes ensaios é mostrado na Figura 52.

Figura 52 – Avaliação da estabilidade colorimétrica em função do tempo, para a sulfametazina, considerando os tempos $t = 0$; $t = 1\text{ h}$; $t = 4\text{ h}$.

Fonte: Autoria própria.

Como se pode observar, a partir de 30 minutos após realização dos ensaios houve uma alteração na cor, sendo mais acentuada depois de 1 hora. Após o período de 4 horas, pode-se observar a degradação completa das cores. Assim, a análise colorimétrica deve ser realizada no *software*, preferencialmente, de imediato após secagem da amostra nos μ PAD.

Os resultados para a sulfadimetoxina e sulfatiazol foram análogos ao obtido para a sulfametazina.

4.9.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada quanto a alterações na temperatura do leite. Assim, o ensaio referente à imobilização da pasta gelatinosa de metil celulose na superfície reacional do microdispositivo foi executado com amostras de leite nas seguintes temperaturas: 4 °C (Figura 53), temperatura ambiente (Figura 54) e 28 a 29 °C (Figura 55).

Figura 53 – Avaliação da robustez do método quanto à temperatura, para a sulfametazina. (A) Ensaio colorimétrico. (B) Curva analítica para o leite a 4 °C . (C) Curva analítica para o leite à temperatura ambiente. (D) Curva analítica para o leite morno (28 a 29 °C).

Fonte: Autoria própria.

Figura 54 – Avaliação da robustez do método quanto à temperatura, para a sulfadimetoxina. (A) Curva analítica para o leite a 4 °C . (B) Curva analítica para o leite à temperatura ambiente. (C) Curva analítica para o leite morno (28 a 29 °C).

Fonte: Autoria própria.

Figura 55 – Avaliação da robustez do método quanto à temperatura, para o sulfatiazol. (A) Curva analítica para o leite a 4 °C . (B) Curva analítica para o leite à temperatura ambiente. (C) Curva analítica para o leite morno (28 a 29 °C).

Fonte: Autoria própria.

Os resultados colorimétricos dos ensaios referentes à sulfadimetoxina e ao sulfatiazol foram semelhantes, visualmente, ao da sulfametazina. Os dados obtidos

a partir das curvas analíticas encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação da robustez do método quanto à temperatura da amostra (leite), para as três sulfonamidas analisadas.

Sulfonamida	T (°C)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade u.a.[log ($\mu\text{mol L}^{-1}$)] ⁻¹	R ²	Desvio padrão (branco)
Sulfametazina	4	3,00	10,1	1,48	0,992	1,50
	Ambiente	2,80	9,30	1,50	0,991	1,40
	28 a 29	3,10	10,4	1,53	0,989	1,60
Sulfadimetoxina	4	2,60	8,60	1,52	0,990	1,30
	Ambiente	2,70	9,40	1,49	0,986	1,40
	28 a 29	3,10	10,3	1,55	0,992	1,60
Sulfatiazol	4	2,80	9,20	1,62	0,991	1,50
	Ambiente	2,50	8,50	1,65	0,988	1,40
	28 a 29	2,60	8,60	1,63	0,989	1,40

Fonte: Autoria própria.

Como mostrado nos resultados acima, a alteração de temperatura na faixa de 4 °C a 29 °C interfere pouco nos resultados, observando-se limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) semelhantes, além de uma linearidade satisfatória. Dessa forma, o método é robusto com relação a alterações na temperatura da amostra (leite).

5 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados com a enzima anidrase carbônica (proveniente de eritrócitos bovinos), em pH 7,5, apresentou resultados com eficiência semelhante aos ensaios utilizando a isoforma anidrase carbônica II (proveniente de eritrócitos bovinos). Assim, pôde-se construir um teste de baixo custo, considerando os valores comerciais de ambas as enzimas.

