



revista **IPT**

TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

EDIÇÃO ESPECIAL

23

v. 7, n. 23, ago., 2023

BIOCIDAS NA INDÚSTRIA PETROLÍFERA

Eficácia de bactérias
reductoras de sulfato

IMPRESSÃO 3D EM BIOTECNOLOGIA

Sistemas
microeletromecânicos
em dispositivos
Lab-on-a-chip

CONTROLE DE AGROTÓXICOS

Técnicas para
análise de resíduos
em laranjas

ipt

INSTITUTO DE
PESQUISAS
TECNOLÓGICAS

ENSINO TECNOLÓGICO



revista **IPT**

TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

v.7, n.23, agosto, 2023

Quadrimestral

Editores-chefes

Eduardo Luiz Machado

Andreia Longuinho da Silva

José Maria de Camargo Barros

Conselho Editorial

Eduardo Luiz Machado

Silas Derenzo

Assistentes Editoriais

Augusto Max Colin

Bruno D. Francisco da Silva

Ester Garcia Ferreira da Silva

Flavio Sergio Jorge de Freitas

Hamilton Lelis Ito

João Antonio Rodrigues Garcia

Luiz Silviano

Silvia Megumi Mizoguti Padovani

ISSN 2526-5830

Copyright© IPT. Todos os direitos reservados. Todos os textos, imagens, gráficos, e outros materiais são protegidos por direitos autorais e outros direitos de propriedade intelectual pertencentes ao IPT. A reprodução dos textos da Revista IPT somente será permitida para fins didáticos e de pesquisa, desde que com a citação deste material. Proibida a reprodução total ou parcial, com intuito de lucro direto ou indireto, por qualquer meio ou processo.

Créditos técnicos

DIAGRAMAÇÃO E ARTE:

Silvia Megumi Mizoguti Padovani

REVISÃO:

Eduardo Luiz Machado

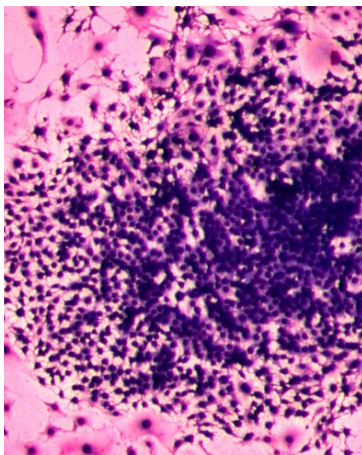
José Maria de Camargo Barros

sapiens.ipt.br

revista@ipt.br

Av. Prof. Almeida Prado, 532
Cidade Universitária - Butantã
05508-901 - São Paulo - SP

ISSN 2526-5830



na capa

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Industrial, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

revista IPT
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

#23

revista IPT
T E C N O L O G I A E I N O V A Ç Ã O

SUMÁRIO

artigos técnicos

06 **Desenvolvimento e fabricação de dispositivos microfluídicos em PEEK e silício e vidro para a modificação genética de células por hidroporação**

Autores: Kelly Farah Torres Vaver, Henrique Reis Wisinewski, Henrique da Costa Oliveira, Natália Neto Pereira Cerize, Beatriz Nogueira Messias de Miranda

22 **Avaliação da eficácia biocida dos produtos sulfato de tetra (hidroximetil) fosfônio (THPS), glutaraldeído e isotiazolona frente a Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em diferentes escalas de cultivo de Número Mais Provável (NMP)**

Autores: Henrique Moreira Simon, Maria Filomena de Andrade Rodrigues.

37 **Aplicabilidade da Impressão 3D por Estereolitografia em Biotecnologia usando Dispositivos Mili- e Microfluídicos**

Autores: Gabriel Griep, Edgar Andres Patiño-Nariño, Isabela Aparecida de Araujo Andreotti, Mario Ricardo Gongora-Rubio.

61 **Técnicas analíticas para o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos cítricos**

Autores: Kelly Cristina Manhani, João Paulo Amorim de Lacerda, Viviane Emi Nakano, Lucas Monteiro Santa Cruz, Alan Roberto Costa, Jose Oscar William Vega Bustillos

BOLA ROLANDO

A vigésima terceira edição da 'Revista IPT, Tecnologia e Inovação' chega até você ainda no embalagem global da 'Copa do Mundo FIFA de Futebol Feminino 2023' da Austrália e Nova Zelândia. As atletas correndo atrás da bola - e de gols! - enquanto o planeta torcedor segue atento. Por aqui, no jogo da pesquisa científica e tecnológica, equipes mistas de pesquisadoras e pesquisadores correm atrás de moléculas invisíveis a olho nu e suas aplicabilidades inovadoras. Quatro artigos entraram em campo com suas equipes no 'I Congresso de Bionanomanufatura' realizado no IPT, São Paulo, em 25 de novembro de 2022.

Esta partida, ou melhor, edição, começa com o artigo 'Desenvolvimento e fabricação de dispositivos microfluídicos em PEEK e silício e vidro para a modificação genética de células por hidroporação', tratando de dispositivos microfluídicos como ferramentas para modificação genética em linhagens celulares. Os seguintes autores participam do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas: Kelly Farah Torres Vaver e Henrique da Costa Oliveira, do Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT; Natália Neto Pereira Cerize, da UN Bionanomanufatura do IPT; Beatriz Nogueira Messias de Miranda e Henrique Reis Wisinewski, ambos do Laboratório de Micromanufatura do IPT. Wisinewski não participa do referido programa.

No artigo intitulado 'Avaliação da eficácia biocida dos produtos sulfato de tetra (hidroximetil) fosfônio (THPS), glutaraldeído e isotiazolona frente a Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em diferentes escalas de cultivo de Número Mais Provável (NMP)', foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos produtos em diferentes situações experimentais. Seus autores são: Henrique Moreira Simon e Maria Filomena de Andrade Rodrigues, ambos do Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT.

Em 'Aplicabilidade da impressão 3D por estereolitografia em biotecnologia usando dispositivos mili- e microfluídicos', os autores propõem desenho, simulação e manufatura de um micromisturador por uma das técnicas de mais baixo custo relativo e facilidade de prototipação. São eles: Gabriel Griep, da USP; Edgar Andres Patiño-Nariño, Isabela Aparecida de Araujo Andreotti, e Mario Ricardo Gongora-Rubio, todos do Laboratório de Micromanufatura do IPT.

No quarto artigo, intitulado 'Técnicas analíticas para o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos cítricos', avaliação da qualidade dos citros com estudo de três métodos de extração, para quantificação e confirmação dos componentes das amostras de suco. São seus autores: Kelly Cristina Manhani, do Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas do IPT; João Paulo Amorim de Lacerda, do Laboratório de Química e Manufaturados do IPT; Viviane Emi Nakano, Lucas Monteiro Santa Cruz e Alan Roberto Costa, do Núcleo de Contaminantes Orgânicos/Centro de Contaminantes do Instituto Adolfo Lutz; e Jose Oscar William Vega Bustillos, do Centro de Química e Meio Ambiente/Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Boa leitura!

*Eduardo
L. Machado*

Eduardo Luiz Machado
Diretor Técnico em Ensino Tecnológico



Artigo Técnico

Desenvolvimento e fabricação de dispositivos microfluídicos em PEEK e silício e vidro para a modificação genética de células por hidroporação

*Development and manufacturing of microfluidic
devices in PEEK and SoG for genetic
modification of cells by electroporation*

Kelly Farah Torres Vaver^{ab*}, Henrique Reis Wisinewski^c,
Henrique da Costa Oliveira^{ab}, Natália Neto Pereira Cerize^{ad},
Beatriz Nogueira Messias de Miranda^{ac}

^a Programa de Pós-Graduação
Interunidades em
Biotecnologia, Universidade de
São Paulo/Instituto Butantan/
Instituto de Pesquisas
Tecnológicas do Estado de São
Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^b Laboratório de Biotecnologia
Industrial, Instituto de
Pesquisas Tecnológicas do
Estado de São Paulo S.A.,
São Paulo-SP, Brasil.

^c Laboratório de
Micromanufatura, Instituto
de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo
S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^d Unidade de Negócios em
Bionanomanufatura, Instituto
de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo
S.A., São Paulo-SP, Brasil.

*e-mail: kellyvaver@ipt.br

Palavras-chave: microfluídica;
microdispositivos; modificação
genética; bioprocessos.

Keywords: *microfluidics; microdevices;
genetic modification; bioprocesses.*

Resumo

A inserção de materiais genéticos exógenos em células, como plasmídeos, DNAs ou RNAs, é um procedimento comum e crítico para aplicações biotecnológicas, como modificação de linhagens produtoras utilizadas em bioprocessos, inserção de genes de interesse e o desenvolvimento de terapias gênicas. A internalização dessas moléculas para modificação genética é possível através de metodologias que permitem transpor a membrana da célula, que tradicionalmente envolvem o uso de carreadores virais, plasmídeos, eletroporação, ou métodos bioquímicos. São metodologias que, embora bem estabelecidas, podem apresentar limitações como altos custos de execução, toxicidade e baixa escalabilidade, podendo limitar ou impossibilitar a utilização dessas células em aplicações biomédicas. Dispositivos microfluídicos têm sido utilizados como alternativas interessantes aos métodos tradicionais de modificação genética, por oferecerem maior precisão de manipulação, utilização de menores quantidades de reagentes e amostras com alta resolução. Para internalização celular, possibilitam uma menor manipulação das amostras, diminuindo taxas de contaminação e otimizando o processo. Neste trabalho foram desenvolvidos dispositivos microfluídicos para serem utilizados como ferramentas para modificação genética em linhagens celulares. Os dispositivos foram fabricados em silício e vidro por fotolitografia com corrosão úmida utilizando KOH, e em PEEK pela técnica de microusinagem. Os dispositivos foram avaliados quanto a sua estanqueidade e pressões suportadas. Os resultados obtidos mostraram que ambos os dispositivos operam sem vazamentos e quebras em pressões de até 8 bar, e os dispositivos em PEEK suportam pressões de até 20 bar. Os dispositivos microfluídicos foram fabricados de maneira satisfatória, e apresentam potencial para serem utilizados futuramente em aplicações biotecnológicas e biomédicas.

Abstract

The insertion of exogenous genetic materials into cells, such as plasmids, DNAs, or RNAs, is a common and critical procedure for biotechnological applications, such as modification of production strains used in bioprocesses, insertion of genes of interest and the development of gene therapies. The internalization of these molecules for genetic modification is possible through methodologies that allow transposing of the cell membrane, which traditionally involves the use of viral carriers, plasmids, electroporation, or biochemical methods. These are methodologies that, although well established, may have limitations such as high execution costs, toxicity, and low scalability, which may limit or preclude the use of these cells in biomedical applications. Microfluidic devices

have been used as alternatives to traditional methods of genetic modification, as they offer better manipulation precision, the use of smaller amounts of reagents, and high-resolution samples. For cellular internalization, they allow less manipulation of samples, reducing contamination rates and optimizing the process. In this work, microfluidic devices were developed to be used as tools for genetic modification in cell lines. The devices were manufactured in silicon and glass by photolithography with wet etching using KOH, and in PEEK by the micro milling technique. The devices were evaluated for their tightness and supported pressures. The results showed that both devices operate without leaks and breaks at pressures of up to 8 bar, and the PEEK devices withstand up to 20 bar pressures. The microfluidic devices were manufactured satisfactorily and have the potential to be used in future biotechnological and biomedical applications.

1 Introdução

Modificações genéticas em células são procedimentos amplamente utilizados para aplicações biotecnológicas, como modificação de linhagens produtoras utilizadas em bioprocessos, inserção de genes de interesse e desenvolvimento de terapias gênicas (LUO; SALTZMAN, 2000). Uma etapa fundamental e limitante para o desenvolvimento de linhagens recombinantes é a entrega dessas moléculas no interior das células, por isso metodologias que causam a permeabilização da membrana celular são utilizadas. Essa abertura temporária pode ser realizada por processos físicos (eletroporação e choque térmico) ou mecânicos (constricção celular e cisalhamento de fluxo), ou com o auxílio de carreadores (vírus e lipídios catiônicos), que transportam a molécula através da membrana celular, garantindo que o material seja entregue. São metodologias que, embora bem estabelecidas, podem apresentar limitações como altos custos de execução, toxicidade e baixa escalabilidade, o que pode limitar ou impossibilitar a aplicação dessas células (STEWART; LANGER; JENSEN, 2018; BROOKS *et al.*, 2020).

Para superar os desafios destes métodos tradicionais, dispositivos microfluídicos têm sido utilizados como alternativas. O ambiente microfluídico oferece uma maior precisão e controle de moléculas no espaço e tempo, além de permitir a manipulação da membrana celular de maneira mais precisa, facilitando a entrega das moléculas para modificação genética (MARQUES; FERNANDES, 2011; SUN; DUAN, 2020; HUR; CHUNG, 2021). Sistemas com essas características possibilitam a modificação de milhares de células em um curto espaço de tempo, possibilitando aplicações industriais que demandam um grande número de linhagens recombinantes; já o maior controle fornece uma maior uniformidade na entrega, possibilitando maiores taxas de viabilidade celular (BROOKS *et al.*, 2020).

Diversas metodologias para essa inserção em células vêm sendo estudadas em dispositivos microfluídicos, e geralmente são inspirados nos métodos tradicionais. Os mais utilizados são dispositivos que causam a permeabilização da membrana celular de maneira física, criando poros transientes através da aplicação de forças mecânicas, que podem ocorrer por eletroporação (GARCIA *et al*, 2016; LISSANDRELLO *et al*, 2020), por constrições celulares (*cell squeezing*) (SHAREI *et al*, 2013; JOO *et al*, 2021) ou por pressões causadas por um fluxo turbulento (hidroporação) (JARRELL *et al*, 2019; HUR *et al.*, 2020).

Os dispositivos baseados em hidroporação se utilizam da microescala e da geometria para criar um fluxo turbulento (também chamado de pressões de cisalhamento de fluxo) e, com isso, permeabilizar a membrana celular. Essa técnica é relativamente nova, mas apresenta taxas de eficiência e viabilidade celular satisfatórias (HUR; CHUNG, 2021; CHAKRABARTY *et al.*, 2022). Hur e colaboradores (2020) desenvolveram um dispositivo com a geometria onde as células, introduzidas em uma alta velocidade, se chocam na parede do microcanal, gerando as deformações na membrana celular, utilizado para a transfecção de linhagens celulares com diversas moléculas. Jarrell e colaboradores (2019) apresentaram um dispositivo microfluídico em vidro com a transfecção de linfócitos T usando RNA mensageiro (mRNA). O dispositivo utiliza o fenômeno denominado *vortex shedding* microfluídico (μ VS), que ocorre com a passagem de fluidos por barreiras, criando poros nas membranas das células através das condições hidrodinâmicas. Quando comparado às metodologias tradicionais, apresentou uma taxa de viabilidade celular menor, porém se mostrou mais eficaz na transfecção, com taxa de eficiência maior. Semelhante a essa abordagem com a utilização de vórtices, Kang e colaboradores (2020) desenvolveram um dispositivo em dimetil polissiloxano (PDMS) para a transfecção de células epiteliais e linfoblastos com mRNA, FITC-dextran e nanopartículas de ouro. A geometria apresentada tem um cruzamento de canais, gerando vórtices no ponto de sobreposição causando a permeabilização da membrana.

Neste trabalho foram desenvolvidos e fabricados dispositivos microfluídicos para, futuramente, serem utilizados para modificações genéticas em células. Foram desenvolvidos dispositivos com duas abordagens diferentes: a primeira, em silício e vidro, fabricado pela técnica de fotolitografia com corrosão úmida, e a segunda com dispositivos em poli(éter-éter-cetona) (PEEK) fabricado por microusinagem. Os dispositivos em silício e vidro permitem uma maior precisão de fabricação, portanto foram fabricados microcanais em menor escala e com pilares internos. Os dispositivos em PEEK, um polímero biocompatível, e a técnica de microfabricação permitem a fabricação de mais dispositivos com maior facilidade, mas com menor precisão, e para estes foram elaboradas geometrias em formato T. Os dispositivos fabricados foram avaliados quanto a sua fabricação e estanqueidade. As aplicações futuras se estendem para áreas

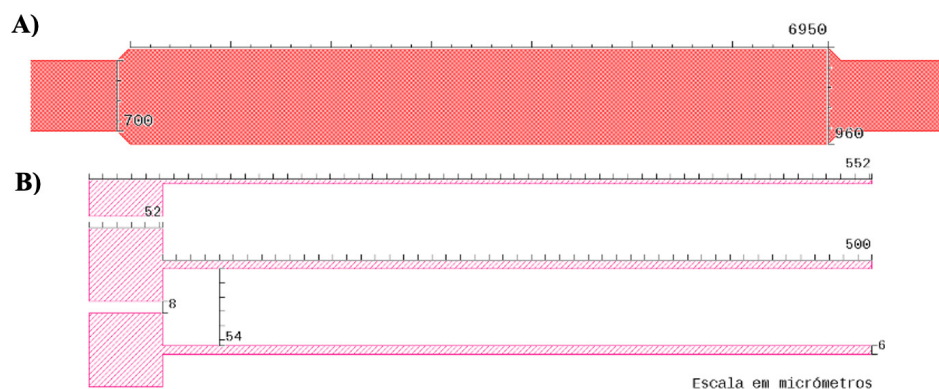
que demandem e utilizem linhagens celulares recombinantes, como a biotecnologia industrial e, em especial, biomédica, que geralmente utilizam linhagens sensíveis e de difícil modificação, podendo se beneficiar destes dispositivos para o desenvolvimento de terapias gênicas ou celulares.

2 Procedimento metodológico

2.1 Fabricação do dispositivo microfluídico em silício e vidro

Os dispositivos foram desenvolvidos em lâminas de silício tipo P polida Si<1,0,0>, e espessura de 675 μm (MEMC Eletronic Materials), e uma lâmina de vidro modelo V015.-040003/B (Plan Optik AG). Os desenhos técnicos dos canais foram feitos em software ADS (Keysight Technologies), com largura de 960 μm e comprimento de 6950 μm , com um furo de acesso para o canal com diâmetro de 700 μm . As estruturas em formato de pilar apresentam 52 μm de largura, com distância de 8 μm entre os pilares. A **FIGURA 1** mostra as medidas e desenhos técnicos dos microcanais descritos.

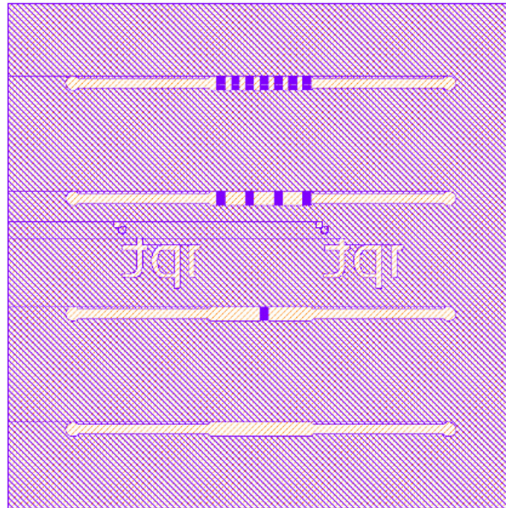
Figura 1 - Desenho técnico e medidas dos microcanais propostos para o dispositivo microfluídico em silício e vidro. Em (A) temos a estrutura do canal vazio e em (B) as estruturas dos pilares de maneira detalhada, mostrando a barreira que será atravessada pelas células.



Fonte: elaborado pelos autores.

A **FIGURA 2** mostra os 4 microcanais propostos: sem barreiras, com 1 conjunto de barreiras, com 4 conjuntos de barreiras e com 7 conjuntos de barreiras.

Figura 2 - Desenho proposto para o dispositivo microfluídico em silício e vidro. Esse desenho foi utilizado para fabricar a máscara, o primeiro passo para a fabricação dos dispositivos. No desenho, as partes que não estão destacadas na cor roxa foram corroídas durante o processo.



Fonte: elaborado pelos autores.

A fabricação foi feita pela metodologia de fotolitografia com corrosão úmida por hidróxido de potássio (KOH). As lâminas de silício foram totalmente recobertas com o promotor de adesão TI-PRIME (MicroChemicals GmbH) e em seguida o fotorresiste AZ 1518 (Merck Performance Materials GmbH), ambos utilizando o spin coater 200X (Brewer Science Inc.) e hot plate 1300X (Brewer Science Inc.) a 100 °C por 90 segundos. Para marcação dos microcanais, as lâminas foram colocadas na alinhadora EVG®620 (EVG), onde foram expostas à máscara com os microcanais por um tempo de exposição de 3,8 segundos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em uma solução do fotorrevelador AZ351B developer (1 AZ351 : 5 água) (Merck Performance Materials GmbH) por 1 minuto em um agitador magnético sob agitação de 240 rpm.

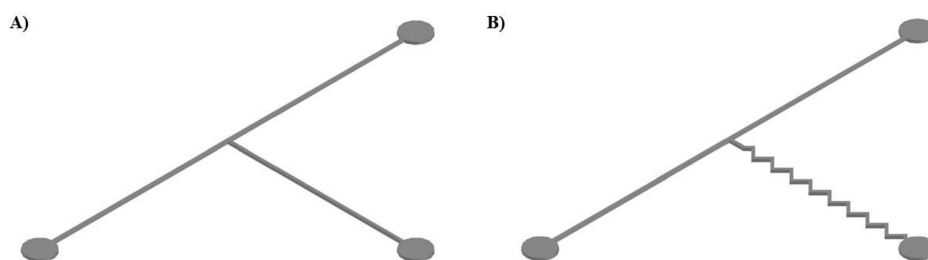
Para a corrosão, as lâminas de silício foram mergulhadas em uma solução de *Buffered Oxide Etch* (BOE) (J.T.Baker) (1:6) comercial por 6 minutos. Posteriormente, as lâminas de silício foram mergulhadas em uma solução de 45% de KOH, e colocadas em um agitador magnético sob agitação de 120 rpm e temperatura de 70 °C durante 45 minutos, tempo calculado para uma corrosão de 30 µm dos microcanais. Depois foi feita uma limpeza na lâmina com o buffer de ácido fluorídrico (HF) por 20 segundos. A selagem da lâmina de silício com a lâmina de vidro foi feita utilizando o equipamento Wafer Bonder AWB-08 (Applied Microengineering Ltd), seguindo o protocolo informado pelo fornecedor com os seguintes parâmetros: 370 °C, 800 V e 0,62 mA.

