

RAFAEL ROVATTI PUPIN

**Polímeros biomiméticos nanomagnéticos com acesso restrito
(RAMIP magnéticos) obtidos por síntese semicovalente e não
covalente visando aplicação em imunossensores e imunoenaios**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

P976p	<p>Pupin, Rafael Rovatti</p> <p>Polímeros biomiméticos nanomagnéticos com acesso restrito (RAMIP magnéticos) obtidos por síntese semicovalente e não covalente visando aplicação em imunossensores e imunoenaios / Rafael Rovatti Pupin. – Araraquara: [s.n.], 2017 145 f.: il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maria del Pilar Taboada Sotomayor Coorientador: María Isabel Pividori</p> <p>1. Biotina. 2. Polímeros impressos. 3. Nanopartículas-Propriedades magnéticas. 4. Imunoensaio. 5. Materiais biomiméticos. I. Título</p>
-------	---

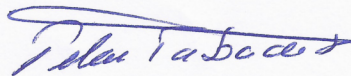
Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

RAFAEL ROVATTI PUPIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 04 de agosto de 2017.

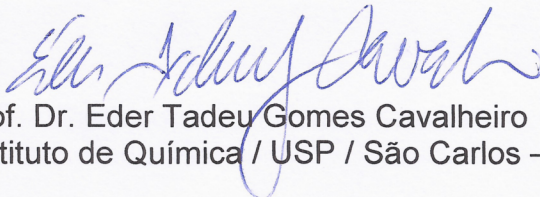
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro
Instituto de Química / USP / São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Rafael Rovatti Pupin

Nome em citações bibliográficas: PUPIN, R. R.

Nascimento: 31/07/1992

Naturalidade: Monte Alto/SP - Brasil

E-mail para contato: rafaelpupin@hotmail.com

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Química de Araraquara. Departamento de Química Analítica. Rua Professor Francisco Degni, 55. CEP: 14800-060. Araraquara/SP - Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Química

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/SP.

Período: março 2015 - agosto 2017

Título da dissertação: Polímeros biomiméticos nanomagnéticos com acesso restrito (RAMIP magnéticos) obtidos por síntese semicovalente e não covalente visando aplicação em imunossensores e imunoenaios.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Bolsa: FAPESP (Proc. nº 2015/04367-1)

Graduação em Química

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/SP

Período: fevereiro 2011 - dezembro 2014

Título do trabalho de conclusão de curso: Síntese de materiais híbridos baseados em magnetita e MIP para detecção de penicilina G.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Coorientador: Dr. Marcos Vinicius Foguel

Bolsa: FAPESP (Proc. nº 2012/14181-4)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Mestrado Sanduíche

Universitat Autònoma de Barcelona - UAB. Barcelona, Espanha.

Período: outubro 2016 - março 2017

Título: Biotin Magnetic Molecularly Imprinted Polymer for isolation and detection of biotinylated biomolecules with magneto-actuated devices and *Lateral Flow*.

Supervisora no exterior: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Bolsa: BEPE (FAPESP - Proc. nº 2016/07250-0)

PRODUÇÃO

Produção Bibliográfica

Artigo publicado

BEN AISSA, A.; HERRERA, A.; PUPIN, R. R.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; PIVIDORI, M.I. Magnetic molecularly imprinted polymer for the isolation and detection of biotin and biotinylated biomolecules. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 88, p. 101-108, 2016.

Capítulo de livro

PUPIN, R. R.; MONTEIRO, G. C.; FOGUEL, M. V.; BOLZANI, V. S.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. D. P.T. **Molecularly Imprinted Polymers (MIP): From the Bulk Synthesis to Hybrid Material to Classic and New Applications**. In: *Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Challenges, Uses and Prospects*. 1 ed. Hauppauge: Nova Science Publishers, p. 43-118, 2016.

Trabalhos mais recentes publicados em anais de eventos

1. PUPIN, R. R.; MONTEIRO, G. C.; BOLZANI, V. S.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Magnetic Molecularly Imprinted Polymers (MMIP) modified with bovine serum albumin and polyethylene glycol: synthesis and characterization of new generation of restricted access materials. In: **46th IUPAC World Chemistry Congress**, 2017, São Paulo/SP, Brazil.

2. SOTOMAYOR, M. D. P. T.; PUPIN, R. R.; HERRERA, A.; BEN AISSA, A.; PIVIDORI, M. I. Magneto-actuated molecularly imprinted polymers for biotin and biotinylated biomolecules. In: **5th International Conference on Bio-Sensing Technology**, 2017, Riva Del Garda, Italy.