O método para a determinação das três principais sulfonamidas (sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol) foi desenvolvido, com base em uma reação de inibição enzimática. A imobilização de uma fina camada uniforme de pasta gelatinosa de metil celulose, nos *spots* dos microdispositivos, permitiu maior estabilidade na superfície reacional do papel, de forma a alcançar limites de detecção (LOD) menores, equivalentes à $2,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($7,79 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) para a sulfametazina, $2,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($8,37 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) para a sulfadimetoxina e $2,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($6,38 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) para o sulfatiazol. Entretanto, estes ainda encontram-se superiores ao limite máximo de sulfonamidas presentes no leite ($10,0 \text{ ng mL}^{-1}$), determinado pelo PAMVet [37].

A avaliação da estabilidade colorimétrica em função do tempo indicou degradação da cor amarelo brilhante, proveniente de reação entre enzima e éster (baixas concentrações de sulfonamida). Assim, a leitura da cor deve ser realizada logo após secagem total da amostra, para resultados com maior confiabilidade.

O método desenvolvido para detecção colorimétrica de sulfonamidas apresentou, como principal vantagem, a análise das amostras de leite bovino sem qualquer tratamento prévio. Além disso, o método apresentou boa linearidade e repetitividade nos ensaios realizados intra-dia e inter-dia, além de se mostrar seletivo para compostos da classe das sulfonamidas, e ser robusto com relação a alterações na temperatura do leite bovino.

A técnica apresentou-se limitada com relação aos limites de detecção (LOD), o que mostra que é possível determinar sulfonamidas por reação de inibição enzimática através de microdispositivos em papel, mas não em concentrações tão baixas como exigido pela ANVISA. Entretanto, o desenvolvimento do método visa atender análises no campo de vacas individuais, recebendo medicação direta. Nessas condições, a taxa de antibióticos presentes no leite é muito acima dos limites mínimos determinados pela ANVISA para o leite comercial, o que torna o método viável para análises rápidas e de baixo custo no campo, a fim de se

monitorar o período de carência, ou seja, o período em que o leite não deve ser consumido (por conter resíduos) a partir da última aplicação do medicamento.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho teve como princípio o desenvolvimento do primeiro método usando dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD), baseado em reação de inibição enzimática, para determinação dos analitos de interesse (sulfonamidas). Assim, para que o método possa ser comercializado e levado até as zonas rurais, é necessária a validação completa, com todas as figuras de mérito avaliadas, preferencialmente, com amostras *in natura* de animais recebendo medicação (sulfonamidas).

O uso de gelatina e pasta de metil celulose permitiu um decréscimo nos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Entretanto, estes ainda encontram-se superiores ao limite máximo de sulfonamidas, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Assim, a performance de novos agentes estabilizantes pode ser avaliada, a fim de se alcançar a identificação de concentrações de sulfonamidas ainda menores, na superfície do papel.

Com o mesmo objetivo de diminuir os limites de sulfonamidas detectáveis em microdispositivos de papel, a alteração do papel cromatográfico Whatman® nº 1 por outros tipos de papel também pode ser avaliada, já que existem diversas variações de papéis e membranas no mercado, cada um adequado a um tipo de amostra, fluxo, tempo de análise e analitos de interesse.