Para a operação do dispositivo, foi fabricado um suporte para a conexão das mangueiras ao dispositivo, além de auxiliar na estanqueidade do sistema pressurizado. O suporte foi fabricado em aço 1020, por usinagem em máquina CNC com microfresa.

2.2 Projeto e fabricação do dispositivo microfluídico em PEEK

Os dispositivos fabricados são compostos pelo polímero PEEK, com a selagem feita por uma peça, fabricada com o mesmo material, que também contém as aberturas para as conexões das mangueiras. Os desenhos foram feitos em software ADS, com os microcanais com largura de 100 μm , comprimento do canal maior de 300 μm , comprimento do canal menor de 200 μm e profundidade de 100 μm , com um furo de acesso para o canal com diâmetro de 0,3 mm. Como mostra a **FIGURA 3**, foram propostas 2 geometrias diferentes: a geometria A, com o microcanal em formato de T, e a geometria B, com modificações no T. A velocidade média dos veículos do sistema de transporte público urbano, em todos os corredores e nas faixas exclusivas, é monitorada e divulgada mensalmente, por meio dos relatórios informativos. Em agosto/2022 a velocidade média foi de 21,0 km/h e 22,0 km/h nas direções bairro/centro e centro/bairro respectivamente (SPTrans, 2022). As velocidades desenvolvidas pelos ônibus nos corredores são baixas, o que indica que as utilizações de ônibus elétricos e híbridos podem ser viáveis como solução para transporte público menos poluente.

Figura 3 - Desenho técnico e medidas dos microcanais propostos para o dispositivo em PEEK.



Fonte: elaborado pelos autores.

A fabricação dos dispositivos foi feita pela usinagem direta dos blocos de PEEK, utilizando o centro de usinagem de alta precisão de 5 eixos para corte de alta velocidade HSC MP7/5 (Exeron GmbH). A fresa utilizada foi a microfresa de topo de carboneto de tungstênio com diâmetro de ferramenta $D = 0,07$ mm (NS Tools Co.,LTD).

2.3 Análise topológica dos dispositivos microfluídicos

A estrutura dos microcanais foi avaliada por microscopia óptica.

2.4 Testes de estanqueidade

Após a fabricação, os dispositivos foram testados para garantir a sua estanqueidade em vazões específicas para sua operação, além de verificar possíveis entupimentos e vazamentos nos microcanais.

Para os dispositivos em silício e vidro, foi utilizada uma bomba de duplo pistão CP-Class Pump (Teledyne) para circular água destilada e filtrada no dispositivo com mangueiras de teflon de 1/8 de diâmetro externo e 1/16 de diâmetro interno. O dispositivo foi colocado sobre o microscópio digital VHX-600 (Keyence) para monitorar o líquido e acompanhar possíveis entupimentos.

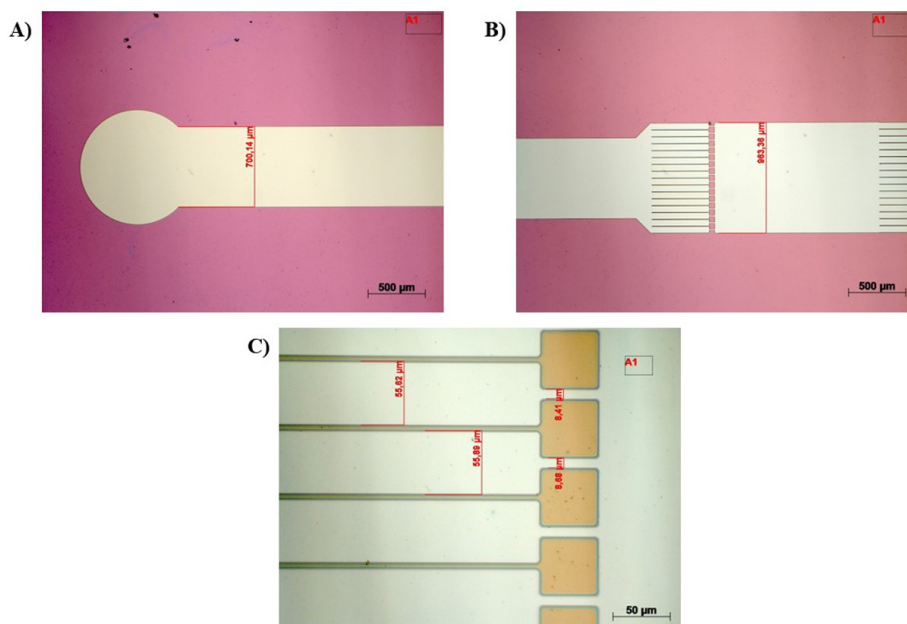
Para os dispositivos em PEEK, foi utilizada uma bomba de seringa BASE 120 NEM-B100-02 A, acoplada com o módulo para alta pressão NEMESYS® (CETONI GmbH), com seringa de aço inoxidável de 50 mL (CETONI GmbH) para circulação de água destilada e filtrada pelo dispositivo, com mangueiras 1/16 de PEEK (IDEX 1538 – Cole-Parmer®). Foram utilizados conectores em PEEK para mangueiras de 1/16 (IDEX XP-286X – Cole-Parmer®) e um conector em Y (IDEX P-512 – SciPro®). Para controle e operação da bomba, foi utilizado o *software* Qmix Elements v20190108 (CETONI GmbH).

3 Resultados e discussão

3.1 Dispositivos em silício e vidro

Os microcanais fabricados foram avaliados por microscopia óptica, verificando a largura dos microcanais e a distância entre os pilares construídos, como mostra a FIGURA 4. Na entrada do microcanal, a largura medida foi de 700,14 μm , entre os conjuntos de barreiras a largura foi de 963,36 μm , entre as estruturas das barreiras de 55,62 μm e entre os pilares de 8,41 μm . As medições feitas correspondem com as medidas do desenho proposto, garantindo que o processo de corrosão manteve as medidas planejadas do desenho da fotomáscara.

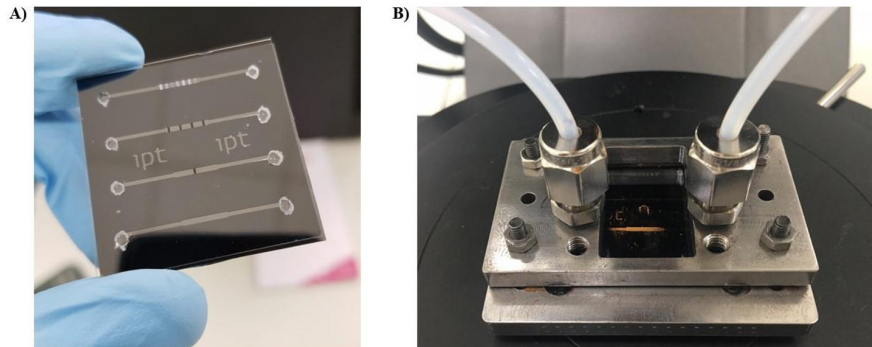
Figura 4 - Medições dos microcanais fabricados em silício. Em (A) é mostrada a entrada do microcanal. Em (B) o espaço entre os conjuntos de barreiras. Em (C) temos as estruturas de barreiras e seus pilares em destaque, com suas respectivas medidas.



Fonte: elaborado pelos autores.

A FIGURA 5 mostra o dispositivo microfluídico final, que é composto pelas lâminas processadas e o suporte desenvolvido para encaixe das mangueiras e conexões.

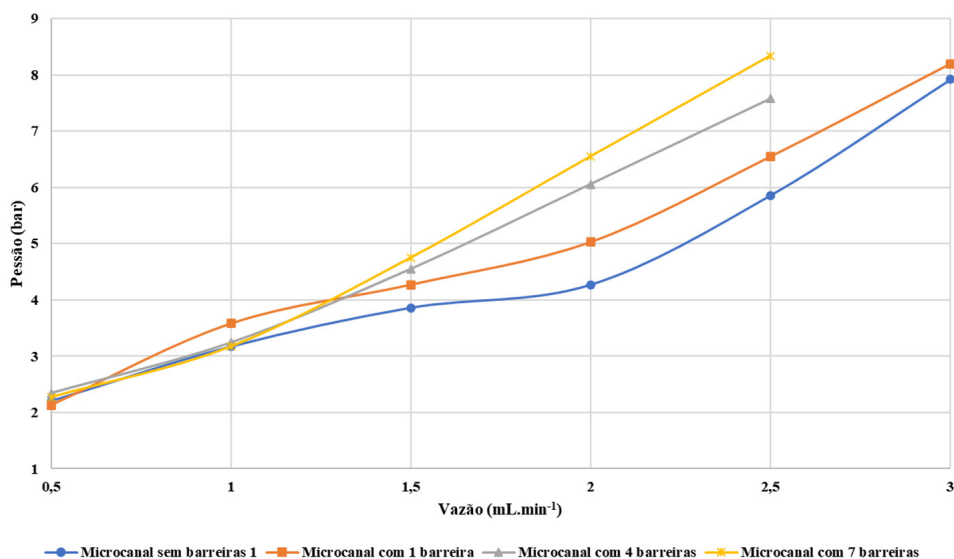
Figura 5 - Dispositivo microfluídico em silício e vidro. Em (A) as lâminas após a selagem anódica, com os microcanais propostos e suas entradas e saídas. Em (B) a montagem do dispositivo, com o suporte para o encaixe das mangueiras de entrada (esquerda) e saída (direita), permitindo a operação do dispositivo.



Fonte: elaborado pelos autores.

A partir da fabricação, foram feitos testes de estanqueidade e resistência do dispositivo, avaliando o fluxo do fluido no interior em seu interior e a pressão resultante no sistema. Todos os 4 microcanais propostos foram testados. No trabalho de Jarrell e colaboradores (2019), os testes biológicos foram realizados em pressões de 8 a 10 bar, portanto os microcanais elaborados foram testados até atingir pressões próximas de 8 bar, como mostrado na FIGURA 6.

Figura 6 - Testes de pressão em função da vazão no dispositivo microfluídico em silício e vidro em todos os microcanais fabricados.



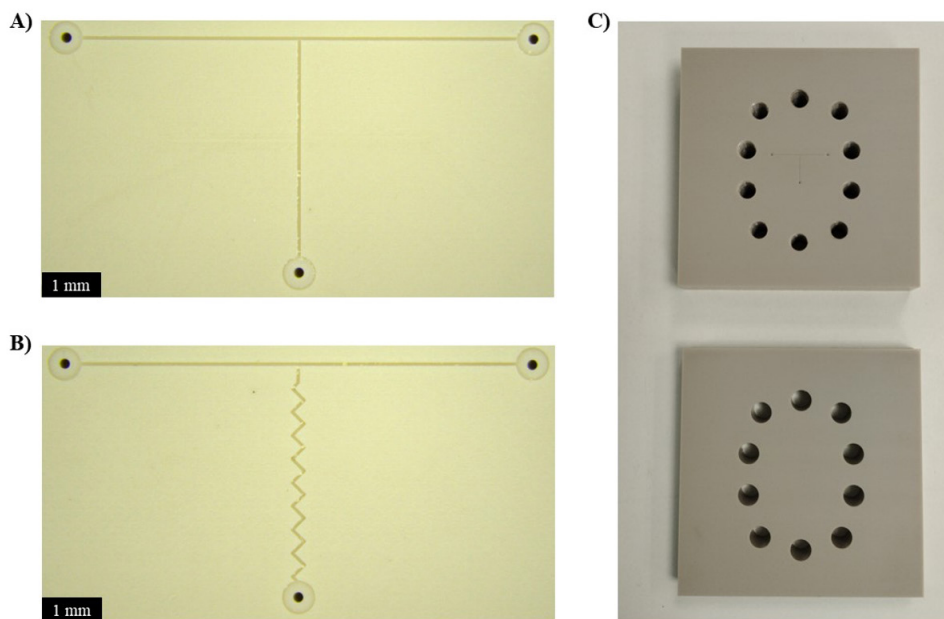
Fonte: elaborado pelos autores.

Os testes de estanqueidade mostraram que o dispositivo microfluídico é funcional, com entrada e saída de líquidos sem ocorrer vazamentos durante o processo. A **FIGURA 6** mostrou que os microcanais com mais barreiras atingem pressões mais altas com as mesmas vazões, sugerindo que essas estruturas podem interferir no fluxo dos líquidos nos interiores dos microcanais.

3.2 Dispositivos em PEEK

Os microcanais fabricados foram avaliados por microscopia óptica, como mostra a **FIGURA 7A** e **7B**. Na **FIGURA 7C** temos a montagem do sistema, contendo o suporte fabricado para o acoplamento das mangueiras e conexões.

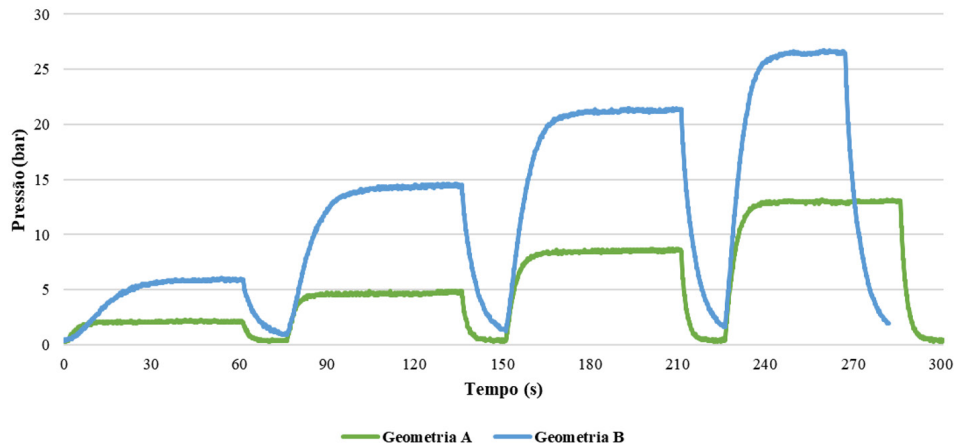
Figura 7 - Microscopia óptica das geometrias fabricadas em PEEK. Em (A) e (B) temos as diferentes geometrias propostas para estes dispositivos. Em (C) temos o dispositivo e o suporte para operação e conexões das mangueiras.



Fonte: elaborado pelos autores.

Os dispositivos foram avaliados quanto a estanqueidade do sistema, verificando a pressão máxima suportada e tempo para a estabilização da pressão requerida. A pressão do sistema foi monitorada pelo próprio *software* ao longo do tempo, gerando os resultados apresentados na **FIGURA 8**.

Figura 8 - Testes de estanqueidade dos dispositivos microfluídicos em PEEK, comparando os resultados obtidos com as geometrias A e B. Ambas as curvas mostram as pressões resultantes em diferentes vazões ao longo do tempo. Como esperado, em ambos os dispositivos as pressões resultantes são maiores conforme o aumento da vazão.



Fonte: elaborado pelos autores.

Os gráficos gerados mostram que, na geometria A podemos observar que o tempo de estabilização da pressão é entre 0 e 8 segundos. Na geometria B, temos pressões mais elevadas nas mesmas vazões utilizadas na geometria A e, diferente da outra geometria, o tempo de estabilização da pressão foi entre 0 e 20 segundos. Durante o experimento, na vazão de 10 mL.min⁻¹, o ensaio foi interrompido antes do minuto acabar, pois o limite de operação da seringa (27 bar) foi atingido. A TABELA 1 mostra a junção dos resultados obtidos com ambas as geometrias, com a média das vazões obtidas em cada intervalo de vazão.

Tabela 1 - Média dos valores de pressão obtidos nos testes de estanqueidade dos dispositivos microfluídicos em PEEK.

Vazão (mL/min-1)	Pressão resultante (bar)	
	Geometria A	Geometria B
2,5	1,95	4,59
5	4,43	12,28
7,5	8,01	18,74
10	12,22	19,12

Fonte: elaborado pelos autores.

Com isso, foi constatado que ambos os dispositivos em PEEK, com geometrias diferentes, operam sem vazamentos e sem quebras. A geometria B apresenta pressões mais elevadas nas mesmas vazões quando comparada com a geometria A. Esse aumento era esperado, visto que a modificação feita no T gera mais obstáculos para a passagem do líquido, interferindo diretamente na pressão resultante. As informações obtidas sobre o tempo de estabilização da pressão no interior do dispositivo serão utilizadas para a elaboração do protocolo de experimentos biológicos futuramente.

A partir dos resultados de ambos os dispositivos, em silício e vidro e em PEEK, foi possível compará-los quanto à sua operação. Foram estudados dois conjuntos de geometrias diferentes, adaptadas para os materiais e metodologias de fabricação utilizados.

Geralmente, os dispositivos microfluídicos que utilizam a metodologia de hidroporação apresentam microcanais com medidas entre 20 a 80 μm (DENG *et al*, 2018; JARRELL *et al*, 2019; HUR *et al*, 2020). Materiais como o silício e vidro apresentam metodologias de fabricação com uma maior precisão, permitindo a fabricação de microcanais com dimensões menores e com estruturas internas mais complexas. Para a aplicação desejada, as dimensões podem interferir, pois microcanais menores podem favorecer a interação das células com as moléculas para modificação genética, permitindo assim a intensificação do processo (MARQUES; FERNANDES, 2011). Considerando este aspecto, os dispositivos em silício e vidro podem ser uma alternativa interessante, justamente para a fabricação de geometrias em escala menor. Porém, quando comparados, principalmente em termos de escalonamento e reprodutibilidade, os dispositivos fabricados por microusinagem permitem a fabricação de diversas cópias da mesma geometria em um baixo tempo (GUCKENBERGER *et al*, 2015). Considerando que uma das características desejáveis para novas metodologias de modificação genética é um custo reduzido e escalonamento do processo, essas vantagens são interessantes principalmente para a comercialização destes dispositivos (SUN; DUAN, 2020).

Os testes de estanqueidade mostram que os dispositivos em PEEK apresentam uma maior resistência em pressões mais elevadas. Pela diferença de escala dos microcanais entre os dispositivos, entende-se que para a operação deste dispositivo será necessária uma pressão mais elevada do que o mostrado na literatura (JARRELL *et al*, 2019). O polímero PEEK, quando comparado com o silício e vidro, apresenta uma menor propensão a quebras e entupimentos; esses atributos podem ser úteis considerando a possibilidade de escalonamento do processo.

O desenvolvimento de novas metodologias para internalização celular visa, principalmente, superar as limitações que as técnicas atuais apresentam, como altos custos de

execução, toxicidade e baixa escalabilidade, permitindo a ampliação das aplicações e aperfeiçoamento das atuais (STEWART; LANGER; JENSEN, 2018). Algumas características são desejáveis para o desenvolvimento de novas tecnologias, como possibilidade de escalonamento do processo, ser aplicável em diversas linhagens celulares (incluindo linhagens de difícil transfecção ou transformação), biocompatibilidade, controle do sistema e baixo custo (SUN; DUAN, 2020; HUR; CHUNG, 2021). A microfluídica pode contribuir com estes pontos, principalmente com o escalonamento e intensificação do processo.

4 Conclusões

Os dispositivos propostos foram fabricados de maneira satisfatória, apresentando bons resultados de operação em diversas pressões testadas. Os próximos passos vão envolver a elaboração de um protocolo para a utilização do dispositivo em testes biológicos, envolvendo a modificação genética de diversas linhagens celulares, comparando com as metodologias tradicionais.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Processo número 88887.497912/2020-00), a Fundação de Apoio ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (FIPT) e ao Fraunhofer-Institut für Produktionsanlagen und Konstruktionstechnik.

6 Referências

BROOKS, J., Minnick, G., Mukherjee, P., Jaber, A., Chang, L., Espinosa, H. D., & Yang, R. High throughput and highly controllable methods for in vitro intracellular delivery. **Small**, v. 16, n. 51, p. 2004917, 2020.

CHAKRABARTY, P., Gupta, P., Illath, K., Kar, S., Nagai, M., Tseng, F. G., & Santra, T. S. Microfluidic mechanoporation for cellular delivery and analysis. **Materials Today Bio**, p. 100193, 2021.

DENG, Y., Kizer, M., Rada, M., Sage, J., Wang, X., Cheon, D. J., & Chung, A. J. Intracellular delivery of nanomaterials via an inertial microfluidic cell hydroporator. **Nano letters**, v. 18, n. 4, p. 2705-2710, 2018.

GARCIA, P. A., Ge, Z., Kelley, L. E., Holcomb, S. J., & Buie, C. R. High efficiency hydrodynamic bacterial electrotransformation. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 3, p. 490-500, 2017.

GUCKENBERGER, D. J., De Groot, T. E., Wan, A. M., Beebe, D. J., & Young, E. W. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 11, p. 2364-2378, 2015.

HUR, J., Park, I., Lim, K. M., Doh, J., Cho, S. G., & Chung, A. J. Microfluidic cell stretching for highly effective gene delivery into hard-to-transfect primary cells. **ACS nano**, v. 14, n. 11, p. 15094-15106, 2020.

HUR, Jeongsoo; CHUNG, Aram J. Microfluidic and nanofluidic intracellular delivery. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004595, 2021.

JARRELL, J. A., Twite, A. A., Lau, K. H., Kashani, M. N., Lievano, A. A., Acevedo, J., ... & Pawell, R. S. Intracellular delivery of mRNA to human primary T cells with microfluidic vortex shedding. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

JOO, B., Hur, J., Kim, G. B., Yun, S. G., & Chung, A. J. Highly efficient transfection of human primary T lymphocytes using droplet-enabled mechanoporation. **ACS nano**, v. 15, n. 8, p. 12888-12898, 2021.