3. PUPIN, R. R.; MONTEIRO, G. C.; BOLZANI, V. S.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Síntese e caracterização de MIP magnético modificado com albumina de soro bovino e/ou polietileno glicol – Uma nova geração de MIP com acesso restrito. In: **18º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica**, 2016, Florianópolis/SC, Brasil.

4. SOTOMAYOR, M. D. P. T.; PUPIN, R. R.; HERRERA, A.; BEN AISSA, A.; PIVIDORI, M.I. Magnetic MIPs for biotin and biotinylated biomolecules: A promising material for magneto actuated devices. In: **Biosensors 2016 Congress**, 2016, Gothenburg, Sweden.

5. PUPIN, R. R.; FOGUEL, M. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Synthesis and characterization of magnetic molecularly imprinted polymer for penicillin G. In: **XIV Brazilian MRS Meeting (SBPMat)**, 2015, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

Patentes e registros

Patente

PUPIN, R. R.; FOGUEL, M. V.; SOTOMAYOR, M. P. T. Processo para a separação de polímeros magnéticos com impressão molecular (MIP). Patente de invenção. Número do registro: BR 10 2016 0165. Data de depósito: 18/07/2016. Instituição de depósito: INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Feira de inovação

Rafael Rovatti Pupin, Marcos Vinicius Foguel, Sabir Khan, Maria del Pilar Taboada Sotomayor. “Polímeros impressos de alta seletividade para monitoramento da

qualidade de alimentos frescos: detecção de traços de antibióticos em leite e pesticidas em vegetais”. In: **Innovation Fair**, Dow Brasil, 2015, São Paulo/SP, Brasil.

PRÊMIOS E TÍTULOS

Diploma de melhor aluno do curso no período de 2011 a 2014. Prêmio Lavoisier do CRQ - 4ª Região.

Certificado de honra ao mérito - Melhor aluno do curso de química da Turma de 2014. Instituto de Química/UNESP - Araraquara.

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS

Estágios de docência

1. Estágio docência na disciplina prática e teórica de Química Analítica Qualitativa para o segundo ano da licenciatura em química, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor. Instituto de Química-Araraquara, UNESP, 2015.
2. Estágio docência colaborativo na disciplina prática de Eletroanalítica para o terceiro ano do bacharelado em química sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor. Instituto de Química-Araraquara, UNESP, 2016.

Colaborações

1. Síntese de polímeros biomiméticos híbridos para substâncias estrogênicas visando desenvolvimento de sensores com a mestranda Bruna Bergamin.
2. Desenvolvimento de método cromatográfico para identificação e quantificação do galato de dodecila (agente tripanocida) com a pós-doutoranda Mariele Mucio Pedroso.

Cursos de aperfeiçoamento

1. Bioanalytical Chemistry. Instituto de Química - UNESP, Araraquara/SP, 2014.
2. Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - Preparação de amostra. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara/SP, 2015.

Aos meus pais José e Ana e minhas
irmãs Josiana e Heloisa, com todo
amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Ana, por todo amor, apoio incondicional e suporte em minha formação pessoal e profissional. Uma parte do que sou hoje devo aos esforços e cuidados que vocês sempre dedicaram a mim. Amo vocês.

Às minhas irmãs, Josiana e Heloisa, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, compartilhando todo amor, carinho e alegrias. Amo vocês.

À Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor, minha “mãe científica”, pela orientação e pelos ensinamentos essenciais ao desenvolvimento deste trabalho; além das inúmeras oportunidades de aprendizado para a construção da minha carreira. Obrigado também pela confiança em mim depositada e pela amizade construída no decorrer desses anos.

À Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori pela coorientação e por toda ajuda prestada durante o mestrado sanduíche na *Universitat Autònoma de Barcelona*, na Espanha. À MSc. Alejandra Ben Aissa pela colaboração nos experimentos e discussões científicas. E a todos os membros do grupo pelos excelentes momentos que passamos juntos: Sílio, Arnau, Olga, Emy, Laura, Melania, Soledad, Jennifer e Ally.

À Prof.^a Dr.^a Vanderlan da Silva Bolzani, coordenadora do NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), por ceder o laboratório para realização das sínteses de uma das etapas deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka, Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin, Prof.^a Dr.^a Fabíola M. V. Pereira e Prof. Dr. Nelson R. Stradiotto, do GEAr (Grupo de Eletroanalítica de Araraquara), pelas discussões científicas e ensinamentos.

Ao Dr. Marcos Vinicius Foguel e Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka pela avaliação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

À Mariana Barbosa da Silva, minha amiga maravilhosa e irmã de coração, pelo apoio, amizade, palavras de conforto e sábios conselhos. Agradeço por me dar força nas dificuldades e deixar os meus dias mais alegres.