Uma vez que o método foi desenvolvido com o intuito de ser levado até as zonas rurais, para monitoramento imediato no campo, os dispositivos para captura de análise das imagens devem ser aprimorados. O uso de *smartphones* para capturar as imagens requer *softwares* de análise que eliminem a luz ambiente, por exemplo, de modo a não provocar alterações na leitura dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 KLASNER, S. A. et al. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1821-1829, 2010.
- 2 DEVI, D. L.; BURKHARD, R.; GOODING, J. J.; CHOW, E. Recent Advances in paper-based sensor. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 11505-11526, 2012.
- 3 COLTRO, W. K. T.; JESUS, D. P.; SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L.; CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**, v. 31, n. 15, p. 2487-2498, 2010.
- 4 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real- time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699-3707, 2008.
- 5 WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006.
- 6 NG, J. M. K.; GITLIN, I.; STROOCK, A. D.; WHITESIDES, G. M. Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. **Electrophoresis**, v. 23, n. 20, p. 3461-3473, 2002.
- 7 WHITESIDES, G. M.; STROOCK, A. D. Flexible methods for microfluidics. **Physics Today**, v. 54, n. 6, p. 42-48, 2001.
- 8 MIJATOVIC, D.; EIJKEL, J. C. T.; VAN DEN BERG, A. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up - a review. **Lab on a Chip**, v. 5, p. 492-500, 2005.
- 9 CZAPLEWSKI, D. A.; KAMEOKA, J.; MATHERS, R.; COATES, G. W.; CRAIGHEAD, H. G. Nanofluidic channels with elliptical cross sections formed using a nonlithographic process. **Applied Physics Letters**, v. 83, n. 23, p. 4836-4838, 2003.
- 10 HIMANSHU, S.; DIEP, N.; AARON, C.; VALERIE L.; MICHELLE K. Unconventional low-cost fabrication and patterning techniques for point of care diagnostics. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 4, p. 1313-1327, 2010.

- 11 GRATTON, S. E. A.; WILLIAMS, S. S.; NAPIER, M. E.; POHLHAUS P. D.; ZHOU, Z.; WILES, K. B.; MAYNOR, B. W.; SHEN, C.; OLAFSEN, T.; SAMULSKI, E. T. The pursuit of a scalable nanofabrication platform for use in material and life science applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 12, p. 1685-1695, 2008.
- 12 MUKHOPADHYAY, R. When PDMS isn't the best. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 9, p. 3248-3253, 2007.
- 13 CHEN, C. S.; BRESLAUER, D. N.; LUNA, J. I.; GRIMES, A.; CHIN, W. C.; LEE, L. P.; KHINE, M. Shrinky-Dink microfluidics: 3D polystyrene chips. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 4, p. 622-624, 2008.
- 14 GEISLER, M.; ROY, E.; DIAZ-QUIJADA, G. A.; GALAS, J. C.; VERES, T. Microfluidic patterning of miniaturized DNA arrays on plastic substrates. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 7, p. 1387-1395, 2009.
- 15 DAVID, R. B.; LI, X.; SHEN, W. Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics. **Microfluidic Nanofluidic**, v. 13, n. 5, p. 769-787, 2012.
- 16 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318-1320, 2007.
- 17 LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. **AIP Biomicrofluidics**, v. 6, n. 1, p. 011301-011301-13, 2012.
- 18 COSTA, M. N.; VEIGAS, B.; JACOB, J. M.; SANTOS, D. S.; GOMES, J. BAPTISTA, P. V.; MARTINS, R.; INÁCIO, J.; FORTUNATO, E. A low-cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing, lab-on-paper. **Nanotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1-12, 2013.
- 19 PELTON, R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 925-942, 2009.
- 20 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper- based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3-10, 2010.