LISSANDRELLO, C. A., Santos, J. A., Hsi, P., Welch, M., Mott, V. L., Kim, E. S., ... & Tandon, V. High-throughput continuous-flow microfluidic electroporation of mRNA into primary human T cells for applications in cellular therapy manufacturing. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.

LUO, Dan; SALTZMAN, W. Mark. Synthetic DNA delivery systems. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 33-37, 2000.

MARQUES, Marco PC; FERNANDES, Pedro. Microfluidic devices: useful tools for bio-process intensification. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8368-8401, 2011.

SHAREI, A., Cho, N., Mao, S., Jackson, E., Poceviciute, R., Adamo, A., ... & Jensen, K. F. Cell squeezing as a robust, microfluidic intracellular delivery platform. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 81, p. e50980, 2013.

STEWART, Martin P.; LANGER, Robert; JENSEN, Klavs F. Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts. **Chemical reviews**, v. 118, n. 16, p. 7409-7531, 2018.

SUN, Mengjie; DUAN, Xuexin. Recent advances in micro/nanoscale intracellular delivery. **Nanotechnology and Precision Engineering**, v. 3, n. 1, p. 18-31, 2020.

10.29327/2152495.8.23-1



Artigo Técnico

Avaliação da eficácia biocida dos produtos sulfato de tetra (hidroximetil) fosfônio (THPS), glutaraldeído e isotiazolona frente a Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em diferentes escalas de cultivo de Número Mais Provável (NMP)

Evaluation of the biocidal efficacy of products tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS), glutaraldehyde and isothiazolone for Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) in different Most Probable Number (MPN) cultivation scales

Henrique Moreira Simon^a, Maria Filomena de Andrade Rodrigues^a.

^a Laboratório de Biotecnologia Industrial, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

*e-mail: hsimon@ipt.br

Palavras-chave: BRS; biocida; NMP; microescala.

Keywords: SRB; biocide; MPN; microscale.

Resumo

O controle de bactérias redutoras de sulfato (BRS) na indústria petrolífera é feito com biocidas. O monitoramento da eficácia destes produtos pode ser verificado com contagens de população viável após exposição ao biocida. A contagem de Número Mais Provável (NMP) é a mais utilizada para BRS. Aspectos como tempo de incubação e espaço físico motivam a busca de ensaios para avaliar de maneira célere a atividade antimicrobiana de biocidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de três produtos (THPS, glutaraldeído e isotiazolona) frente às linhagens *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 e *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, com métodos distintos para quantificação de NMP em relação ao meio de cultura utilizado e à escala de cultivo adotada para quantificação. Os ensaios foram realizados com o método convencional em frascos e com o método em microplacas incubadas em jarras com gerador de ambiente anaeróbico. Os produtos foram avaliados em 5 concentrações mais um controle (sem tratamento), determinadas a partir da sua concentração inibitória mínima teórica descrita pelo fabricante. O tempo de contato dos microrganismos com os biocidas foi de 15 minutos, e os ensaios de recuperação de carga microbiana foram realizados nas escalas informadas. Os resultados observados atestam as contagens de BRS em microplaca como opção viável para validar produtos biocidas de uso em campo, com obtenção de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) comparáveis para o THPS entre os diferentes métodos (100 mg/L) e com valores coerentes com os observados na literatura para glutaraldeído (100 mg/L e 250 mg/L).

Abstract

*The control of sulfate-reducing bacteria (SRB) in the oil industry is done with biocides. Monitoring the effectiveness of these products can be verified with viable counts after exposure to the biocide. The Most Probable Number (MPN) is the most commonly technique used for BRS. Aspects such as incubation time and physical space motivate the search for tests to quickly assess the antimicrobial activity of biocides. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of three products (THPS, Glutaraldehyde and Isothiazolone) against the strains *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 and *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, with different methods for quantification of MPN in relation to the culture medium used and the scale adopted for quantification. The assays were performed with the conventional method in flasks and with the method in microplates incubated in jars with anaerobic generator generator. The products were*

evaluated at 5 concentrations and with a control (without treatment), according their theoretical minimum inhibitory concentration described by the manufacturer. The contact time of the microorganisms with the biocides was 15 minutes, and the microbial load recovery tests were carried out at the informed scales. The observed results attest to SRB counts in microplates as a viable option to validate biocide products for use in-field, obtaining comparable Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values for THPS between different methods (100 mg/L) and values consistent with those observed in the literature for Glutaraldehyde (100 mg/L and 250 mg/L).

1 Introdução

A corrosão microbiológica ou biocorrosão é o fenômeno de corrosão ocasionado pela atividade de microrganismos na superfície de metais (ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE, 2014). A biocorrosão é associada como a causa direta de falhas por corrosão na indústria petrolífera, com custo anual de manutenção na ordem de bilhões de dólares (KOCH *et al*, 2016). Os microrganismos podem influenciar a corrosão por mecanismos diversos, tais como a produção de metabólitos corrosivos; a remoção direta de elétrons da superfície dos metais; e criação de células de aeração diferencial no interior dos biofilmes (LITTLE *et al.*, 2016; RODRIGUES, T. *et al.*, 2013). As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) são apontadas como as espécies mais significativas para eventos de biocorrosão no ambiente petrolífero, pois usam o sulfato como aceptor terminal de elétrons e carbono orgânico ou Fe(0) como doador de elétrons para seu metabolismo dissimilatório. Estas reações causam corrosão das superfícies de ligas como aço-carbono, e a concomitante produção de sulfeto de hidrogênio, um composto tóxico e corrosivo aos seres humanos. O tratamento de rotina para prevenção e controle da corrosão associada às BRS consiste na limpeza com agentes mecânicos e a aplicação de produtos químicos, como inibidores de corrosão ou biocidas, para mitigar a proliferação destes microrganismos nos sistemas petrolíferos (VIDELA e HERRERA, 2009; ARAÚJO, L. *et al*, 2013).

A rotina de monitoramento de contaminação microbiológica em ambientes industriais pode utilizar métodos dependentes de cultivo em meios específicos, com o intuito de confirmar a inativação de microrganismos após aplicação de biocidas (ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE, 2014). A técnica de contagem por número mais provável (NMP) em meio seletivo é utilizada historicamente para confirmar a presença de BRS, com a formação de precipitados negros de sulfeto ferroso

no conteúdo dos frascos utilizados no cultivo em diluição seriada para quantificação das BRS. Estas análises demandam longos tempos de incubação para obter contagens confiáveis de NMP, devido à ao metabolismo lento das bactérias e necessidade de adaptação no meio de cultura (POSTGATE, J.R., 1984).

Devido à exigência de rápidos resultados para os níveis de contaminação por BRS para direcionar a aplicação de biocidas, o objetivo deste trabalho foi propor ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana de três biocidas (THPS, glutaraldeído e isotiazolona) frente às espécies BRS *Desulfotomaculum nigrificans* e *Desulfovibrio desulfuricans*, com o uso de métodos distintos para quantificação do NMP em relação ao meio de cultura utilizado e à escala de cultivo adotada para obtenção dos resultados.

2 Procedimento metodológico

O planejamento experimental dos ensaios realizados considerou as condições apresentadas na TABELA 1.

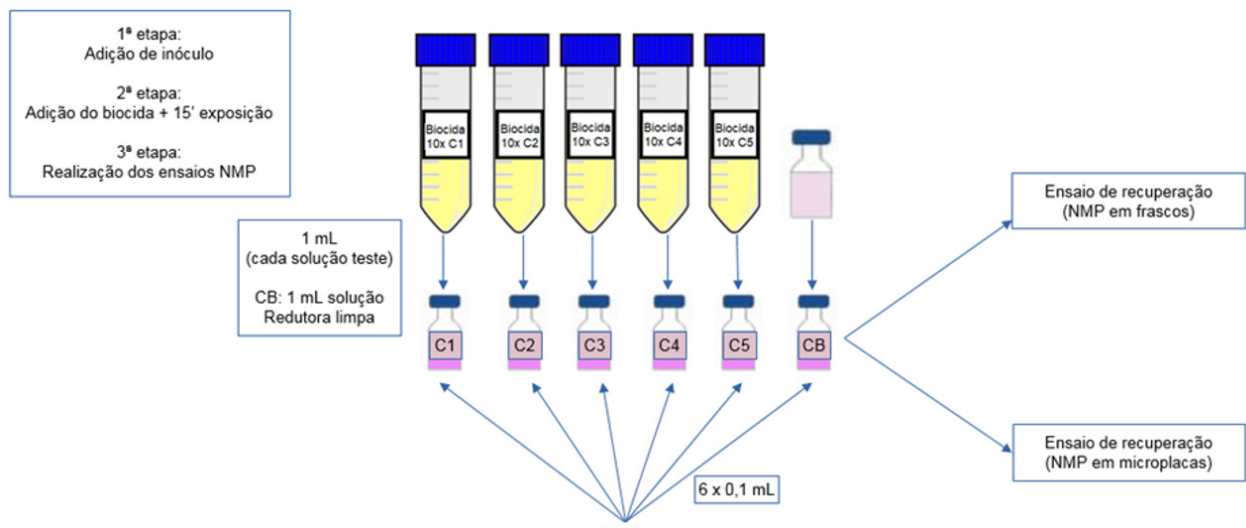
Tabela 1 - Condições utilizadas nos ensaios.

Linhagens
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998 (T = 55°C)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (T = 30°C)
Meios de Cultura
Postgate E Modificado (POSTGATE, 1984)
Meio ATCC nº 42 para espécies <i>Desulfovibrium</i> (ATCC, 2022)
Meio DA (NAKAO et al., 2009)
Meio DA modificado
Biocidas
Glutaraldeído, grau I (10, 25, 50, 100 e 250 mg/L)
Sulfato de Tetra(hidroximetil)fosfônio – THPS (10, 25, 50, 100 e 350 mg/L)
2-Metil-4-Isotiazolin-3-Ona (25, 50, 75, 100 e 500 mg/L)

Fonte: elaborado pelos autores.

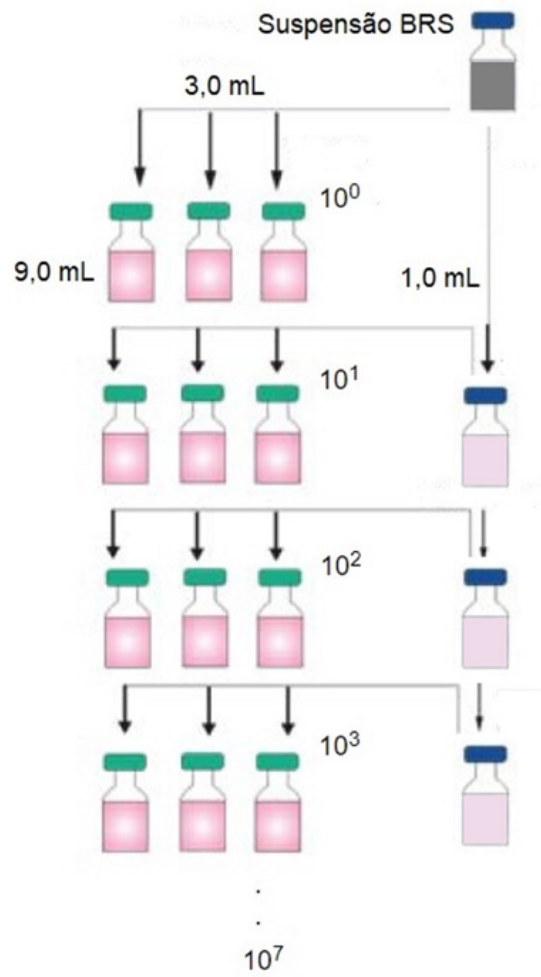
Os ensaios foram realizados com o método de NMP convencional em triplicata de frascos (HARRIGAN, 1998) e com o método de NMP em microplacas de 96 poços incubadas em jarra sob anaerobiose produzida por sistema Gaspak® a 30°C por até 7 dias, até a diluição de 10⁶ (NEUMANN, 2012). Todos os produtos foram avaliados em 5 concentrações mais um controle (sem tratamento), determinadas a partir da sua concentração inibitória mínima teórica descrita pelo fabricante. O tempo de contato das linhagens microbianas com os biocidas foi de 15 minutos, e imediatamente após a exposição foi realizada a quantificação de NMP pelos métodos descritos. As **figuras 1, 2 e 3** apresentam os esquemas utilizados nas atividades executadas.

Figura 1 - Esquema da avaliação de atividade antibacteriana.



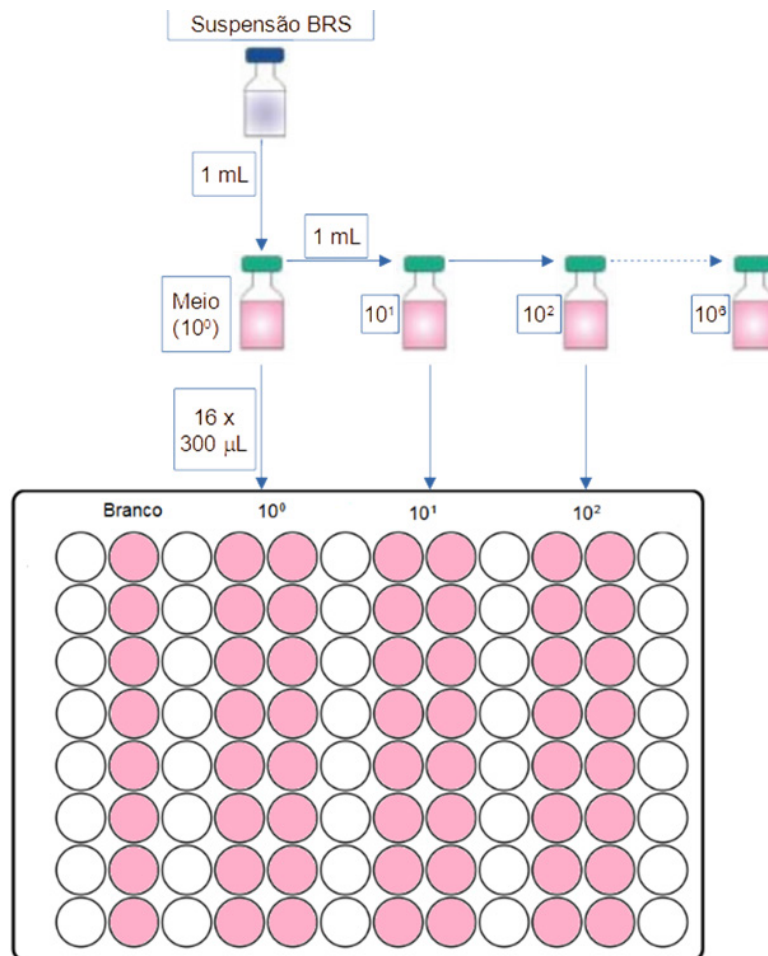
Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 2 - Esquema da Diluição do NMP em frascos.



Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 3 - Esquema da Diluição do NMP em microplacas.



Fonte: adaptado de Neumann (2012).

Os ensaios conduzidos avaliaram a possibilidade de redução do tempo de incubação em meios de cultura adequados para quantificar as BRS de maneira mais rápida como também otimizar o espaço físico necessário para incubação, com o uso de microplacas de 96 poços em comparação ao uso de frascos de 10 mL, baseado em trabalhos anteriores (BAUTISTA *et al.*, 2016; ASTUTI, PURWASENA e PUTRI, 2018).

3 Resultados e discussão

A avaliação biocida do THPS realizada por quantificação de NMP em frascos com o meio DA modificado apresentou as concentrações de 100 e 350 mg/L do produto THPS como inibitórias para o microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans*, com destaque para a inibição total do microrganismo frente a 350 mg/L, uma vez que não houve recuperação de microrganismo viável nos ensaios de NMP. Quando utilizado o meio DA nas quantificações do NMP, a inibição observada ocorreu a partir de 50 mg/L, e novamente a concentração 350 mg/L apresentou inibição completa.

Ao aplicar o uso do cultivo NMP em microplacas, a recuperação do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* somente apresentou resultados consistentes com o meio DA modificado para atestar atividade antibacteriana para o THPS pelo método NMP em microplacas. A inibição do microrganismo foi completa nas concentrações de 100 e 350 mg/L, com o detalhe de que foi possível confirmar um maior valor da carga de inóculo utilizado no ensaio ($3,2 \times 10^8$ NMP/mL), quando comparado ao método conduzido em frascos ($9,8 \times 10^6$ NMP/mL).

Os valores encontrados estão coerentes com os resultados obtidos em trabalhos anteriores, que apresentam este valor como responsável na redução de 3 ordens de grandeza na população de bactérias planctônicas e sésseis (DOW CHEMICAL CONTROL, 2009; LAVANIA *et al.*, 2011).

As **tabelas 2 e 3** apresentam os valores de contagens obtidos para a espécie *Desulfovibrio desulfuricans* pelos 2 tipos de ensaio de NMP, enquanto que as **figuras 4 e 5** apresentam os gráficos comparativos de populações BRS recuperadas em todas as condições.

Tabela 2 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 frente ao biocida THPS pelo ensaio de NMP em frascos, após 7 dias de incubação.

Meio de Cultura	Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10	25	50	100	350
DA Modificado	$9,8 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$8,3 \times 10^1$	Não Detectado
DA	$4,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	Não Detectado

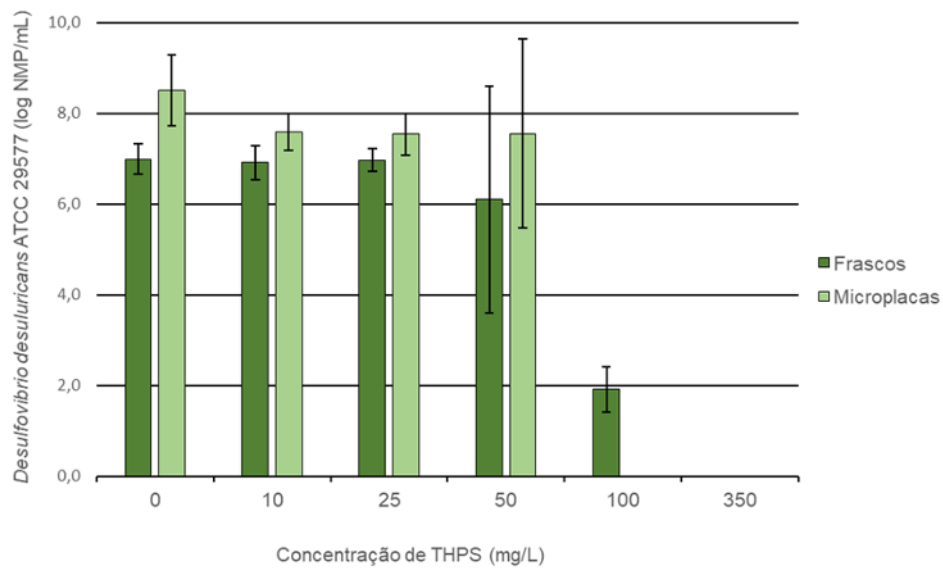
Fonte: elaborado pelos autores.

Tabela 3 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 frente ao biocida THPS pelo ensaio de NMP em microplacas, após 7 dias de incubação.

Meio de Cultura	Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10	25	50	100	350
DA Modificado	$3,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	Não Detectado	Não Detectado
DA	$9,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$9,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$

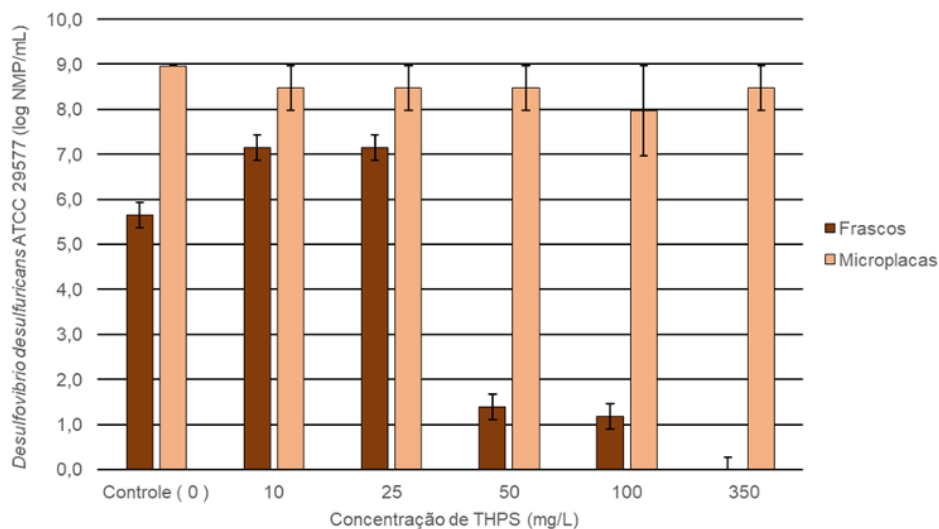
Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 4 – Avaliação do biocida THPS frente a *Desulfovibrium desulfuricans* no meio DA modificado (7 dias de incubação).



Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 5 – Avaliação do biocida THPS frente a *Desulfovibrium desulfuricans* no meio DA (7 dias de incubação).



Fonte: elaborado pelos autores.

O produto THPS apresentou resultados de inibição frente a *Desulfotomaculum nigrificans* em todas as concentrações avaliadas do THPS nos 3 meios de cultura usados na avaliação. Porém, não foi possível evidenciar uma concentração mínima inibitória do produto frente a este microrganismo pelo método de quantificação de NMP em microplacas com os meios Postgate E modificado e DA modificado. No caso do meio ATCC 42, foi possível evidenciar inibição completa do microrganismo na concentração de 350 mg/L. Não foi possível constatar ação antibacteriana nas demais concentrações avaliadas, uma vez que os valores de carga microbiana observados na exposição frente ao THPS a 10, 25, 50 e 100 mg/L apresentaram-se na mesma ordem de grandeza do valor observado na condição controle. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.

Tabela 4 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 frente ao biocida THPS pelo ensaio de NMP em microplacas, após 7 dias de incubação.

Meio de Cultura	Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10	25	50	100	350
Postgate E Modificado	$7,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$
DA Modificado	$1,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$
Meio ATCC n° 42	$1,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	Não Detectado

Fonte: elaborado pelos autores.

Par ao produto glutaraldeído, foi realizado ensaio de avaliação da atividade frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* com a metodologia de quantificação de NMP em microplaca. Os resultados estão apresentados na TABELA 5.

Tabela 5 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 frente ao biocida glutaraldeído pelo ensaio de NMP em microplacas, após 7 dias de incubação.

Meio de Cultura	Concentração glutaraldeído (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle	10	25	50	100	350
DA Modificado	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^3$
DA	$9,3 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$4,6 \times 10^4$	Não Detectado

Fonte: elaborado pelos autores.

Foi possível observar inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 a partir da concentração de 100 mg/L do glutaraldeído, valor este que se encontra de acordo com os dados encontrados na literatura frente aos microrganismos *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas*, também caracterizados como BRS. Cabe destacar que já foi observado que o glutaraldeído pode apresentar inibição a partir de baixos valores de concentração (25 mg/L) para este microrganismo, devido às suas propriedades físico-químicas que permitem auto-polimerização e reticulação das moléculas citoplasmáticas (LAVANIA et al., 2011; STRUCHTEMEYER, MORRISON e ELSHAHED, 2012).

Nos ensaios realizados não foram observados resultados de inibição do produto isotiazolona frente ao microrganismo *Dessulfovibrio dessulfuricans* ATCC 29577. É possível que o produto tenha interagido com os componentes da solução redutora usada como ambiente de ensaio, de modo a inativá-lo e assim permitindo a recuperação total da carga bacteriana usada no ensaio (WILLIAMS e SCHULTZ, 2015). O fato da avaliação do NMP em microescala não ter apresentado resultados após contato com a isotiazolona não significa que o método não serve para este produto biocida em especial. Um estudo mais aprofundado a respeito das interações dos compostos da classe das isotiazolonas precisa ser realizado antes de estabelecer a aplicação da metodologia de NMP em microplacas para suas avaliações.

A possibilidade de utilização do método em menor escala para quantificação de microrganismos em altas diluições nos testes de avaliação de biocidas abre uma perspectiva para a obtenção de respostas mais rápidas na rotina de controle da corrosão promovida pelas BRS para a tomada de decisões quanto ao produto mais adequado para utilização.

4 Conclusões

Os resultados obtidos permitem considerar como opção viável a adoção de contagens de NMP em microplaca como alternativa para validação de produtos biocidas de uso em campo. Os biocidas THPS e glutaraldeído apresentaram resultados de inibição comparáveis ao usar métodos distintos de recuperação e contagem de BRS viáveis, com a concentração de 100 mg/L do biocida THPS observada como a mínima inibitória quando realizada a exposição por 15 minutos e posterior quantificação do NMP da população viável recuperada com incubação de 7 dias nos meios selecionados e identificados como “DA” e “DA modificado”, em ambas as escalas selecionadas para a avaliação. O produto glutaraldeído apresentou resultados de inibição dos microrganismos nas concentrações de 100 mg/L e 250 mg/L nas mesmas condições de exposição e incubação, com a diferença de que este resultado foi verificado principalmente com uso dos meios de cultura “Postgate E Modificado”, “DA Modificado” e “ATCC 42 Medium”. Não foram observados resultados de inibição para o produto Isotiazolona nos ensaios realizados. Estudos futuros podem contribuir para a consolidação da metodologia em menor escala para avaliação de biocidas ou mesmo quantificação de microrganismos na rotina de monitoramento de corrosão com e com economia de tempo e insumos.

5 Agradecimentos

Fica o agradecimento ao IPT pela oportunidade de realizar a pós-graduação que gerou este trabalho, mediante Programa Interunidades em Biotecnologia (IPT-USP-Butantan), à Fundação de Apoio ao IPT (FIPT) pelo apoio financeiro disponibilizado para as atividades do projeto e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) e de Vazão (LV) na rotina de ensaios e tratamento de resultados.

6 Referências

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). **Consulta geral à Homepage**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

ARAÚJO, L. *et al.* Efeito de biocidas na corrosão induzida microbiologicamente do aço duplex em água de produção de petróleo. **Corrosão e Protecção de materiais**, v. 32, n. 4, p.108-114, out/nov/dez. 2013. Disponível em <https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros_Prot_Mater_Vol32_n4_2013.pdf>. Acesso em 30 jan. 2023.

ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE. **TM0194-2014-SG**: Field monitoring of bacterial growth in oil and gas systems. Houston, 2014. 31 p.

ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I. A.; PUTRI, F. Z. Potential of biosurfactant as an alternative biocide to control biofilm associated biocorrosion. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 104-111, 2018. Open Access, disponível em: <doi: 10.3923/jest.2018.104.111>. Acesso em 30 jan. 2023.

BARTLETT, K.; KRAMER, J. Comparative performance of industrial water treatment biocides. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Houston, 2011. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., p. 11399, 2011.

BAUTISTA, L. F. *et al.* Assessment of biocides and ultrasound treatment to avoid bacterial growth in diesel fuel. **Fuel Processing Technology**, v. 152, p. 56 – 63, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.06.002>>. Acesso em 30 jan. 2023.

DOW CHEMICAL CONTROL. **AQUCAR™ THPS 75 Water Treatment Microbiocide Antimicrobial for Industrial Water Treatment**. 2009 Disponível em: <<http://www.ben-cide.co.kr/data/AQUCAR%20THPS.pdf>>. Acesso em 30 jan. 2023.

HARRIGAN, W.F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3rd Ed., San Diego, California, 1998.

KOCH, G. *et al.* **International Measures of Prevention, Application, and Economics of Corrosion Technologies (IMPACT) Study**. 216p., 2016. Disponível em: <<http://impact.nace.org/documents/Nace-International-Report.pdf>>. Acesso em 30 jan. 2023.

LAVANIA; M. *et al.* Efficacy of natural biocide on control of microbial induced corrosion in oil pipelines mediated by *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 8, p. 1394–1402, Aug. 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9)>. Acesso em 30 jan. 2023.

LITTLE, B. J. *et al.* Microbially influenced corrosion - Any progress? **Corrosion Science**, v. 170:108641, 17 p., July 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2020.108641>>. Acesso em 30 jan. 2023.

NAKAO, K. *et al.* Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* isolates from humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5308–5311, Dec. 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/AAC.00630-09>>. Acesso em 30 jan. 2023.

NEUMANN, B. **Avaliação de nova metodologia para detecção de microrganismos redutores de sulfato (MRS) aplicada à indústria de petróleo e gás**. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2012.

POSTGATE, J.R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, England, 1984.

RODRIGUES, T. *et al.* Diversidade de microrganismos relacionados com a biocorrosão no sistema óleo e gás. **Corrosão e Protecção de materiais**, v. 32, n. 4, p.108-114, out/nov/dez. 2013. Disponível em <https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros_Prot_Mater_Vol32_n4_2013.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.

STRUCHTEMEYER, C. G.; MORRISON, M. D.; ELSHAHED, M. S. A critical assessment of the efficacy of biocides used during the hydraulic fracturing process in shale natural gas wells. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 71, p. 15-21, July 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.013>>. Acesso em 30 jan. 2023.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L.K. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n.7, p. 896-900, Oct. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.002>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

WILLIAMS, T. M.; SCHULTZ, C. M. Effect of environmental parameters on the stability and performance of oil and gas biocides. In: SPE **International Symposium on Oilfield Chemistry**, The Woodlands, April 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.2118/173782-MS>>. Acesso em 30 jan. 2022.

ZAMORA, A. C.; MALAVER, N. Methodological aspects for the culture and quantification of heterotrophic sulfate-reducing bacteria. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 32, n. 2, p. 121-125, May 2012. Disponível em: <http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/download/4811/4622>. Acesso em: 30 jan. 2023.

10.29327/2152495.8.23-2



Artigo Técnico

Aplicabilidade da Impressão 3D por Estereolitografia em Biotecnologia usando Dispositivos Mili- e Microfluídicos

*Application of Stereolithography
3D Printing in Biotechnology Using
Milli- and Microfluidic Devices*

Gabriel Griep^{abc*}, Edgar Andres Patiño-Nariño^a,
Isabela Aparecida de Araujo Andreotti^a, Mario
Ricardo Gongora-Rubio^a.

^a Laboratório de
Micromanufatura, Instituto
de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo
S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^b Universidade de São Paulo -
Departamento de Engenharia
de Sistemas Eletrônicos - LME

^c Fundação de Apoio ao IPT,
São Paulo-SP, Brasil

*e-mail: gabrielgriep@ipt.br

Palavras-chave: manufatura aditiva;
micromisturador; *Lab-on-a-Chip*.

Keywords: *additive manufacturing*;
micromixer; *Lab-on-a-Chip*.

Resumo

O desenvolvimento das técnicas de microfabricação, especialmente a impressão 3D e a microusinagem, têm expandido as aplicações de MEMS (do inglês, *Microelectromechanical Systems*) para dispositivos *Lab-on-a-Chip* (LOC), sendo a microfluídica uma das áreas de aplicação que mais progride. Suas aplicações podem se estender a diversos ramos da biotecnologia ao fundir conhecimentos de química, física e engenharias, introduzindo diversas melhorias em processos como redução do uso de reagentes e aumento da eficiência e controle de reações. Deste modo, destacamos o estudo dos fenômenos de escoamento em microfluídica devido as suas particularidades quando comparada à mecânica dos fluidos clássica, especialmente pelo predomínio do escoamento altamente laminar e capilar entre fluidos e processos lentos de difusão e de dispersão nas interfaces. Neste planejamento, propomos o desenho, simulação e manufatura de um micromisturador por impressão 3D por estereolitografia, que é uma das técnicas que desponta na área dado seu baixo custo relativo e facilidade de prototipação. O trabalho apresenta as etapas do projeto, análises numéricas, funcionamento, testes de citotoxicidade e possíveis aplicações dentro de biotecnologia.

Abstract

The advance in new microfabrication techniques, such as 3D printing and micromachining, has expanded the applications of MEMS (Microelectromechanical Systems) in Lab-on-a-Chip devices while microfluidics field shows great progress. Its applications include diverse fields of biotechnology by merging chemistry, physics and engineering concepts and by introducing process improvements like increase in efficiency and reduction of biological reactants. Therefore, we highlight the study of fluid mechanics in microscale dimensions due to its particularities compared to the classical theory regarding fluid physical phenomena. There is a predominance of highly laminar and capillary flow and slow diffusion and dispersion processes on the interfaces. In this project we propose a design, simulations and a fabrication protocol of a micromixer for reactants using 3D printing by stereolithography, which is a technique that stands out for its relative low cost and ease for prototyping. This article presents the workflow, numerical analysis, functionality, biocompatibility tests and possible applications in biotechnology.

1 Introdução

Observou-se nas últimas décadas o surgimento e a consolidação de uma nova tendência mundial: a miniaturização. Esta tendência tem se manifestado em diferentes ramificações da ciência e propiciou o surgimento de grande quantidade de microdispositivos (QIN *et al.*, 1998). Da mesma forma que os microchips eletrônicos revolucionaram o universo dos computadores e da eletrônica, a microfluídica tem revolucionado a química analítica permitindo a obtenção de dados que antes só eram obtidos em laboratórios especializados (MAIRHOFER; ROPPERT; ERTL, 2009; VAN DEN BERG *et al.*, 1998). A principal razão para a miniaturização tem sido aumentar o desempenho analítico, entretanto também se tornaram relevantes a redução do volume de reagentes e de amostras (da ordem de pL-nL), baixos custos de fabricação e a diminuição do tempo de análise (EHRFELD, 2003).

A ascensão dos microdispositivos analíticos começou no início da década de 90, com a apresentação de um microsistema para cromatografia em fase líquida (SQUIRES; QUAKE, 2005). Simultaneamente à apresentação desse microdispositivo, Manz *et al.* (MANZ, a.; GRABER; WIDMER, 1990) propuseram o conceito de microsistemas para análises totais, ou, simplesmente, μ TAS. Com o desenvolvimento dos μ TAS, tornou-se possível integrar várias etapas analíticas como injeção, mistura, pré-tratamento (seleção), reações químicas, separação e detecção em um único dispositivo (BRUUS, 2008; NGUYEN; WU, 2005). Este conceito que permite inserir várias etapas conjuntamente em um μ TAS são também denominados por “*Lab-on-a-Chip*” (LOC) (GIANNITSIS, 2011).

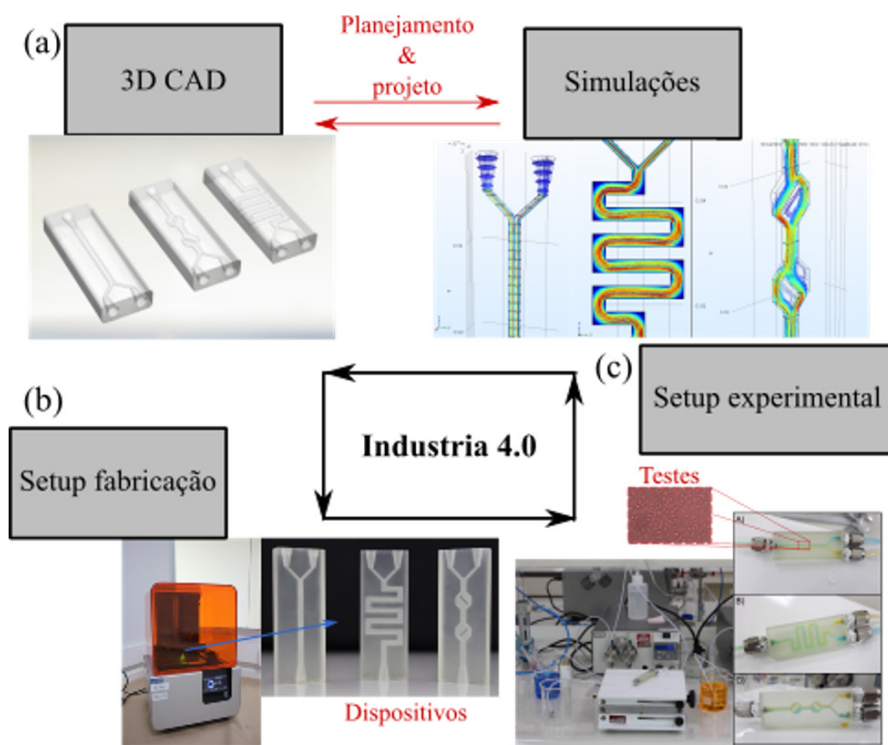
Os microdispositivos que operam com fluidos (microfluídica) apresentam muitas vezes interações fluido-estrutura, multifluidos, reações químicas, difusão térmica, escoamento multifásico e sólidos em suspensão (BRUUS, 2008). Assim, a miniaturização e o fluxo laminar nos *Lab-on-a-Chip* permitem um melhor controle do processo, reduzindo o consumo de reagentes e o tempo de análise. Portanto, estes possuem uma destacada aplicação em dispositivos de análise química e biológica. Uma importante etapa dos sistemas LOC é o controle de processos como manipulação de células, emulsões e reações químicas em microdispositivos (PATTANAYAK *et al.*, 2021; SQUIRES; QUAKE, 2005).

As técnicas de fabricação de sistemas LOC tradicionalmente envolveram processos de microfabricação em sala limpa, como fotolitografia e corrosão em substratos de vidro e silício, que são etapas características pela alta complexidade e custo. A partir

do avanço das tecnologias de impressão 3D ou manufatura aditiva, expandiram-se as possibilidades de fabricação de dispositivos microfluídicos com vantagens como rapidez em prototipagem, facilidade na modelagem de estruturas 3D internas e custos reduzidos (AMIN *et al.*, 2016). Desta forma, a criação de protocolos para melhoria na resolução de estruturas microfluídicas, a estratégia de manufatura e o estudo de materiais de impressão para aplicações em química analítica e biológicas têm sido tópicos de ampla investigação nos últimos dez anos (HART *et al.*, 2020; KREJCOVA *et al.*, 2014). Assim, dentre as diversas aplicações, destacamos seu uso em medicina para o prognóstico, diagnóstico e terapêutica, abordando a construção do dispositivo em estudo e demonstrando como o atual desafio é multidisciplinar, permitindo que profissionais de diversas áreas possam se especializar em impressão 3D.

Este trabalho apresenta a exploração da implementação do processo de fabricação através de impressão 3D por estereolitografia para implementação de mili- e microfluídica na faixa de escoamento volumétrico entre 0,5 ml/min até 4 ml/min. Dentro da metodologia proposta, usa-se a integração de softwares comercial e *open-source* para desenho CAD e simulação nas condições dos dispositivos fabricados por impressão 3D. Desse modo, é definido o projeto sobre a fabricação e experimentação para reprodutibilidade e aplicabilidade nos dispositivos e montagens como por exemplo: detalhes sobre a orientação da impressão (tamanho de camada e resolução), predição numérica dos regimes no escoamento dos fluidos e ângulo de contato com água (molhabilidade) das superfícies geradas pela impressão com resina. Finalmente, uma abordagem experimental sobre os dispositivos fabricados para casos simples de micromisturadores e testagem de biocompatibilidade são realizadas. Assim, se define uma metodologia de planejamento, predição, projeto, fabricação, testagem e prototipagem, dentro do esquema da indústria 4.0 (**FIGURA 1**) (JANDYAL *et al.*, 2022), que é derivada e inspirada em tecnologias para microfluídica empregadas no Laboratório de Micromanufatura do IPT, tais como LTCC e litografia (COBAS GOMEZ *et al.*, 2018).

Figura 1 - Metodológico de desenvolvimento e fabricação de microdispositivos usando impressão 3D e procedimento de indústria 4.0. Planejamento e projeto com (a) desenho em CAD e simulação em CFD. (b) Equipamento de impressão de estereolitografia e pelas impressas. (c) Bancada de testes de escoamento e biológicos.



Fonte: elaborado pelos autores.

Portanto, para estas análises se empregam três casos de microcanais para estudo inicial de funcionalidade. Entretanto para a implementação em biotecnologia (manipulação de materiais orgânicos) usando dispositivos em base a resina curada, são realizadas testagem sobre os dispositivos como análise de citotoxicologia para biocompatibilidade com resultados qualitativos.

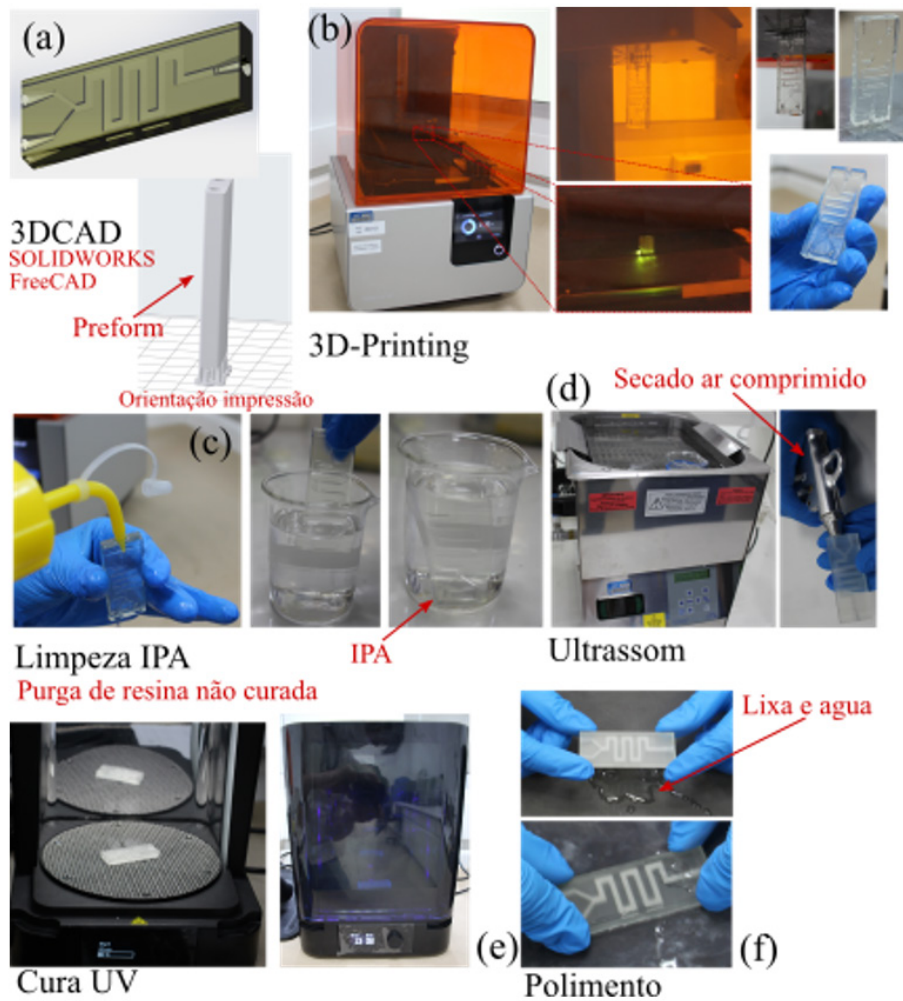
2 Procedimento metodológico

2.1 Geometrias de micromisturador e simulação do escoamento

Os dispositivos microfluídicos foram projetados usando *SolidWorks* (Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Waltham, MA). Assim, os sólidos gerados no estágio de desenho CAD foram empregados nos processos de simulação (**FIGURA 1(a)**) e fabricação com impressão 3D (**FIGURA 2(a)**). Portanto, as cavidades e canais internos dos três dispositivos fluídicos para os casos de estudo são definidos em detalhe na **FIGURA 3**.