- 21 FENTON, E. M.; MASCARENAS, M. R.; LOPEZ, G. P.; SIBBETT, S. S. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 1, p. 124-129, 2009.
- 22 APILUX, A.; DUNGCHAI, W.; SIANGPROH, W.; PRAPHAIRAKSIT, N.; HENRY, C. S.; CHAILAPAKUL, O. Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1727-1732, 2010.
- 23 LI, X.; TIAN, J. F.; GARNIER, G.; SHEN, W. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 564-570, 2010.
- 24 YU, J. H.; GE, L.; HUANG, J. D.; WANG, S. M.; GE, S. G. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 7, p. 1286-1291, 2011.
- 25 CARVALHAL, R. F.; KFOURI, M. S.; PIAZETTA, M. H. D.; GOBBI, A. L.; KUBOTA, L. T. Electrochemical detection in a paper-based separation device. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 1162-1165, 2010.
- 26 ELLERBEE, A. K.; PHILLIPS, S. T.; SIEGEL, A. C.; MIRICA, K. A.; MARTINEZ, A. W.; STRIEHL, P.; JAIN, N.; PRENTISS, M.; WHITESIDES, G. M. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 20, p. 8447-8452, 2009.
- 27 MARTINEZ, A. W.; PHILIPS, S. T.; NIE, Z. H.; CHENG, C. M.; CARRILHO, E.; WILEY, B. J.; WHITESIDES, G. M. Programmable diagnostic devices made from paper and tape. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 9, p. 2499-2504, 2010.
- 28 BRACHER, P. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a template for the delivery of reactants in the fabrication of planar materials. **Soft Matter**, v. 6, n. 18, p. 4303-4309, 2010.
- 29 SONGJAROEN, T.; DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; LAIWATTANAPAISAL, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2587-2593, 2011.
- 30 LUCKHAM, R. E.; BRENNAN, J. D. Bioactive paper dipstick sensors for acetylcholinesterase inhibitors based on sol-gel/enzyme/gold nanoparticle composites. **Analyst**, v. 135, n. 8, p. 2028-2035, 2010.

- 31 CRETICH, M.; SEDINI, V.; DAMIN, F.; PELLICCIA, M.; SOLA, L.; CHIARI, M. Coating of nitrocellulose for colorimetric DNA microarrays. **Analytical Biochemistry**, v. 397, n. 1, p. 84-88, 2010.
- 32 LU, Y.; SHI, W.; QIN, J. H.; LIN, B. C. Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 329-335, 2010.
- 33 LU, Y.; LIN, B. C.; QIN, J. H. Patterned paper as a low-cost, flexible substrate for rapid prototyping of PDMS microdevices via "liquid molding". **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 1830-1835, 2011.
- 34 ARENA, A.; DONATO, N.; SAITTA, G.; BONAVIDA, A.; RIZZO, G.; NERI, G. Flexible ethanol sensors on glossy paper substrates operating at room temperature. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 1, p. 488-494, 2010.
- 35 SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometry. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.
- 36 TSE, H. Y.; WONG R. C. **Lateral Flow Immunoassay**. Totowa, NJ: Springer, 223 p., 2009.
- 37 COSTA, D. L. L. B. Desenvolvimento e validação de um método analítico para análise multi resíduo de produtos veterinários em leite bovino através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 2010. 157 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010.
- 38 HAYS, V. W. Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. In: Agricultural Use of Antibiotics. Illinois, **American Chemical Society**, v. 1, p. 74-87, 1986.
- 39 STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1-2, p. 15-33, 2005.
- 40 DE BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; VANDEN BUSSCHE, J.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBELS, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7964-7976, 2009.

41 MACEDO, A. N. Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2012.

42 DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.

43 JONES, G. M. **On-farm tests for drug residues in milk**. Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, 2009. Disponível em: <<http://pubs.ext.vt.edu/404/404-401/404-401.html>>. Acesso em: 05 de março de 2016.

44 NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

45 SILVA, M. V. M.; SARMENTO, A. M. C.; FRANCA, A. P. Resíduos de antibióticos em leite: uma preocupação constante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 39, 2008, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008, ref. R0568-1.

46 WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulfonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, n. 4, p. 362-384, 2006.

47 BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. **Resíduos de antibióticos no leite**. Comunicado Técnico, 44. Embrapa Gado de Leite (2005). Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/publicacoes/comunicado/COT44.pdf>>. Acesso em: 05 de março de 2016.

48 ATLUG, G. Contaminants. **Introduction to toxicology and food**. Boca Raton: CRC, p. 53-79, 2002.

49 BLASCO, C.; TORRES, C. M.; PICÓ, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 895-913, 2007.

50 MOL, H. **Antibiotics and milk**. Utrecht: A. A. Balkema, 145 p., 1975.

51 MERCOSUL. **GMC/Res. Nº54/00: Metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal** (2000). Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/54_00>. Acesso em: 07 de março de 2016.