Desse modo, examinam-se os dispositivos projetados com análise CFD em termos de propriedades do fluxo nos microcanais com um escoamento volumétrico padrão de 3 mL/min para todos os casos (número de Reynolds ao redor de 350 para um regime laminar) (BRUUS, 2011). Conseqüentemente, foram simulados para os domínios fluídicos, as características paramétricas de densidade e viscosidade de água líquida a 25 °C usando o módulo de fluxo laminar monofásico e estacionário. O COMSOL *Multiphysics* 5.3 (Burlington, MA) foi usado nessas análises. As malhas geradas para discretizar o domínio fluídico foram de varredura tetraédrica 3D para os canais e o domínio computacional nas entradas e saída. O número total dos elementos de malha variou nos diferentes exemplos de 173.738 – 594.685.

Figura 2 – Processo de modelagem e fabricação de dispositivo fluídico por impressão 3D. (a) Desenho CAD em *SolidWorks* e configuração de impressão em software acima e abaixo respectivamente. (b) Equipamento de impressão 3D *Form 2*, plataforma com peça parcial durante a impressão e com detalhe durante a etapa de cura por escrita direta do laser UV, peça final fixada na plataforma e removida da plataforma. (c) Primeira etapa de limpeza após a impressão por injeção de álcool isopropílico nas entradas e saídas do dispositivo e imersão no álcool isopropílico. (d) Segunda etapa de limpeza em ultrassom com peça imersa e secagem. (e) Pós-cura na *Form Cure*. (f) Polimento com peça antes e depois do processo.



Fonte: elaborado pelos autores.

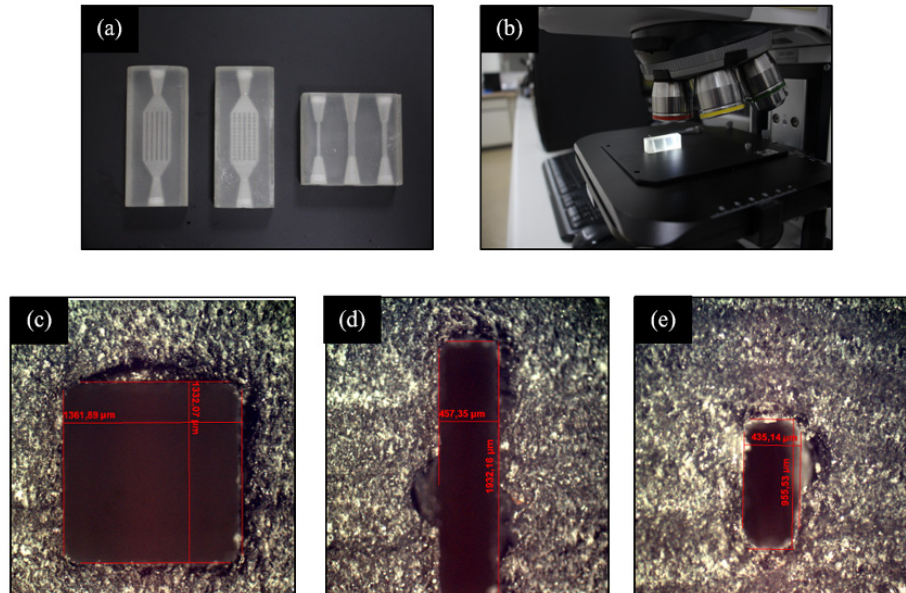
(Somerville, MA, EUA), material característico por sua translucidez e alta resistência mecânica (FORMLABS, 2017). Os principais componentes do sistema da impressão são: (1) uma plataforma que se movimenta no eixo vertical e em que fica aderida a peça ao longo da impressão, com a sua face voltada para baixo, (2) um tanque de acrílico em que está a resina não curada com um fundo transparente de material elástico, por onde deve passar o feixe de laser enquanto a peça está em contato com o tanque para construção de cada nova camada, (3) o sistema de emissão de laser UV de comprimento de onda de 405 nm, potência de 250 mW e com largura de feixe de 140 μm e (4) um cartucho de resina para reposição no tanque ao longo do processo. O sistema é coberto por uma tampa laranja, que evita a cura indesejada da resina por exposição à luz ambiente.

2.2.1 Modelagem 3D e orientação de impressão

O processo de manufatura se inicia pela modelagem da peça em software de desenho 3D. O design dos menores elementos da peça deve estar alinhado às características de resolução da impressora. Esta resolução foi obtida empiricamente no Bionano a partir de fabricação de canais milifluídicos de largura abaixo de 1,5 mm e é discutida na literatura técnica como em Nielsen *et al.* (NIELSEN *et al.*, 2020), em que a solução para obtenção de canais de tamanho abaixo de 100 μm passa pela utilização de resinas customizadas de baixa viscosidade.

O estudo de resolução dentro do Bionano foi feito com a análise por microscopia ótica de canais simples, de estruturas multicanal e de malha de pilares como apresentado nas **Figuras 4(a) e 4(b)**. Os dispositivos de canal simples tinham dimensões na modelagem 3D de $1,36 \times 1,36 \text{ mm}^2$, $2,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ e $1,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ (**Figuras 4(c)-(e)** respectivamente). É observada uma contração em relação ao projeto de CAD de aproximadamente 5,4%, que ocorre principalmente após o processo de pós-cura devido a maior força de ligação na estrutura do material. O segundo dispositivo com estruturas multicanal é composto de uma rede de 6 canais com $1,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ espaçadas de 0,5 mm e não apresentou falhas de fabricação ou escoamento em setup experimental. Por fim, a estrutura mais complexa de malha de pilares foi desenhada com espaçamento de 0,5 mm entre as colunas, mas apresentou problemas de manufatura como junção entre pilares e pontos de entupimento com bolhas de ar. Assim, com a utilização da resina *Clear*, que possui alta viscosidade, 500 μm é tido como a menor dimensão de largura de canal para estruturas simples no atual setup.

Figura 4 – Dispositivos para estudo de resolução na fabricação. (a) Estrutura multicanal, de malha de pilares e de canais simples de diferentes dimensões, (b) setup de microscopia ótica com peça de canais simples após corte, (c) canal de $1,36 \times 1,36 \text{ mm}^2$, (d) canal de $2,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ e (e) canal de $1,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$.



Fonte: elaborado pelos autores.

Os canais desenhados para micromisturadores (FIGURA 1(a)) e testes de biocompatibilidade neste trabalho apresentam dimensões de $1,0 \text{ mm} \times 2,5 \text{ mm}$, de forma a garantir um dispositivo com resolução precisa para observação adequada dos fenômenos de mistura. O passo de fabricação entre camadas para estes dispositivos escolhido foi de $50 \mu\text{m}$, totalizando em média $15,96 \text{ mL}$ de volume, 390 minutos de processo e 1.366 camadas para cada dispositivo fabricado individualmente.

Outro ponto crítico em dispositivos microfluídicos é a estratégia e desenho das conexões de entrada e saída de modo a garantir a estanqueidade, que é uma barreira comum na implementação experimental. O tipo de conexão utilizada em nosso dispositivo é o encaixe por rosca acopladas às mangueiras que se conectam à bomba. O acoplamento do conector ao dispositivo é simples – o polímero é desgastado pelo encaixe do conector no rosqueamento e é obtido o formato da rosca no material. Os testes de estanqueidade mostram que a vedação é adequada para as aplicações de vazão até 5 mL/min em setup com bomba de pistão.

Além das restrições de resolução, a orientação em que a peça é fabricada ao longo do eixo vertical é importante para a garantia da integridade do canal e prevenção de entupimentos. A fabricação deve ocorrer de modo que favoreça o escoamento do excesso de resina que permanece na superfície da peça a cada vez que esta entra em contato com o tanque para a fotopolimerização de uma nova camada. Assim, as entradas e saídas devem permanecer orientadas de forma quase paralela ao eixo vertical, mas ao mesmo tempo, com a mudança de direção do canal ao longo do dispositivo, pequenas inclinações entre 3° e 10° a partir da posição na vertical contribuem para o escoamento de resina que poderia se depositar em cantos formados ao longo do processo (**FIGURA 2(a)**).

2.2.2 Limpeza, pós-cura e polimento

Após a impressão da peça, os pequenos suportes que a sustentam e estão aderidos à plataforma são quebrados com alicate e os fragmentos remanescentes são posteriormente polidos. A etapa mais crucial de limpeza no tratamento de dispositivos 3D é a desobstrução de canais que ainda tenham resina não-curada. Assim, o solvente álcool isopropílico deve ser injetado imediatamente pelas entradas dos canais como na **FIGURA 2(c)**, de modo a evitar qualquer cura gradual e a eliminar todo excesso de resina no interior da peça. Pela nossa experiência, é indicada uma segunda limpeza em banho ultrassônico em álcool isopropílico por 10 minutos para remoção de residuais (**FIGURA 2(d)**).

Apesar da peça ter a sua geometria final após a impressão, ela ainda não terá obtido a sua máxima rigidez mecânica. Um procedimento de pós-cura então é realizado, que consiste em mais uma exposição do dispositivo à luz UV, mas uniforme e em alta temperatura - no caso da resina *Clear* a exposição é de 15 minutos a 60 °C no aparelho *Form Cure* (Formlabs, Somerville, MA, EUA), mostrado na **FIGURA 2(e)**. A pós-cura visa a fotopolimerização completa do material.

A última etapa de fabricação é o polimento, no qual utiliza-se lixa d'água de gramatura 1000 e 2000, para aumentar a translucidez do material como observado na **FIGURA 2(f)**, em que a peça apresenta superfície de aparência fosca logo após o processo de pós-cura e uma superfície mais translúcida ao final do polimento. Inicialmente, o polimento é feito com a lixa 1000 e água DI, movimentando o dispositivo sobre a lixa em forma de um número oito na horizontal – ou deitado, por 20 minutos. Deve-se prestar atenção quanto à pressão exercida sobre a peça em contato com a lixa. Deste modo, o processo é realizado segurando as duas extremidades do dispositivo, aplicando pouca força para que a superfície fique uniforme e garanta o nivelamento do mesmo. Em seguida, com

a mesma lixa, são exercidos movimentos sucessivos para frente e para trás aplicando menos força quando comparado ao passo anterior.

Posteriormente ao polimento com a lixa 1000 deve-se observar as ranhuras presentes na superfície do dispositivo e se estas possuírem um padrão, pode-se dar continuidade com a lixa 2000, repetindo os mesmos processos utilizados com a lixa 1000 para dar acabamento à superfície, suavizando ranhuras e aumentando a translucidez da peça. Caso estejam sem nenhum padrão é necessário repetir o processo com a lixa 1000, tomando cuidado com a pressão exercida sobre a peça, para obter-se uma superfície uniforme e translúcida e garantir a qualidade da visualização do fluxo dentro dos canais, especialmente naqueles que envolvem células, como apresentado neste trabalho.

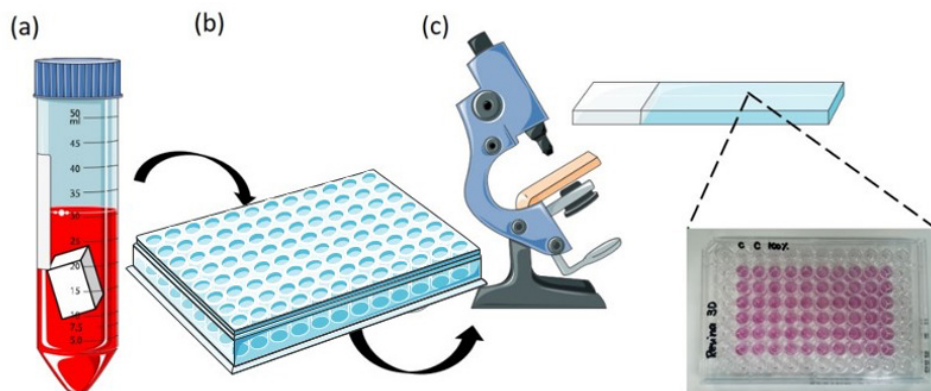
2.2.3 Teste de citotoxicidade

O teste in vitro para a análise da citotoxicidade foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO 2009). A amostra, previamente curada e esterilizada, foi adicionada em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) na proporção de 1 cm²/mL e incubada por 24h a 37 °C (**FIGURA 5(a)**). A suspensão celular foi cultivada em garrafa de cultura celular (75 cm²), em meio de cultura DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino (BSA, do inglês *bovine fetal serum*). Após confluência, as células foram destacadas pela adição de tripsina 0,2% (EDTA 0,02%) e, avaliadas pelo *Countess Automated Cell Counters* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) para o ajuste da densidade da suspensão celular para cerca de 1 × 10⁵ cel./mL. Utilizamos a suspensão celular de NCTC – clone L929 da ATCC-CCL1 para o preparo das placas, distribuindo 100 µL da suspensão em 1 × 10⁵ cel./mL em cada poço (1 × 10⁴ cel./poço) (**FIGURA 5(b)**). Para atingir a confluência desejada, a placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5% CO₂ por cerca de 24h. As diluições seriadas foram realizadas através da adição de 100 µL de cada diluição do extrato em contato com as células aderidas em cada poço nas seguintes concentrações: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% de extrato. A análise foi feita em triplicata.

Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra, sendo luva cirúrgica de látex sintético e o próprio meio DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino, respectivamente. Esse último, correspondendo a 100% de sobrevivência celular. A placa foi mantida em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5% CO₂ por 24h. Após essa etapa, trocou-se o meio antigo por um meio fresco contendo 50 µg do corante vermelho neutro/mL e a placa foi incubada por 3h para a incorporação do corante. Em

seguida, visualizamos os poços em microscópio óptico invertido (Axiovert 135, Zeiss, Alemanha) (**FIGURA 5(c)**). Em publicações posteriores será apresentado os resultados do teste de citotoxicidade finalizado de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO 2009). Todos os reagentes utilizados são da *Sigma-Aldrich* (Missouri, EUA).

Figura 5 - Análise de citotoxicidade. (a) Amostra da resina utilizada para impressão do dispositivo em 3D submersa em meio de cultivo DMEM (10% BSA) por 24 horas para a obtenção do extrato. **(b)** Exposição das células ao extrato por 24 horas. **(c)** Análise qualitativa das células submetidas a diversas concentrações do extrato.

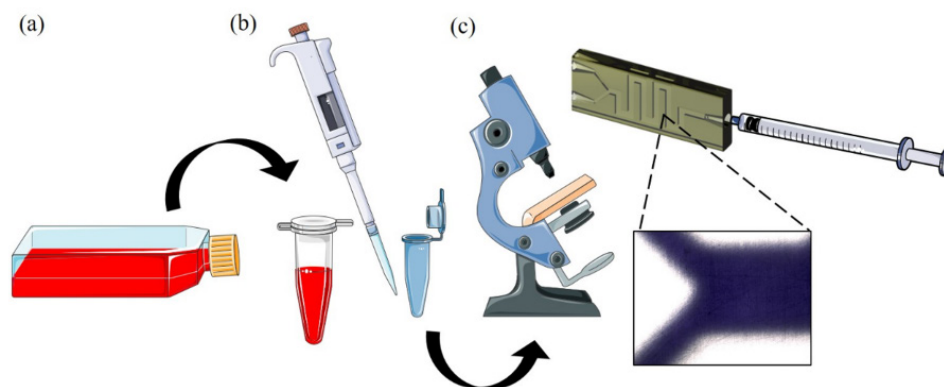


Fonte: elaborado pelos autores.

2.2.4 Translucidez dos canais

Para verificar a transparência do dispositivo quanto a passagem de células no interior de seu canal, uma alíquota de 3 mL da suspensão celular a 4×10^5 cel./mL (**FIGURA 6(a)**) foi separada e diluída em 1 mL de solução azul de tripan 0,4% (**FIGURA 6(b)**). O canal, contendo a solução de meio e azul de tripan, foi posicionado sobre a mesa do microscópio óptico invertido (Axiovert 135, Zeiss, Alemanha). Com o auxílio de uma seringa plástica descartável, a solução resultante era deslocada tanto para dentro quanto para fora do canal (**FIGURA 6(c)**).

Figura 6 – (a) Crescimento e ajuste das células para a densidade celular desejada. (b) Mistura de uma alíquota da suspensão celular com azul trypan, na proporção 3:1 respectivamente. (c) Visualização das células dentro do canal do dispositivo com o auxílio de microscópio óptico invertido.



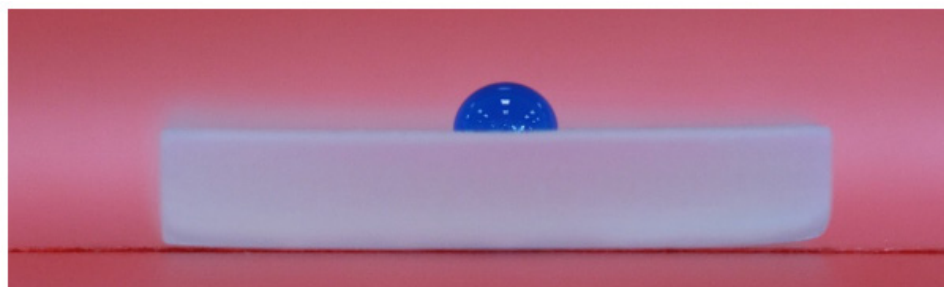
Fonte: elaborado pelos autores.

3 Resultados e discussão

3.1 Molhabilidade

A caracterização por medida de ângulo de contato da água em contato com a resina é feita para determinar a molhabilidade dos canais do dispositivo. Por se tratar de estruturas internas, o teste foi feito com uma superfície impressa sem passar pelo processo de pós-cura. O comportamento da gota de água na superfície mostrado na FIGURA 7 indica que a resina é levemente hidrofóbica, apresentando um ângulo de contato de 95° .

Figura 7 – Teste de ângulo de contato com superfície impressa e água.



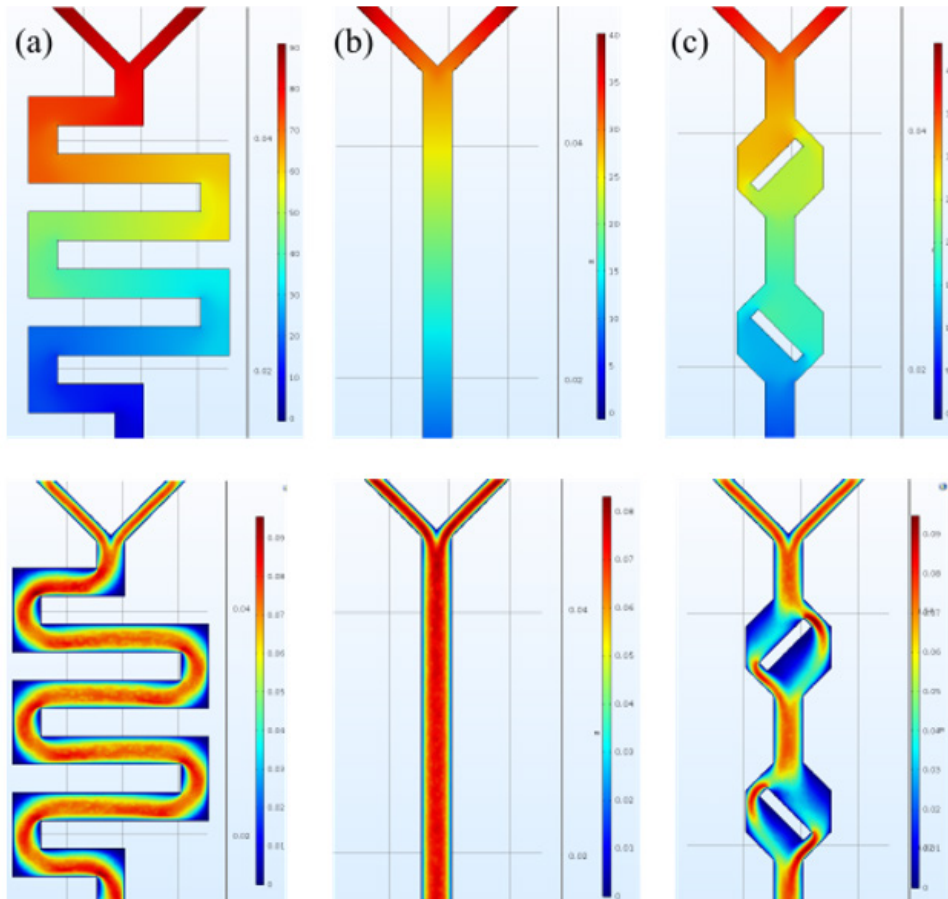
Fonte: elaborado pelos autores.

Ao modificar a superfície do dispositivo com o anticorpo anti-EpCAM para a captura de células tumorais circulantes (CTCs), Chen *et al.* (CHEN *et al.*, 2020) fizeram medidas do ângulo de contato em conjunto com microscopia de varredura eletrônica para demonstrar a modificação em cada etapa até a sua finalização, obtendo a mudança do ângulo de contato de $99,12^\circ \pm 0,55$ para $91,47^\circ \pm 2,79$, antes e após a modificação com o anti-EpCAM respectivamente. No presente estudo, o comportamento da resina Clear foi próximo ao encontrado após o revestimento com estreptavitina ($97,15^\circ \pm 1,29$). Demonstrado por Li *et al.* (LI *et al.*, 2015), a molhabilidade de uma superfície interna de canais impressos afetaria a eficácia de captura de células devido a hidrofobicidade do mesmo, promove a retenção de água e interação célula-estrutura interna resultando na redução da adesão celular.

3.2 Resultados de simulação de escoamento em dispositivos 3D-Printing

Distribuição de pressão e perfis de velocidade para os diferentes domínios fluídicos para os canais foram avaliados e apresentados nas **FIGURA 8** para o plano médio do dispositivo. Os resultados computacionais revelaram uma distribuição altamente uniforme de pressão (**FIGURA 8** na parte superior) dentro dos dispositivos projetados entre todos os canais. Entretanto, os campos de velocidade resultantes na parte inferior da **FIGURA 8**, descrevem uma distribuição uniforme no percurso do canal em Zig-Zag (**FIGURA 8(a)**) e reto (**FIGURA 8(b)**). Contudo, o caso com obstáculo apresentou uma distribuição do campo de velocidades não-uniforme, com picos de velocidade ao redor do escoamento do fluido interagindo com as barreiras inclinadas e as paredes nas cavidades na **FIGURA 4 (c)** parte inferior.

Figura 8 – Simulação pressão e campo de velocidades nos microdispositivos: (a) Zig-Zag. (b) Canal reto. (c) Obstáculo. Escala entre vermelho e azul mostram os valores máximos e mínimos respectivamente.



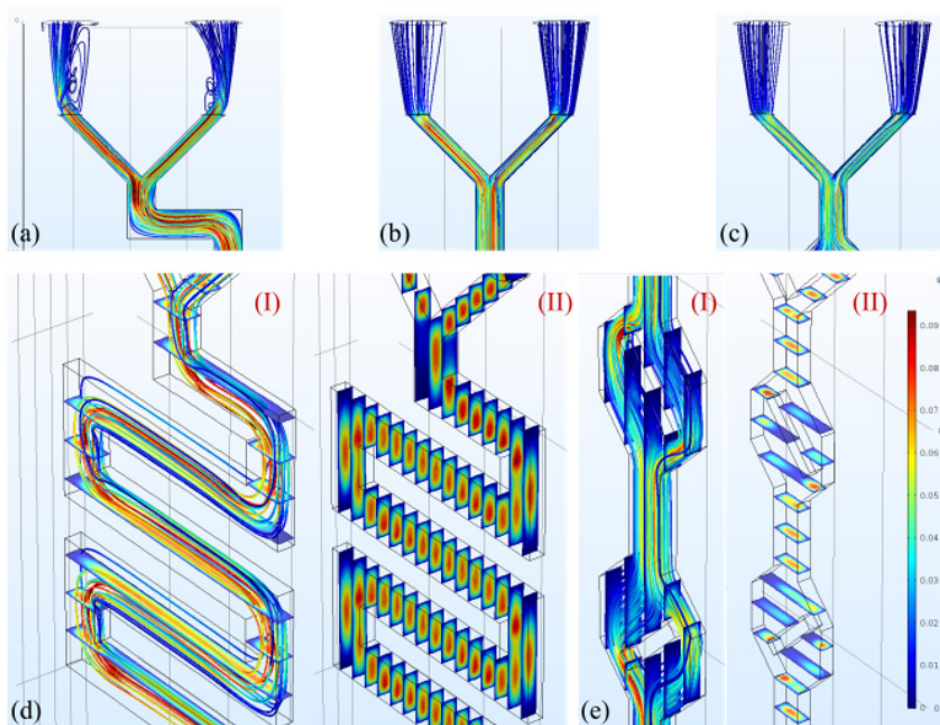
Fonte: elaborado pelos autores.

A flutuação de velocidade dentro das entradas foi avaliada por meio da plotagem das linhas de fluxo na **FIGURA 9**. As **Figuras 9(b) e 9(c)** delimitam um comportamento uniforme na disposição das linhas de entrada nos canais principais; porém, a **FIGURA 9(a)** na configuração em Zig-Zag gera a formação de perturbações no escoamento de natureza convectiva. Entretanto, nas **Figuras 9(c) e 9(d)** o perfil de velocidade em múltiplas camadas nas proximidades da porta de entrada depois da junção dos canais mostrou que as flutuações de velocidade de fluxo tornam-se paulatinamente laminar (**FIGURA 9(d)(II)**) após passar a entrada e entrar no primeiro canal curvo.

Nas **Figuras 9(d) e 9(e)**, as análises por CFD revelaram que os campos de velocidade para uma distribuição de planos transversais e normais ao longo do comprimento do canal e cavidade para as configurações Zig-Zag e obstáculo, formam um perfil de fluxo característico dentro de cada configuração. A **FIGURA 9(d)(II)** apresenta o comportamento uniforme transversal e normal aos canais com um máximo de velocidade no centro e se espalhando até os valores mínimos na interação fluido e bordas do dispositivo.

Os resultados mostraram para a **FIGURA 9(e)(II)** que a flutuação de velocidade nas diferentes seções dos planos nas cavidades das barreiras inclinadas teve uma maior irregularidade em comparação com as seções nos canais médios, de entrada e saída. Observando-se que essas perturbações na velocidade prevalecem nas duas cavidades nas saídas de forma semelhante, onde o fluxo sai não-uniforme da cavidade e posteriormente no microcanal estabiliza-se para, então, entrar novamente na cavidade com obstáculo e sair novamente modificado.

Figura 9 – Simulações de linhas de fluxo para as entradas dos dispositivos: (a) Obstáculo. (b) Zig-zag. (c) Canal reto. Grade entre vermelho e azul mostram os valores máximos e mínimos, respectivamente.

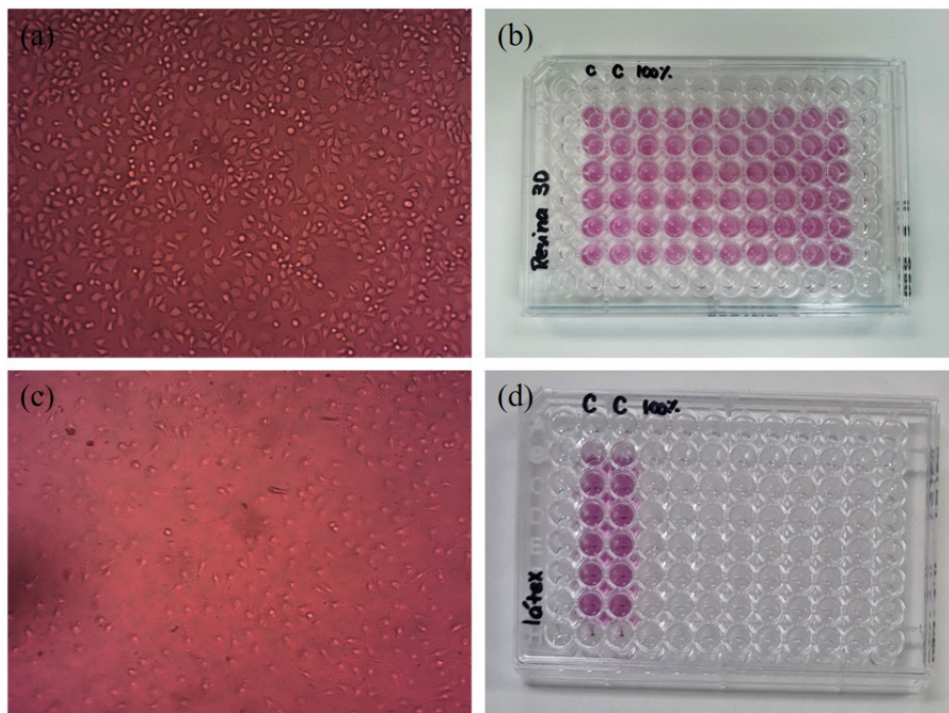


Fonte: elaborado pelos autores.

3.3 Ensaios biológicos

Inicialmente, é necessário analisar o grau de toxicidade que o material pode apresentar às células animais. Através do ensaio foi observado a integridade da cultura celular (FIGURA 10(a) e (c)), a qual manteve-se íntegra com 100% do extrato da resina *Clear*, sem alterações em sua morfologia, conforme resultados anteriores (HART *et al.*, 2020), permitindo a continuidade do experimento. O controle positivo, realizado com luva cirúrgica de látex sintético e com mesmo tratamento da amostra, apresentou alta toxicidade às células devido as suas propriedades já conhecidas que reduzem a atividade metabólica, viabilidade e proliferação celular (FIGURA 10(b) e (d)). A apresentação das contagens, resultado complementar do teste de citotoxicidade, serão publicadas nos próximos trabalhos.

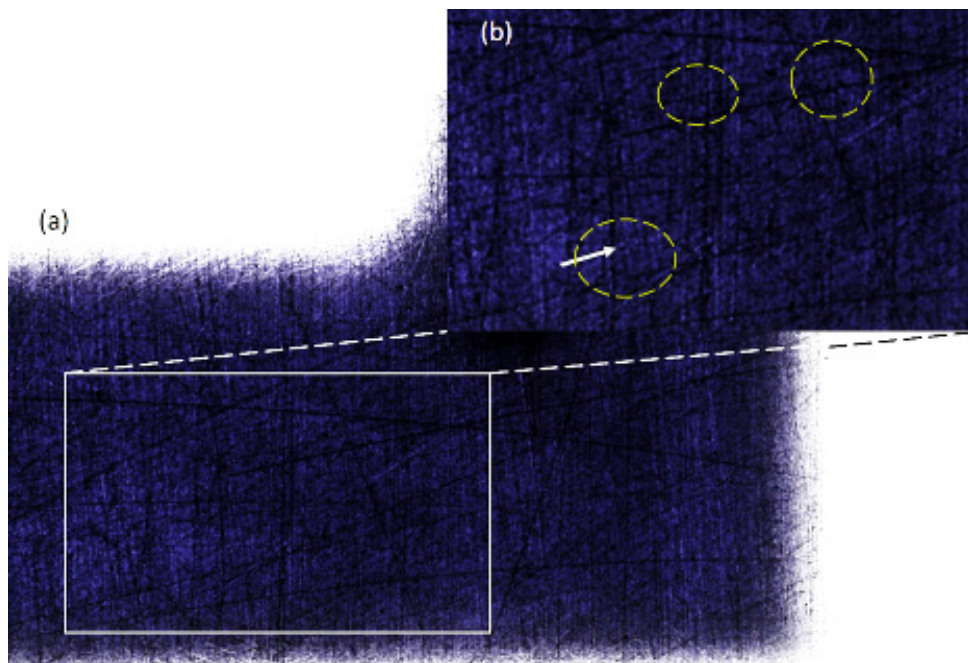
Figura 10 – Teste de citotoxicidade. (a) e (c), imagens de microscopia óptica das amostras submetidas à 100% do extrato e extrato de luva látex descartável, respectivamente. (b) e (d), fotos das placas utilizadas para a amostra do material de resina e de luva látex descartável, respectivamente validando o teste de citotoxicidade.



Fonte: elaborado pelos autores.

A translucidez e a resistência que a resina apresenta são características importantes e têm demasiada importância quando comparadas a outros materiais como LTCC (do inglês, *Low Temperature Co-fired Ceramic*) e PDMS (do inglês, *Polydimethylsiloxane*) respectivamente. Diante disso, Oh *et al.* (OH *et al.*, 2018) desenvolveu um circuito capilar impresso em 3D (3D-CC) com o objetivo de avaliar a viscosidade do sangue (VS), importante parâmetro hemorreológico que afeta o fluxo sanguíneo e a circulação a olho nu, permitindo a determinação rápida e direta. A partir da VS é possível ter um diagnóstico e prognóstico de alterações hemorreológicas que podem ser associadas a várias doenças como anemia falciforme e Diabetes mellitus. Assim como apresentado neste trabalho, o dispositivo impresso em 3D possui translucidez para a visualização de células L929 na concentração de 1×10^4 cel./mL em seu interior (**FIGURA 11(a)**). Entretanto, ainda é necessário a realização de uma metodologia para alcançar o máximo de translucidez possível dentro do canal (**FIGURA 11(b)**) que, aparentemente, possui uma superfície porosa, dificultando a visualização de soluções com baixas concentrações celulares.

Figura 11 – Visualização das células L929 através do canal por microscopia óptica. (a) Magnitude de 5x. (b) Seleção de uma área do canal para a observação das células com a lente de magnitude de 20x. Áreas circuladas em amarelo representam pontos de identificação de células.



Fonte: elaborado pelos autores.

Das inúmeras vantagens que a estereolitografia apresenta quando consideramos seu uso em bioengenharia, destacamos a possibilidade da obtenção de superfícies com textura de até micrômetros, nas quais células adaptadas a esse ambiente podem se alojar (HART *et al.*, 2020). À vista disso, canais de dispositivos microfluídicos impressos em 3D foram funcionalizados com anticorpos para a captura de células tumorais circulantes (CTCs) (CHEN *et al.*, 2020). Dado a baixa concentração de CTCs, que dificulta no prognóstico e na terapêutica, este foi fabricado com alta área de superfície através de funcionalização, resultando em uma eficiência de captura de 90%. A retenção das células L929, ao passar a suspensão celular pelo canal do dispositivo, deve-se a rugosidade da superfície das paredes devido ao não-tratamento ou polimento do canal após a cura da resina (dados não publicados). Deste modo, superfícies com maior porosidade podem vir a auxiliar em processos como a funcionalização de materiais e/ou moléculas de interesse e necessita de mais testes.

Em 2014, a taxa global de prematuridade foi de 10,6 por 100 nascidos vivos onde temos o Brasil ocupando o nono lugar no ranking dos 10 países com as maiores taxas de prematuridade (11,2 por 100 nascidos vivos) (DIAS *et al.*, 2022). Atualmente, o único tratamento é a aplicação de várias injeções de progesterona para tentar prevenir ou retardar o parto, entretanto o conhecimento do risco do nascimento prematuro (PTB, do inglês *Preterm Birth*) só é visto a partir do trabalho de parto. Os bebês sobreviventes ainda podem sofrer com diversos problemas de saúde e desenvolvimento, incluindo paralisia cerebral, doença pulmonar crônica, perda de visão ou audição e deficiência intelectual. Apesar da inexistência de testes clínicos que indiquem a possibilidade de ocorrência do nascimento prematuro, Parker *et al.* (PARKER *et al.*, 2018) contou com um painel de biomarcadores encontrados no soro sanguíneo materno que podem prever um PTB para a construção de um dispositivo impresso em 3D ao funcionalizar monólitos, polímeros porosos contínuos usados como fases estacionárias em cromatografia líquida, com anti ferritina. Com uma impressora 3D estereolitográfica personalizada, foi adicionada uma janela de polimerização na qual o monólito aproveita as propriedades inerentes de absorção UV da resina para uma polimerização reprodutível e espacialmente seletiva. Utilizando soro sanguíneo humano, os pesquisadores demonstraram a primeira extração qualitativa de ferritina, biomarcador PTB, por imunoafinidade em dispositivos microfluídicos impressos em 3D.

É possível fabricar canais milifluídicos por impressão 3D com resolução de até 500 µm, podendo ser utilizado para a construção de micromisturadores para aplicações em diversas áreas, especialmente em citologia, biotecnologia e medicina devido à sua biocompatibilidade.

4 Conclusão

Neste trabalho exploramos as capacidades de fabricação de dispositivos fluídicos na escala milimétrica através da técnica de impressão 3D por estereolitografia, que apresenta diversas vantagens em relação aos tradicionais processos em silício. Propusemos procedimentos e técnicas voltados para a construção de dispositivos milifluídicos com capacidade de canais com precisão de até 500 μm . Demonstramos que as etapas de prototipagem, planejamento e predição podem ser acopladas às demandas de desenvolvimento de produtos devido à integração de ferramentas de desenho CAD e simulação numérica com CFD. Os testes de citotoxicidade para seu uso em amostras contendo células animais, valida que a presente tecnologia é promissora para aplicações em biotecnologia e medicina.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil) (Processo nº 382031/2022-9), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2021/05931-9) e seu projeto PDIp (Processo nº. 2017/50343-2) pelo apoio financeiro desta pesquisa. À Pesquisadora Dra. Patricia Léo pela possibilidade de realizar os ensaios no Laboratório de Biotecnologia Industrial (Unidade de Negócios Bionanomanufatura, IPT) e à Mayara Santos, ao Jonas Gomes dos Santos e ao Antônio Fernando Montemor pelo auxílio com os ensaios. Ao Pesquisador Bruno Marinaro Verona pela possibilidade de realizar os ensaios no Laboratório de Micromanufatura (Unidade de Negócios Bionanomanufatura, IPT). Parte das figuras foram parcialmente geradas usando o Servier Medical, sob a licença do Creative Commons Attribution 3.0. (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, acessado dia 23 de janeiro, 2023).

6 Referências

AMIN, R.; KNOWLTON, S.; HART, A.; YENILMEZ, B.; GHADERINEZHAD, F.; KATEBIFAR, S.; MESSINA, M.; KHADEMHOSEINI, A.; TASOGLU, S. 3D-printed microfluidic devices. **Biofabrication**, v. 8, n. 2, p. 022001, 2016.

BRUUS, H. **Theoretical Microfluidics**. Denmark: Oxford University Press, 2008.

BRUUS, H. Acoustofluidics 1: Governing equations in microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 22, p. 3742, 2011.

CHEN, J.; LIU, C.-Y.; WANG, X.; SWEET, E.; LIU, N.; GONG, X.; LIN, L. 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. **Biosensors & bioelectronics**, v. 150, n. 111900, p. 111900, 2020.

COBAS GOMEZ, H.; MANSINI CARDOSO, R.; NOVAIS SCHIANTI, J. DE; MARIM DE OLIVEIRA, A.; GONGORA-RUBIO, M. R. Fab on a package: LTCC microfluidic devices applied to chemical process miniaturization. **Micromachines**, v. 9, n. 6, p. 285, 2018.

DIAS, B. A. S.; LEAL, M. DO C.; MARTINELLI, K. G.; NAKAMURA-PEREIRA, M.; ESTEVES-PEREIRA, A. P.; SANTOS NETO, E. T. D. Prematuridade recorrente: dados do estudo "Nascer no Brasil". **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 7, 2022.

EHRFELD, W. Electrochemistry and microsystems. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 20, p. 2857–2868, 30 set. 2003.

FINNES, T. High Definition 3D Printing – Comparing SLA and FDM Printing Technologies. **The Journal of Undergraduate Research**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2015.

FORMLABS. **Material Data Sheet - Standard**, 2017. Disponível em: <<https://archive-media.formlabs.com/upload/Clear-DataSheet.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

GIANNITSIS, A. T. Microfabrication of biomedical lab-on-chip devices. A review. **Estonian Journal of Engineering**, v. 17, n. 2, p. 109, 2011.

HART, C.; DIDIER, C. M.; SOMMERHAGE, F.; RAJARAMAN, S. Biocompatibility of blank, post-processed and coated 3D printed resin structures with electrogenic cells. **Biosensors**, v. 10, n. 11, p. 152, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993- 5:** Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO, 2009. 34 p.

JANDYAL, A.; CHATURVEDI, I.; WAZIR, I.; RAINA, A.; UL HAQ, M. I. 3D printing – A review of processes, materials and applications in industry 4.0. **Sustainable Operations and Computers**, v. 3, p. 33–42, 2022.

KAFLE, A.; LUIS, E.; SILWAL, R.; PAN, H. M.; SHRESTHA, P. L.; BASTOLA, A. K. 3D/4D printing of polymers: Fused deposition modelling (FDM), selective laser sintering (SLS), and stereolithography (SLA). **Polymers**, v. 13, n. 18, p. 3101, 2021.

KREJCOVA, L.; NEJDL, L.; RODRIGO, M. A. M.; ZUREK, M.; MATOUSEK, M.; HYNEK, D.; ZITKA, O.; KOPEL, P.; ADAM, V.; KIZEK, R. 3D printed chip for electrochemical detection of influenza virus labeled with CdS quantum dots. **Biosensors & bioelectronics**, v. 54, p. 421–427, 2014.

LI, Y.; LU, Q.; LIU, H.; WANG, J.; ZHANG, P.; LIANG, H.; JIANG, L.; WANG, S. Antibody-modified reduced graphene oxide films with extreme sensitivity to circulating tumor cells. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 27, n. 43, p. 6848–6854, 2015.

MAIRHOFER, J.; ROPPERT, K.; ERTL, P. Microfluidic systems for pathogen sensing: a review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 4804–4823, 2009.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 244–248, 1990.

MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H.; SATO, K. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 249–255, 1990.

NGUYEN, N.-T.; WU, Z. Micromixers—a review. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 2005.

NIELSEN, A. V.; BEAUCHAMP, M. J.; NORDIN, G. P.; WOOLLEY, A. T. 3D printed microfluidics. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 13, n. 1, p. 45–65, 2020.

OH, S.; KIM, B.; LEE, J. K.; CHOI, S. 3D-printed capillary circuits for rapid, low-cost, portable analysis of blood viscosity. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 259, p. 106–113, 2018.

PARKER, E. K.; NIELSEN, A. V.; BEAUCHAMP, M. J.; ALMUGHAMSI, H. M.; NIELSEN, J. B.; SONKER, M.; GONG, H.; NORDIN, G. P.; WOOLLEY, A. T. 3D printed microfluidic devices with immunoaffinity monoliths for extraction of preterm birth biomarkers. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, n. 21, p. 5405–5413, 2019.

PATTANAYAK, P.; KUMAR, S.; MONICA, S.; SUKRITI, G.; BHUPINDER, V. Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives. **Microfluidics and Nanofluidics**, p. 1–28, 2021.

QIN, D.; XIA, Y.; ROGERS, J. A.; JACKMAN, R. J.; ZHAO, X.-M.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication, Microstructures and Microsystems. Em: **Topics in Current Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 1–20.

SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of modern physics**, v. 77, n. 3, p. 977–1026, 2005.

VAN DEN BERG, A; LAMMERINK, T. S. Micro total analysis systems: microfluidic aspects, integration concept and applications. **Microsystem Technology in Chemistry and Life Science**, vol. 194, 1998.

10.29327/2152495.8.23-3



Artigo Técnico

Técnicas analíticas para o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos cítricos

*Analytical techniques for pesticide
residues control in citrus foodstuffs*

Kelly Cristina Manhani^{a*}, João Paulo Amorim de
Lacerda^b, Viviane Emi Nakano^c, Lucas Monteiro
Santa Cruz^c, Alan Roberto Costa^c, Jose Oscar
William Vega Bustillos^d

^a Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de partículas, Núcleo de Bionanomanufatura, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^b Laboratório de Química e Manufaturados, Núcleo de Bionanomanufatura, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^c Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP, Brasil

^d Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP, Brasil.