52 SANTOS, B.; LISTA, A.; SIMONET, B. M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and analytical confirmation of sulfonamide residues in milk by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1567,1575, 2005.

53 REEVES, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 723, n. 1-2, p. 127-137, 1999.

54 FERNANDES, F. C. B. Desenvolvimento de métodos limpos para screening e determinação de sulfonamidas em matrizes diversas. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2011.

55 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 577-594, 2001.

56 WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulfonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, n. 4, p. 362-384, 2006.

57 MITSCHER, L. A. Antibiotics and antimicrobial agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 819-866, 2008.

58 MARZO, A.; DAL BOL, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1-2, p. 17-34, 1998.

59 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo** – PAMVet – 2003b. Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em: 07 de março de 2016.

60 PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM LEITE (PNCRC). **Instrução Normativa nº 14**, de 25 de maio de 2009. Anexo II. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=15296>>. Acesso em: 07 de março de 2016.

61 NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de Antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

62 CHANDAN, R. Dairy-Based Ingredients, **Chapter 1: Properties of Milks and Its Components**.

Disponível em:

<<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/book/10.1094/9780913250945>>. Acesso em: 11 de março de 2016.

63 WALSH, J. **Milk chemistry - An introduction**.

Disponível em:

<https://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ilca_manual4/Milkchemistry.htm>. Acesso em: 11 de março de 2016.

64 OLIVEIRA, S. S.; VIDAL, P. F.; PENATI, M. A.; MARTELETO, M. **Análise técnico-econômica de sistemas de produção de leite**. In: VISÃO Técnica e Ecocômica da Produção Leiteira. Piracicaba: FEALQ, v. 1, p. 81-102, 2005.

65 BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. São Paulo: Nobel, 320 p., 1999.

66 SÁ, F. V. **O leite e seus produtos**. Lisboa. A. M. Teixeira & C^a (Filhos), 337 p., 1975.

67 SANTOS, L. G. C.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; SARRIÉS, G. A.; BLUMER, L.; JÚNIOR, F. B. Chemical composition of bovine milk from Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 493-496, 2009.

68 Faostat – Livestock Primary – **Statistical database**. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 12 de março de 2016.

69 Milkpoint – TOP 100 Milkpoint – cow milk survey 2008/2009 (2009). Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/top100/final/>>. Acesso em: 12 de março de 2016.

70 REDE AGRIPPOINT, MILK POINT. **Estatísticas do leite**: Exportações brasileiras de produtos lácteos. Disponível em:

<http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Exportacoes_Brasileiras.htm>. Acesso em: 12 de março de 2016.

71 ALVIM, R. S.; MARTINS, M. C. Mercado Nacional e Internacional do leite. In: VISÃO Técnica e Econômica da Produção Leiteira. Piracicaba: FEALQ, v. 1, p. 7-24, 2005.

72 SAMANIDOU, V.; NISYRIOU, S. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in Milk. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 2068-2090, 2008.

73 WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8468-8473, 2005.

74 AGARWAL, V. K. High-performance liquid chromatographic methods for determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1-2, p.411-423, 1992.

75 SAMANIDOU, V. F.; TOLIKA, E. P.; PAPADOYANNIS, I. N. Chromatographic residue analysis of sulfonamides in foodstuffs of animal origin. **Separation and Purification Reviews**, v. 37, n. 4, p.327-373, 2008.

76 FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatography determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, n. 2, p. 255-259, 2003.

77 MAUDENS, K. E.; ZHANG, G. F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 1047, n. 1, p. 85-92, 2004.

78 ZHENG, M.; LIU, H. Y.; HALLS, S. F.; KITTS, D. D.; MCLANE, K. M. High-performance liquid chromatographic analysis of Romet-30 in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): wash-out time, tissue distribution in muscle, liver and skin, and metabolism of sulphadimethoxine. **Journal of Chromatography**, v. 670, n. 1-2, p. 77-88, 1994.