Palavras-chave: laranja; agrotóxicos;
QuEChERS, citros.

*Keywords: orange; pesticides;
QuEChERS, citrus.*

*e-mail: kellym@ipt.br

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, responsável pela exportação de três quartos de suco de laranja consumidos no mundo. Devido a posição de destaque na cadeia agroindustrial, a segurança alimentar é item fundamental para garantir a sustentabilidade produtiva, qualidade e competitividade de mercado. Dado a sua importância, com o objetivo de avaliar a qualidade dos citros, neste trabalho foram estudados três métodos de extração: “QuEChERS ORIGINAL”, “QuEChERS Acetato MODIFICADO” e extração Líquido-Líquido, com a utilização dos equipamentos GC/ECD e GC/MS para quantificação e confirmação dos analitos. O método QuEChERS está revolucionando o preparo de amostras de matrizes complexas, e neste estudo, foram avaliados a mudança de pH na extração bem como a proporção de amostra e adição de diferentes sais e adsorventes na etapa de limpeza da amostra (*Clean Up*) para a eficiência da extração dos ingredientes ativos. Parâmetros de qualidade analítica como seletividade/efeito matriz, linearidade, limite de detecção e quantificação foram estabelecidos para cinco agrotóxicos: Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina. Foram analisadas um total de 26 amostras de laranja Pêra e suco de laranja, coletadas em feiras livres, supermercados, sítios com produção local e restaurantes da cidade de São Paulo, dentre as quais, três amostras de suco analisadas durante o desenvolvimento apresentaram indícios do agrotóxico Dicofol, proibido pela legislação brasileira.

Abstract

Brazil is the world's largest producer of oranges, responsible for exporting three quarters of the orange juice consumed in the world. Due to its prominent position in the agro-industrial chain, food safety is a fundamental item to guarantee productive sustainability, market competitiveness and quality in production. Given its importance, with the objective of evaluating the quality of citrus, three extraction methods were studied in this work: “QuEChERS ORIGINAL”, “QuEChERS Acetate MODIFIED” and Liquid-Liquid extraction, with the use of GC/ECD and GC/MS for quantification and confirmation of analytes. The QuEChERS method is revolutionizing the preparation of samples from complex matrices, and in this study, the pH change in the extraction as well as the sample proportion and the addition of different salts and adsorbent phase in the sample cleaning step (clean up) for the efficiency of extraction of active ingredients. Analytical quality parameters such as selectivity/matrix effect, linearity, limit of detection and quantification were established for five pesticides: Trifluralin, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Dicofol and

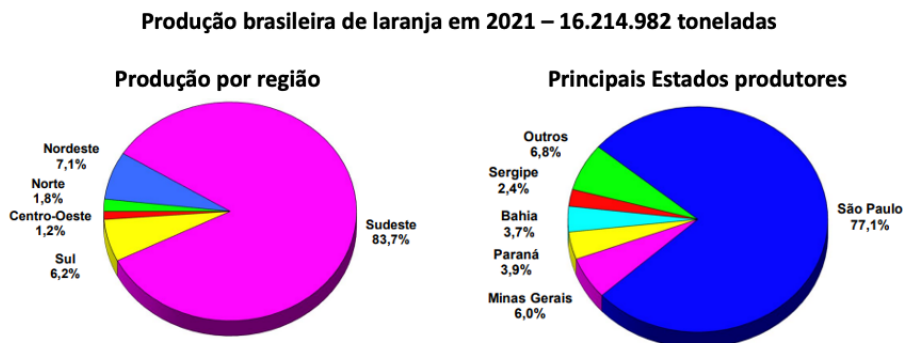
Azoxystrobin. 26 samples of pear orange and orange juice were analyzed, collected at street markets, supermarkets, sites with local production and restaurants in the city of São Paulo, among which, three samples of juice analyzed during the development showed evidence the pesticide Dicofol, which is prohibited by Brazilian law.

1 Introdução

A laranja é um dos alimentos cítricos mais consumidos no mundo. Além do aroma e sabor agradável, contém nutrientes e vitaminas que estão relacionados a benefícios à saúde (SILVEIRA, 2014).

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, responsável por mais de um quarto da exportação *in natura* e três quartos da exportação mundial de suco de laranja (USDA, 2023; DA SILVA-DE PAULA, 2022). Em 2021, produziu 16.214.982 toneladas de laranja (FIGURA 1), dos quais São Paulo é o principal estado produtor (EMBRAPA, 2022).

Figura 1 - Produção de laranja no Brasil



Fonte: EMBRAPA, 2022 modificado pelos autores.

Na produção de frutos cítricos brasileiros, 80% são laranjas, e as mais cultivadas são das variedades: Pêra, Valência, Seleta, Natal, Baía e Baianinha da classe doce e ácida, e da qualidade sem acidez a laranja Lima e Piralima (BRASIL, 2015; NEVES, 2010).

Considerando a importância econômica e social da produção brasileira de laranja e outros cultivos, o Brasil como grande potência agropecuária tornou-se um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (GURGEL *et. al.*, 2017).

Segundo o relatório do Ibama, em 2011 as vendas de ingredientes ativos (i.a) em produtos formulados (PF) foram de 422.166,85 toneladas, sendo em 2021 um total de 720.869 toneladas, com crescimento expressivo entre 2018 e 2021 (IBAMA, 2022).

Os agrotóxicos são produtos químicos sintéticos utilizados para combater os insetos, larvas, fungos e carrapatos que são vetores de doenças em cultivos (INCA, 2022). A Fundação de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), instituição fitossanitária e de pesquisa, sem fins lucrativos, investiga doenças e pragas em culturas citros há mais de 20 anos. A instituição emite relatórios anuais de doenças, bem como orienta sobre manejo e tratamento para evitar a disseminação no cinturão citrícola de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Segundo os relatórios, as doenças e pragas mais comuns em citros são: Cancro cítrico; Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou “amarelinho”; Greening, que é conhecido como HLB ou *Huanglongbing*; Leprose; Morte súbita dos citros (MSC); Pinta preta; Podridão floral. Entre as pragas, destacam-se: Ácaro da falsa ferrugem, Bicho Furão, Ortézia, Escama farinha (FUNDECITRUS, 2022).

Na formulação, o ingrediente ativo (i.a.) é o agrotóxico em sua forma sólida ou líquida concentrada, sendo o diluente o meio que auxilia na dispersão homogênea e mantém o i.a em suspensão para manipulação segura. Além do i.a e diluente, podem ser acrescentados aditivos surfactantes para melhoria de propriedades químicas, físicas e biológicas (SANTOS *et. al*, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autoriza o uso dos agrotóxicos de acordo com os estudos de toxicidade e segurança alimentar, porém, o uso em excesso dessas substâncias e ausência de Boas Práticas Agrícolas (BPA) podem trazer riscos de intoxicação ao trabalhador rural e danos ao meio ambiente (ANVISA, 2015; CARNEIRO *et. al*, 2015; INCA, 2022;).

As técnicas analíticas aplicadas na determinação de resíduos em alimentos, devem garantir alta sensibilidade e robustez nas análises por instrumentação e não menos importante os métodos de preparo de amostras adequados para cada matriz, a fim de garantir a confiabilidade nos resultados obtidos (INMETRO, 2018; SANTE, 2017). Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo o estudo de uma metodologia para determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos cítricos pelas técnicas de cromatografia GC-ECD e GC-MS. A determinação de resíduos nos alimentos torna-se ferramenta de grande valia na estimativa de exposição do ser humano e meio ambiente, bem como indicativo de BPA, ajudando na tomada de decisões regulatórias a fim de se garantir a segurança alimentar (ANVISA, 2012).

2 Procedimento metodológico

Cinco agrotóxicos foram analisados (Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina) em amostras cítricas pelas técnicas analíticas de cromatografia à gás com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e cromatografia à gás com espectrometria de massas (GC-MS). As etapas de preparo e análise aplicadas às amostras resultaram de uma série de testes e desenvolvimento de métodos. Dentre essas duas etapas, foi dado ênfase ao preparo de amostras.

2.1 Coleta e moagem das amostras

Doze amostras de laranja Pêra foram coletadas em feiras livres, sítios e supermercados do Estado de São Paulo e nove amostras de suco de laranja integral produzidos no Brasil. Para amostras de laranja adotou-se a nomenclatura “LAR - número de coleta”, conforme descrito na TABELA 1. Também constam nesta tabela a descrição da origem e tipo de estabelecimento.

Tabela 1 - Identificação das amostras de laranja e características observadas na coleta.

Identificação das amostras de laranja	Cidade de Origem	Endereço do estabelecimento	Tipo de estabelecimento
LAR-O-1 *	Ibiúna - SP	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Loja de produtos orgânicos certificados
LAR-1	Limeira-SP	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-2	Bebedouro-SP	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-3	desconhecida	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-4	desconhecida	Santo André, cidade metropolitana de SP	Feira de Bairro
LAR -5	desconhecida	Parque Peruche, Zona norte de SP	Feira de Bairro
LAR-6	desconhecida	Bairro Itaquera, Zona Leste de SP	Feira de Bairro
LAR-7	Limeira-SP	Bairro Morumbi, Zona Oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-8	desconhecida	Jaguapé, Zona Oeste de SP	Ceagesp
LAR-9	Ibiúna-SP	Ibiúna, interior de SP	Sítio Local
LAR-10	Jardinópolis-SP	Bebedouro, interior de SP	Supermercado
LAR-11	Pirassununga, SP	Pirassununga, interior de SP	Sítio local

*laranja orgânica isenta de agrotóxicos – Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

O preparo das amostras de laranja *in natura*, seguiu o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA), no qual foram coletadas uma quantidade mínima de 10 unidades de laranja, e o conjunto com massa ≥ 1 kg, acondicionadas sob refrigeração e preparadas no menor tempo possível para garantir a integridade do alimento (ANVISA, 2012a, ANVISA, 2019). Cada laranja foi quarteadas e duas partes opostas coletadas e cortadas em partes menores, trituradas e homogeneizadas, gerando uma massa que foi armazenada em embalagem plástica e refrigerada para posterior análise.

As nove amostras de sucos de laranja foram adquiridas em supermercados convencionais e restaurantes na região da zona oeste de São Paulo. Foram identificadas como “SUCO - número de coleta” e a descrição como tipo e cidade de origem de fabricação estão apresentadas na **TABELA 2**.

Tabela 2 - Identificação das amostras de suco de laranja e características da embalagem .

Identificação	Qualidade	Cidade em que foi produzido
SUCO-1	Suco natural fresco	São Paulo, SP
SUCO 2	Suco integral orgânico certificado	Jarinu, SP
SUCO 3	Suco integral industrializado	Tabatinga- SP
SUCO 4	Suco integral industrializado	Tabatinga- SP
SUCO 5	Suco integral orgânico certificado	São Sebastião do Cai/RS
SUCO 6	Suco integral orgânico certificado	Lagarto/SE
SUCO 7	Néctar de laranja com 56% de suco integral	Visconde do Rio Branco - MG
SUCO 8	Néctar de laranja com 80% de suco integral	Jarinu, SP
SUCO 9	Suco integral orgânico certificado	Dobrada, SP

Fonte:elaborado pelos autores, 2023.

2.2 Extração de resíduos de agrotóxicos

2.2.1 Desenvolvimento de métodos de extração

Com base em referências bibliográficas, três métodos foram testados conforme descrito nos sub itens.

2.2.1.1 Método 1 - Extração líquido-líquido

Testes preliminares da técnica de partição líquido-líquido foram testadas com amostra de suco de laranja, sendo os solventes utilizados: Diclorometano, Acetato de etila, Heptano e Hexano. Em aumento de escala, utilizando um funil de separação contendo 1 litro de suco de laranja, adicionou-se 50 mL do solvente com melhor eficiência para separação e cuja estrutura não interferiu no sinal do detector de GC-ECD (hexano), agitação por 2 minutos e repouso para separação de fases.

2.2.1.2 Método 2 - Preparo QuEChERS original

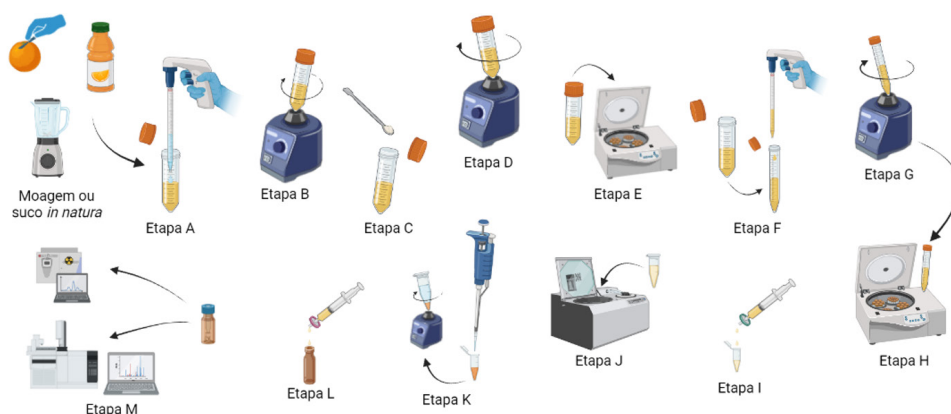
Em tubo Falcon de 50 mL, 10 g de amostra de suco de laranja foram pesadas, adicionados 10 mL de acetonitrila e agitou-se por 1 minuto. Adicionou-se 4 g de Sulfato de Magnésio Anidro (MgSO₄, Sigma Aldrich), 1 g de Cloreto de sódio (NaCl, Merck - P.A.) e agitou-se por 1 minuto. Centrifugou-se e transferiu-se 2 mL do sobrenadante para tubo de 15mL. A etapa de *Clean-Up* consistiu na adição de 300 mg de MgSO₄ anidro e 50 mg de Amina primária secundária (PSA - Agilent Technologies), agitação por 1 minuto, centrifugação e filtração (filtro 0,45 um PTFE hidrofílico, Allcrom). Para troca de solvente, 1 mL do extrato foi evaporado e ressuspendido em acetato de etila com ajuda de vortex e ultrassom, filtrado em filtro 0,22 um PTFE e analisado por GC-ECD e GC-MS.

Os equipamentos utilizados foram ilustrados na **FIGURA 2**, descritos com mais detalhes no método 3. A fim de comparar os dois métodos, o parâmetro de recuperação de padrão foi estudado.

2.2.1.3 Método 3 - Preparo QuEChERS Acetato Modificado Otimizado

O método QuEChERS acetato, da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) foi testado com modificações. Conforme demonstrado na FIGURA 2, 15 g de amostra de suco de laranja foram pesadas (Mettler Toledo - balança analítica AG 245) em um tubo falcon de 50 mL, adicionados 15 mL de Acetonitrila (Merck – grau HPLC) acidificada com ácido acético glacial (Tedia - grau ACS) a 1% (etapa A) e agitado vigorosamente por 1 minuto com cerâmicas para homogeneização (etapa B). Foram adicionados 6 g de sulfato de magnésio anidro (Sigma Aldrich – grau *Reagent Plus* 99,5%) e 1,5 g de acetato de sódio anidro (Sigma Aldrich – P.A 99%) (etapa C) com agitação vigorosa durante um minuto (etapa D). Após a centrifugação do material (centrífuga Himac CR22GII da marca Hitachi por 10 minutos a 5000 rpm e 22 °C - etapa E), dois tipos de limpeza foram testados (*Clean-Up*). Em ambas, uma alíquota de 2mL de extrato foi transferida para um tubo falcon de 15ml contendo *Clean Up* 1 - 300 mg de MgSO₄ anidro, 100 mg de amina primária secundária –PSA (Agilent Technologies) e para outro tubo contendo *Clean-Up* 2- 300 mg de MgSO₄ anidro, 100 mg de amina primária secundária – PSA (Agilent Technologies) e 200 mg de SPE C18 ODS (Agilent Technologies) (etapa F). Os tubos foram agitados por 1 minuto (etapa G), centrifugados (etapa H) e filtrados (Allcrom - filtro PTFE de 0,45 µm hidrofílico - etapa I) . Na etapa de troca de solvente, 1 mL do sobrenadante foi evaporado (evaporação por vácuo à 40°C por 1h30min - etapa J) ressuspendido em 1 mL de acetato de etila sob agitação (etapa K) e auxílio de ultrassom, filtrado (Allcrom - filtro PTFE de 0,22 µm hidrofílico - etapa L) e analisado por GC-ECD e GC-MS (etapa M).

Figura 2 - Etapas de extração das amostra pelo método QuEChERS acetato modificado. As etapas de preparo têm a mesma sequência do QuEChERS Original, com a diferença da quantidade de amostra/solvente e reagentes.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023 (Created with BioRender.com).

2.3 Análise por GC-ECD e GC-MS

2.3.1 Curva de calibração

Para a quantificação de resíduos de agrotóxicos nas amostras, duas soluções estoque (S.E.) foram preparadas nas concentrações: S.E. 1 – 0,1 mg kg⁻¹ de Trifluralina e 5 mg kg⁻¹ para os demais i.a.; S.E. 2 - 1,0 mg kg⁻¹ de Trifluralina e 10 mg kg⁻¹ para os demais compostos, todos em solvente acetato de etila (Tedia – grau HPLC). A partir das diluições das S.E. 1 e 2, três curvas de calibração contendo treze pontos cada, foram preparadas no extrato de matriz de laranja orgânica isenta de contaminantes. A linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinadas para cada i.a. seguindo as orientações de validação analítica do INMETRO (DOQ-CGCRE-008-Ver.07-Jul/18 e o guia da Comissão Europeia SANTE 11813/2017.

2.3.2 Metodologia Analítica

Para as determinações por cromatografia à gás foi utilizado o equipamento GC-ECD 2010 Plus com radionuclídeo de ⁶³Ni, injetor automático AOC-20i marca Shimadzu e coluna cromatográfica HP5 30m X 0,32mm x 0,25µm de filme marca Agilent Technologies. As condições analíticas foram descritas na **TABELA 3**.

Tabela 3 – Descrição das condições analíticas para o equipamento GC-ECD.

Parâmetros		
Temperatura do injetor	250°C	
Tipo de injeção e volume	Split/ divisão de 5 e 1µL na injeção	
Controle de fluxo	Pressão/41,6 kPa	
Fluxo total	10,1 mL/min	
Fluxo da coluna	1,19 mL/min	
Velocidade linear	22,7 cm/sec	
Fluxo de purga no injetor	3,00 mL/min	
Temperatura detector	300°C	
Parâmetros da rampa de aquecimento		
Rampa de aquecimento (°C/min.)	Temperatura (°C)	manter por (minutos)
-	60	0
30	95	0
20	190	0
5	250	0
30	300	18

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Para as análises por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas foi utilizado o equipamento modelo GC System 7890A acoplado a MS 5975C inert XL EI/CI MSD marca *Agilent Technologies*, injetor modelo CTC Analytics da Pal System, com a coluna cromatográfica similar a do GC-ECD porém com menor diâmetro, a RTX-5 30 m X 0,25 mm x 0,25 µm de filme marca Restek. As condições analíticas para o método SIM (Selective ion monitoring) e SCAN foram descritas na TABELA 4, totalizando 34,6 minutos de corrida.

Tabela 4 – Descrição das condições analíticas pelo método SIM e SCAN para o equipamento GC-MS.

Parâmetros	
Temperatura do injetor	250°C
Tipo de injeção e volume	Split/ divisão de 5 e 1µL na injeção
Controle de fluxo	Pressão: 8,2317 psi
Fluxo total	9 mL/minuto
Temperatura linha de transferência	300°C
Fluxo de purga no injetor	3,00 mL/minuto
Temperatura detector	300°C

Parâmetros da rampa de aquecimento		
Rampa de aquecimento (°C/min.)	Temperatura (°C)	manter por (minutos)
-	60	0
30	95	0
20	190	0
5	250	0
30	300	15

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Os íons monitorados pela técnica de GC-MS foram descritos na TABELA 5.

Tabela 5 – Íons monitorados para análise de resíduos de agrotóxicos por GC-MS (modo SIM).

Íons	Identificação do ingrediente ativo/tempo de início de varredura				
	Trifluralina	Clorotalonil	Clorpirifós	Dicofol	Azoxistrobina
	7,8 min	9,7 min	11,2 min	11,4 min	22,8 min
Íons molecular (m/Z)	306	266	197	139	344
Íons fragmento 1 (m/Z)	264	264	197	139	344
Íons fragmento 2 (m/Z)	290	266	199	141	345
Íons fragmento 3 (m/Z)	306	268	314	251	372
Íons fragmento 4 (m/Z)	-	-	316	253	388

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Os dados obtidos foram tratados pelo software GC-Solutions (GC-ECD) e *MSD Chemstation* (GC-MS) e os cálculos executados com auxílio do Excel 2010 e ferramenta Action Stat versão 3.7_2019.

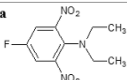

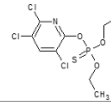
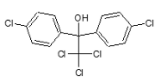
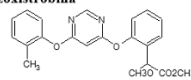
3 Resultados e discussão

Neste trabalho foi estudada a variedade de laranja *Citrus Sinensis* chamada laranja Pêra. Sua produção se destaca no Brasil, pois, além de produzir quase o ano todo, o suco produzido tem um alto rendimento e qualidade (COELHO et al., 2019). No preparo de amostras foram realizados estudos para comparar os métodos e verificar a eficiência de extração dos agrotóxicos da matriz e qual o mais adequado em relação a detecção do i.a. e o efeito matriz sobre o sinal do equipamento.