79 FURUSAWA, N.; KISHIDA, K. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulphonamides in milk. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 7, p. 1031-1033, 2001.

80 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulphonamides in meat. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 17, p. 2931-2939, 2003.

81 REEVES, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 723, n. 1-2, p. 127-137, 1999.

82 MUTHARASAN, R. **Engineering Biotechnology**, 1.1 What is a biosensor? Disponível em: <http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/ch1/1_1f.htm>. Acesso em: 26 de março de 2016.

83 ROBERTSON, S. **News Medical**, What are biosensors?, 2014. Disponível em: <<http://www.news-medical.net/health/What-are-Biosensors.aspx>>. Acesso em: 26 de março de 2016.

84 CHAPLIN, M. **Enzyme Technology**, What are biosensors?, 2014. Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/biosensors.html>>. Acesso em: 26 de março de 2016.

85 Editorial. Carbonic anhydrases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 1377-1378, 2013.

86 SYRJÄNEN, L.; PARKKILA, S.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Sulfonamide inhibition studies of the beta carbonic anhydrase from *Drosophila melanogaster*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 13, p. 2797-2801, 2014.

87 SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CASINI, A. Carbonic anhydrase inhibitors. **DOI 10.1002/med**. 10025, p. 146-188, Italy.

88 SUPURAN, C. T.; BRIGANTI, F.; TILLI, S.; CHEGWIDDEN, W. R.; SCOZZAFAVA, A. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents?. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 703-714, 2001.

89 HASSAN, M. I.; SHAJEE, B.; WAHEED, A.; AHMAD, F.; SLY, W. S. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1570-1582, 2013.

90 CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITSIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091-7095, 2009.

91 JAEGER, C. W. **How does a solid ink printer work?**, 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 16 de março de 2016.

92 VEIGAS, B.; JACOB, J. M.; COSTA, M. N.; SANTOS D. S.; VIVEIROS, M.; INÁCIO, J.; MARTINS, R.; BARQUINHA, P.; FORTUNATO, E.; BAPTISTA, P. V. Gold on paper-paper platform for Au-nanoprobe TB detection. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 22, p. 4802-4808, 2012.

93 DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. **Analyst**, v. 136, n. 1, p. 77-82, 2011.

94 LEE, D. S.; JANG, W. I.; JUNG, M. Y.; JEON, B. G.; IHM, C. A pocket-sizes colorimetric urine reader for telemedicine in the developing countries. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 120, p. 1-4, 2011.

95 YU, J.; GE, L.; HUANG, J.; WANG, S.; GE, S. Microfluidic paper- based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 7, p.1286-1291, 2011.

96 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; NIE, Z.; CHENG, C. M.; CARRILHO, E.; WILEY, B. J.; WHITESIDES, G. M. Supplementary Information for: Programmable Diagnostic Devices Made from Paper and Tape. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 19, p. 1-8, 2010.

97 IYER, R.; BARRESE, A. A.; PARAKH, S.; PARKER, C.N.; TRIPP, B; C. Inhibition Profiling of Human Carbonic Anhydrase II by High-Troughput Screening of Structurally Diverse, Biologically Active Compounds. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 782-791, 2006.

98 CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

99 DEMIR, Y.; DEMIR, N.; NADAROGLU, H.; BAKAN, E. Purification and characterization of carbonic anhydrase from bovine erythrocyte plasma membrane. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 49-59, 2000.

100 Sigma Aldrich. **Anidrase carbônica proveniente de eritrócitos bovinos**. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c3934?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em: 20 de março de 2016.

101 Sigma Aldrich. **Anidrase carbônica isoforma II proveniente de eritrócitos bovinos**. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2522?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em: 20 de março de 2016.