Os agrotóxicos em estudo foram selecionados com base nos resultados do PARA coordenado pela ANVISA, cujo programa de monitoramento é realizado em todos os Estados Brasileiros por uma rede de laboratórios oficiais e equipes de Vigilâncias Sanitárias. Das 744 amostras de laranja analisadas no período de 2013 a 2015, o i.a. Azoxistrobina foi encontrado em 71 amostras, Clorpirifós em 217 e Dicofol em 30 amostras. O Dicofol é um acaricida organoclorado que era utilizado para cultura citros, e se destaca por ter sido recentemente proibido pela ANVISA, e adicionado à convenção de Estocolmo devido a sua classificação como POP (Poluente Orgânico Persistente). NAKANO *et al.* analisaram resíduos de agrotóxicos em laranja Pêra utilizando a técnica analítica de GC-micro ECD. Dentre os pesticidas analisados, o Clorpirifós e Dicofol foram encontrados nas amostras, indicando o uso sistêmico, com risco de desenvolvimento de resistência das pragas submetidas a esse tratamento agroquímico (NAKANO *et al*, 2016). O i.a. Clorpirifós está sob reavaliação da ANVISA e outros órgãos internacionais do Canadá, Austrália e EUA. O motivo da reavaliação são aspectos toxicológicos como mutagenicidade e toxicidade para o desenvolvimento, especialmente a neurotoxicidade para o desenvolvimento encontrados em estudos recentes (ANVISA, 2021).

Os outros i.a analisados, a Trifluralina que é um herbicida e Clorotalonil são utilizados para cultura citros (AGROFIT, 2019; ANVISA, 2016). A **FIGURA 3** ilustra as características dos agrotóxicos avaliados.

Figura 3 - Características dos agrotóxicos avaliados em cultura de citros.

Ingrediente Ativo	Nomenclatura	Fórmula molecular	Massa molecular g.mol ⁻¹	CAS	LMR mg.kg ⁻¹	Grupo químico	Ação
 Trifluralina	<i>α,α,α</i> -trifluoro-2,6-dinitro- <i>N,N</i> -dipropyl- <i>p</i> -toluidine	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335,283	1582-09-8	0,05	Dinitroanilina	Herbicida
 Clorotalonil	tetrachloroisopt halonitrile	C ₅ Cl ₄ N ₂	265,91	1897-45-6	0,5	Isoftalonitrila	Fungicida
 Clorpirifós	<i>O,O</i> -diethyl <i>O</i> -3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorot hioate	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,575	2921-88-2	2,0	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida
 Dicofol	2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-chlorophenyl)	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	370,475	115-32-2	Proibido	Organoclorado	Acaricida
 Azoxistrobina	methyl (2 <i>E</i>)-2-[2-(6-(2-cyanophenoxy)pyr imidin-4-ylloxy]phenyl]-3-methoxyacrylate	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	131860-33-8	0,5	Estrobilurina	Fungicida

Fonte: MANHANI, K.C.,2019 adaptado.

Nos testes comparativos dos métodos, o de extração líquido-líquido apresentou problemas, com formação de grande quantidade de emulsão, tornando-se inviável a separação do solvente e a matriz. Na extração via QuEChERS ORIGINAL (Método 2), a separação dos analitos da matriz foi feita por meio do uso de acetonitrila, sulfato de magnésio e cloreto de sódio, e no QuEChERS MODIFICADO (Método 3), além de uma alíquota maior de amostra, utilizou-se acetonitrila acidificada (1% ácido acético), sulfato de magnésio e acetato de sódio. Ambos os métodos têm as etapas de extração similares, com a diferença da quantidade de amostra e tipos de reagentes. O método de preparo de amostras QuEChERS, sigla em inglês que significa *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro) foi desenvolvido em 2003 por ANASTASSIADES *et. al.*, bastante divulgado e empregado no preparo de amostras complexas como as amostras de alimentos. O processo de extração por QuEChERS consiste em três etapas: 1^a extração com solvente; 2^a adição de sais para partição da amostra e 3^a limpeza com fase sólida dispersiva (*Clean-Up*). A adição de sais tem efeito "*Salting-out*", ou seja, os sais ficam dissolvidos na fase mais polar (no caso a água) e o solvente fica menos solúvel na fase aquosa, ocorrendo a formação de duas fases, água + sais e solvente acetonitrila + analitos (PRESTES, *et.al.*, 2011).

Em análises iniciais do i.a. Dicofol por GC-ECD para cinco sucos de laranja, todas indicaram a presença deste agrotóxico, sendo que um deles era de categoria orgânica certificada (amostra E).

Em uma segunda etapa de testes, foram comparados os métodos de extração 2 e 3 para os i.a. Trifluralina, Clorpirifós e Dicofol na concentração de 0,1mg kg⁻¹ para avaliar a resolução dos i.a. e ruídos de linha de base. Os resultados encontrados por GC-ECD para cinco sucos estão apresentados na **TABELA 6**.

Tabela 6 - Resultados das amostras em testes preliminares com aplicação dos métodos de preparo de amostras 2 e 3 e recuperação de padrão.

Identificação das amostras	Trifluralina		Clorpirifós		Dicofol	
	¹ Conc. Amostra mg kg ⁻¹ /Rec %		¹ Conc. Amostra mg kg ⁻¹ /Rec %		¹ Conc. Amostra mg kg ⁻¹ /Rec %	
	² Met. 2	³ Met.3	² Met. 2	³ Met.3	² Met. 2	³ Met.3
Branco	N.D./79,0	N.D./60,0	N.D./86,0	N.D./59,0	N.D./67,0	N.D./50,0
Suco A	N.D./103,0	N.D./78,0	N.D./110,0	N.D./71,0	0,029+-0,002/87,0	0,053+-0,002/72,0
Suco B	N.D./92,0	N.D./60,0	N.D./104,0	N.D./65,0	< 0,025*/81,0	< 0,025*/55,0
Suco C	N.D./59,0	N.D./57,0	N.D./78,0	N.D./58,0	<0,025*/27,0	< 0,025*/47,0
Suco D	N.D./103,0	N.D./69,0	N.D./103,0	N.D./67,0	< 0,025*/91,0	0,040+-0,002/51,0
Suco E	N.D./115,0	N.D./81,0	N.D./102,0	N.D./62,0	0,103+-0,005/50,0	0,070+-0,001/57,0

¹Concentração da amostra sem a adição do padrão

²Met.2 - Método de preparo de amostras 2

³Met.3 - Método de preparo de amostras 3

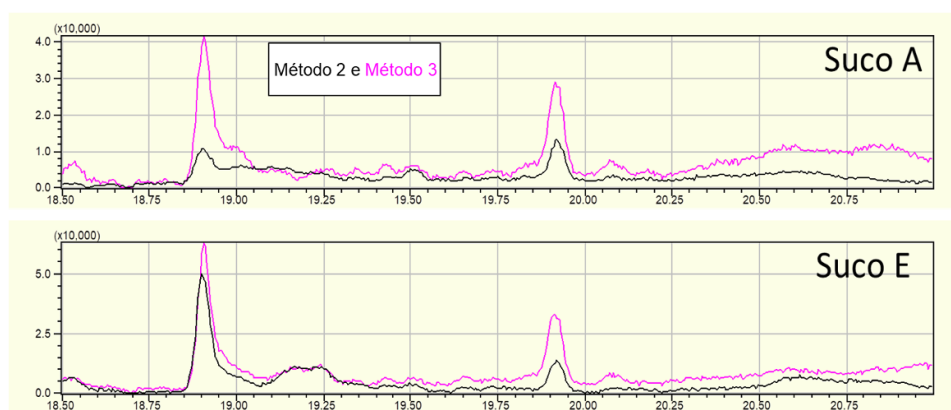
N.D. - ingrediente ativo não detectado

< 0,025* - pico de Dicofol detectado, porém com concentração menor que o primeiro ponto da curva (0,025 mg kg⁻¹)

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Das cinco amostras avaliadas, duas amostras (A e E) apresentaram i.a. Dicofol acima do primeiro ponto da curva de calibração ($0,025 \text{ mg kg}^{-1}$) pelo preparo do método 2 e três amostras (A, D e E) pelo método 3. Na análise por GC-ECD e GC-MS observou-se que o método 3 apresentou maior ruído na linha de base do cromatograma, conforme demonstrado com as amostras A e E na FIGURA 4. Isso significa que o pH colabora para extração de mais substâncias interferentes de matriz, mas também pode auxiliar na extração dos i.a. de interesse que não tenham uma recuperação eficiente utilizando outros métodos de preparo como o QuEChERS original, conforme indicado por LEHOTAY *et al.* (2005).

Figura 4 - Cromatogramas de GC-MS sobrepostos - método 2 na cor preto e método 3 na cor rosa



Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Os métodos 2 e 3 foram testados em relação à etapa de *Clean Up*. Extratos de matriz de laranja orgânica isenta de contaminantes, com adição de padrão, foram submetidas à etapa de *Clean Up*. Três testes foram executados, conforme a descrição:

- Método 2 - *Clean Up* 1: Extrato preparado conforme método 2 e adição de padrão, etapa de limpeza com 300 mg de MgSO_4 anidro e 50 mg de PSA
- Método 3 - *Clean Up* 1: Extrato preparado conforme método 3 e adição de padrão, etapa de limpeza com 300 mg de MgSO_4 anidro e 100 mg de PSA
- Método 3 - *Clean Up* 2: Extrato preparado conforme método 3 e adição de padrão, etapa de limpeza com 300 mg de MgSO_4 anidro, 100 mg de PSA e 100 mg de C18 ODS.

Os resultados obtidos para os testes foram apresentados na TABELA 7.

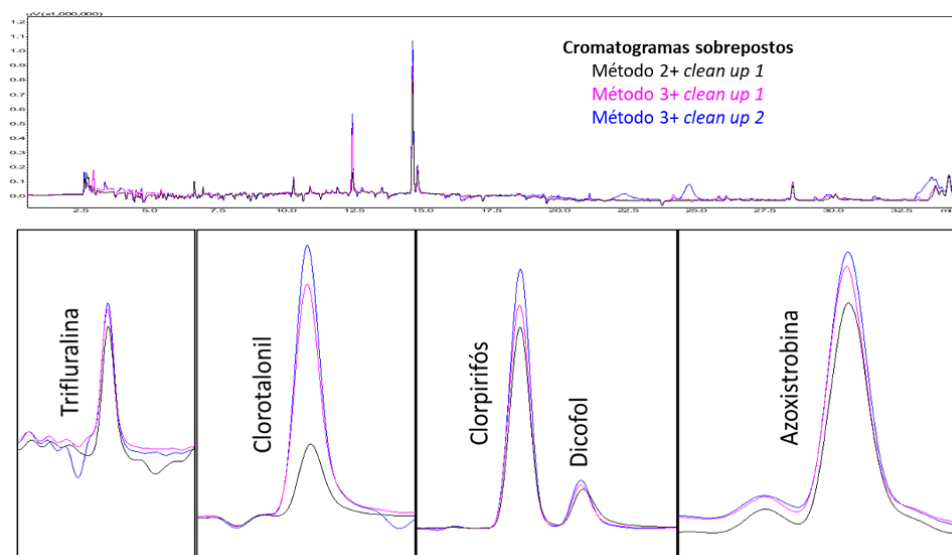
Tabela 7 - Resultados dos testes e *Clean Up* para os métodos de preparo de amostras 2 e 3.

Identificação do teste	Trifluralina Rec (%)	Clorotalonil Rec (%)	Clorpirifós Rec (%)	Dicofol Rec (%)	Azoxistrobina Rec (%)
Método 2 - <i>Clean up</i> 1	89	44	71	101	81
Método 3 - <i>Clean up</i> 1	101	76	79	98	90
Método 3 - <i>Clean up</i> 2	86	77	89	109	97

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Na FIGURA 5 foram apresentados o cromatograma dos testes descritos na TABELA 7 e o corte para cada banda cromatográfica dos i.a.

Figura 5 - Cromatogramas dos testes de preparo de amostras descritos na Tabela 7.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Avaliando os resultados de todos os preparos, os testes de recuperação com maior eficiência foram os preparados com o método 3. Este método teve como referência bibliográfica o artigo de LEHOTAY *et al.* (2005), no qual foi indicado mudanças de reagentes e proporção, faixa de pH em 4,8 para melhoria de recuperação de i.a. A otimização foi feita com adição de maior quantidade de adsorvente PSA e acréscimo de C18 ODS para a diminuição de interferentes da matriz como óleos presentes na casca da laranja que possam co-eluir com os analitos de interesse, sendo portanto o método 3 adotado para a análise das demais amostras.

Para as análises por GC-ECD e GC-MS foram testados 25 condições, entre troca de coluna, rampa de temperatura, modo de injeção e fluxo de gás, até obter a melhor seletividade, resolução dos picos, intensidade de sinal, com um tempo de análise adequado. Inicialmente o método foi desenvolvido no GC-ECD e depois otimizado no GC-MS, para identificação confiável dos agrotóxicos.

Como parâmetros de qualidade, foram determinados LD, LQ, coeficiente de determinação (r^2), coeficiente de correlação (r) e faixa linear de trabalho com base em 3 curvas de calibração preparadas na matriz de extrato de laranja, conforme apresentados na **TABELA 8**.

Tabela 8 - Parâmetros de qualidade para os ingredientes ativos no método QuEChERS modificado

Identificação do i.a.	Trifluralina mg kg ⁻¹	Clorotalonil mg kg ⁻¹	Clorpirifós mg kg ⁻¹	Dicofol mg kg ⁻¹	Azoxistrobina mg kg ⁻¹
Limite de detecção (LD)	0,012	0,060	0,100	0,040	0,040
Limite de quantificação (LQ)	0,04	0,20	0,30	0,11	0,12
Coeficiente de determinação (r^2) (com base em 3 curvas de calibração)*	0,992	0,995	0,993	0,998	0,997
Coeficiente de Correlação de Pearson (r)*,**	0,9913	0,9935	0,9958	0,9975	0,9971
Faixa linear de trabalho	0,03-0,10	0,30-0,70	0,30 - 0,9	0,11-0,50	0,12-0,50

*Como critério de aceitação para r e r^2 foi adotado o valor $\geq 0,90$ (INMETRO, 2003).

**O coeficiente de Pearson foi calculado pelo software Action Stat por meio das três curvas de calibração.

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Com os métodos de preparo e análise definidos, as 21 amostras cítricas foram analisadas utilizando o método de preparo de amostra 3, análise por GC-ECD e análise por GC-MS utilizando o método SIM.

A técnica analítica de GC-ECD é uma das mais sensíveis para determinação de compostos halogenados, podendo fazer leitura de picogramas (10^{-12} g) de concentração, sem interferência de solventes derivados de hidrocarbonetos, considerada uma técnica sensível, reproduzível, simples e de fácil operação para determinação dos i.a. como o Dicofol, Clorotalonil, Trifluralina, Clorpirifós e também Azoxistrobina.

Apesar de nas etapas de desenvolvimento três amostras de suco de laranja, dentre elas um da classe orgânica, apresentarem indícios da presença do agrotóxico Dicofol, na aplicação do método e preparo desenvolvido, nenhuma amostra apresentou tal agrotóxico. Para as 12 amostras de laranja, um pico no tempo de retenção do agrotóxico Clorpirifós (composto organofosforado) foi encontrado em três amostras, porém não pode ser confirmado na análise por GC-ECD e GC-MS devido à concentração menor que a detectável pelo equipamento de forma confiável ($<LD - 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$).

A técnica de GC-MS demonstrou eficácia na determinação dos agrotóxicos em estudo, avaliando-se a matriz cítrica com adição dos padrões nas faixas de concentração do LMR dos agrotóxicos em estudo, sendo confirmado na biblioteca NIST com mínimo de três íons fragmentos no espectro de massas.

4 Conclusões

O desenvolvimento de técnica analítica para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos cítricos por QuEChERS modificado e análise por GC-ECD e GC-MS alcançou resultados satisfatórios de seletividade, com o estudo do efeito matriz e limite de detecção de acordo com o preconizado no método de validação analítica, podendo ser classificado como uma análise qualitativa validada para os pesticidas Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina. A metodologia QuEChERS foi estudada com maior profundidade, demonstrando ser eficiente no preparo de matriz cítrica como a laranja e suco de laranja, uma alternativa ambientalmente sustentável se comparada a métodos convencionais que utilizam grandes quantidades de solvente como a extração líquido-líquido. A comparação entre os métodos QuEChERS original

e QuEChERS acetato modificado para laranja, este último com otimização, proporcionou a melhoria na limpeza da amostra, com eficiente recuperação de padrão e diminuição do efeito matriz aplicados a um total de 26 amostras de laranjas e suco de laranja (5 amostras de suco de laranja nas etapas experimentais e 21 amostras cítricas com método consolidado). Durante o processo de desenvolvimento, detectou-se a presença do i.a. Dicofol com monografia excluída pela ANVISA, em três amostras de suco de laranja em concentrações acima do primeiro ponto da curva experimental, das quais uma amostra de suco era de certificação orgânica. Contudo, o conjunto de resultados obtidos demonstram a importância do controle e do desenvolvimento de análises cada vez mais sensíveis e eficazes para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, para assegurar a saúde da população, valorização do produto interno e de exportação.

5 Agradecimentos

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) por fornecer a infraestrutura, materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho, bem como proporcionar a capacitação técnica.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela parceria e suporte técnico que tornaram possível este trabalho.

6 Referências

USDA, 2023. **Citrus: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/tt44r006w/b56464320/citrus.pdf>
Acesso em: 13 fev./2023

DA SILVA-DE PAULA, M.C.M.; DE CARVALHO, D.U.; DA CRUZ, M.A.; LONGHI, T.V.; TAZIMA, Z.H.; BEHLAU, F.; DE CARVALHO, S.A.; LEITE, R.P., Jr. Agronomic Performance of Sweet Orange Genotypes under the Brazilian Humid Subtropical Climate. **Horticulturae** 2022, v. 8, p. 254. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/3/254>. Acesso em 23 fev. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2022. **Consulta na base de dados, produção brasileira, laranja**. Disponível em: http://www.cnpqm.f.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/laranja/b1_laranja.pdf. Acesso em: 30 jan. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentos_regionais_brasileiros_2ed.pdf. Acesso em: 13 fev. 2023.

NEVES, M. F. *et al.* O retrato da citricultura brasileira. **Ribeirão Preto: Citrus BR**, 2010

GURGEL, A. M. *et al.* Reflexos da perda do controle estatal sobre os agrotóxicos no Brasil e sua regulação pelo mercado. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 11, n. 3, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>> Acesso em: 18 de fev. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2023 – **Relatório de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>. Acesso em: 30 jan.2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2022. **Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso em 30 jan. 2023.

FUNDAÇÃO DE DEFESA DA CITRICULTURA – FUNDECITRUS, 2022. **Levantamento de incidência de doenças dos citros**. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos>. Acesso em: 3 fev. 2023.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. **Piretróides – Uma visão geral**. 2007, v.18, n.3, p.339-349

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso em 18 Fev. 2023.

CARNEIRO, F. F. *et al.* (org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossie_Abrasco_01.pdf. Acesso: 18 fev. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008- Revisão 07. 2018.

EUROPEAN COMMISSION - EU, Directorate General for Health and Food Safety. **Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed**. Sante 11312/2021. 2021.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA –**Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos** – PARA ANVISA 2012. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em 30 jan..2023.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - **RDC Nº 4, DE 18 DE JANEIRO DE 2012a**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html> Acesso em: 10 dez.2022.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA **Reavaliação de Agrotóxicos**, atualizado em 11/10/2019 - Disponível em: portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/reavaliacao-de-agrotoxicos, ano 2019a. Acesso em: 29/11/2022.

COELHO, B. E.S.; DUARTE, V.M.; SILVA, L.F.M.; SOUZA, K.S.M.; NETO, A.S. Atributos físico-químicos de frutos de laranja ‘Pêra’ produzidos sob sistemas de cultivo orgânico e convencional. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 5, n. 1, 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos - **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Publicação em 25 de novembro de 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 10 jan. 2023.

NAKANO *et al*, Evaluation of pesticide residues in oranges from São Paulo, Brazil. **Food Science and Technology**, 2016, v. 36, n. 1, p. 40-48.

ANVISA, 2021 - EDITAL DE CHAMAMENTO Nº 22, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2021, **Processo de reavaliação de ingrediente ativo Clorpirifós**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/EditalClorpirifos.pdf>>. Acesso em: 18 fev.23.

AGROFIT, **Plataforma do Ministério da Agricultura para consulta de ativos e produtos formulados como defensivos agrícolas**. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 20 nov.2022.

BIORENDER **plataforma de desenhos científicos**. Disponível em: <https://app.biorender.com/illustrations/63f134d89bc75eec6d486b83>. Acesso em 18 fev.2023.

MANHANI, Kelly Cristina. **Análise multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos via técnicas cromatográficas: GC/ECD E GC/MS**. dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, 2011, v. 3, n. 1, p. 51-64.

ANASTASSIADES. M.; LEHOTAY.S. J; STAJNBAHER.D. SCHENCK.F.J. Fast an Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/ Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticides Residues in Produce. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 2003, V.86. p 412

10.29327/2152495.8.23-4



Para obter mais informações
sobre os mestrados profissionais

Entre em contato com Adilson ou Mary pelo e-mail
mestrado@ipt.br
ou ligue para (11) 3767.4673

Sobre os cursos de especialização,
curta duração e educação corporativa

Entre em contato com Andrea pelo e-mail
cursos@ipt.br
ou ligue para (11) 3767-4226

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
Av. Prof. Almeida Prado, 532
Cidade Universitária - São Paulo - SP
CEP 05508-901 - Brasil

Central de Relacionamento com o Cliente
(11) 3767-4102 / 4456 / 4091

Ensino Tecnológico
(11) 3767-4673 | mestrado@ipt.br

 <https://www.instagram.com/iptensinotecnologico/>

 <https://bit.ly/FacebookEnsinoTecnologicoIPT>

 <https://bit.ly/LinkedinEnsinoTecnologicoIPT>

 <https://www.youtube.com/@cursosipt>



sapiens.ipt.br

revista IPT

TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Confira em nosso site todas as edições da revista

<https://bit.ly/revistaIPT>



ipt
INSTITUTO DE
PESQUISAS
TECNOLÓGICAS
ENSINO TECNOLÓGICO