Ao MSc. Gustavo Claro Monteiro, o qual começou como um parceiro de trabalho e, por fim, se tornou um grande amigo. Obrigado por todo apoio profissional e pessoal, pelo trabalho desenvolvido em conjunto, por todos os bons momentos e pela companhia diária.

A todos os colegas do GEAr pelas discussões científicas e momentos de descontração durante os cafés. Em especial ao Eduardo, Mayara e Carol Rocha pelo carinho de sempre.

À Dr.^a Mariele Mucio Pedroso, MSc. Juliana Ferreira de Brito e Dr. Marcos Vinicius Foguel agradeço pela companhia diária, risadas, momentos de descontração, cooperações na pesquisa e pelos melhores almoços. A amizade de vocês três tornou o caminho até aqui muito mais fácil e agradável.

A todos os técnicos pelas análises realizadas e discussões dos resultados, bem como aos funcionários e servidores do Instituto de Química.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas (Mestrado - Processo nº 2015/04367-1 e BEPE - Processo nº 2016/07250-0).

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.”
(Antoine de Saint-Exupéry)

“A beleza não está na partida, nem na chegada, mas na travessia.”
(Guimarães Rosa)

RESUMO

A biotina (vitamina B7) pode ser acoplada a diferentes tipos de moléculas e, ainda assim, ser reconhecida seletivamente pelas proteínas avidina e estreptavidina devido à alta constante de afinidade que existe entre elas ($K_a = 1,0 \times 10^{15} \text{ L mol}^{-1}$). Assim, essa interação proporciona excelente aumento na sensibilidade de várias análises; o que leva ao desenvolvimento métodos analíticos para determinação de diferentes compostos que são biotinilados. O uso de materiais biológicos, como anticorpos ou proteínas, em análises de rotina se torna muitas vezes dispendioso e, devido à baixa estabilidade das biomoléculas em condições adversas às mesmas, iniciou-se a síntese de materiais que possam mimetizar as interações biológicas de reconhecimento; o que vem sendo feito com sucesso pelos polímeros molecularmente impressos (MIP). Esses polímeros apresentam vantagens em relação às biomoléculas por possuírem baixo custo, fácil preparação e alta resistência mecânica e térmica. Assim, esta dissertação aborda a síntese, caracterização, otimização e aplicação de diferentes MIP que possuem biotina como molécula alvo. Os estudos iniciais focaram na síntese do MIP magnético (MMIP) com acesso restrito (RAMIP) para realizar exclusão proteica pela modificação do polímero com albumina do soro bovino (BSA) e polietileno glicol (PEG). Enquanto o RAMIP recoberto com BSA não apresentou bons resultados nos experimentos, o RAMIP recoberto com PEG, após otimização, apresentou resultados altamente satisfatórios na exclusão proteica (com valores na faixa de 98 até 99,4 % de exclusão) e bons resultados na religação da biotina (2,0 mg de biotina por grama de polímero). A segunda parte do trabalho foi focada no estudo da influência do tipo de impressão molecular (não covalente e semicovalente) na capacidade do reconhecimento seletivo dos MMIP. Para isso, foi sintetizado previamente o complexo analito-monômero (por meio de uma ligação covalente entre a biotina e o álcool alílico como monômero funcional). Esse MMIP foi submetido aos ensaios de reconhecimento da biotina utilizando-se interações não covalente, sendo denominado de MMIP semicovalente; cujos resultados foram comparados com MMIP para biotina não covalente otimizado previamente. O MMIP semicovalente apresentou uma constante de afinidade pela biotina de $5,9 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, enquanto para o MMIP não covalente foi de $2,4 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Finalmente, o MIP e o MMIP para biotina (sintetizados via não covalente) foram aplicados em ensaios biomiméticos utilizando as técnicas de ELISA e Fluxo Lateral. Nos ensaios ELISA avaliou-se a capacidade de reconhecimento do MMIP pela biotina-HRP e DNA biotinilado (das bactérias *E. coli* e *Salmonella*). Para biotina-HRP, o MMIP apresentou retenção (na faixa de 5,0 até 2500 ng mL⁻¹), e uma alta intensidade de sinal. Para o DNA biotinilado, de ambas bactérias, o MMIP mostrou maior retenção do amplicon quando comparado ao NIP. A aplicação do MIP nos dispositivos de Fluxo Lateral é inédita. Assim, após a otimização de todos os parâmetros para desenhar a linha de teste contendo MIP (como solvente, massa, soluções, etc.), avaliou-se a resposta do sistema para diferentes moléculas biotiniladas: para BSA-biotina e o corante Atto 655-biotina os resultados não foram satisfatórios; para biotina-HRP, biotina 4-fluoresceína e os amplicons, MIP apresentou boa resposta no reconhecimento seletivo. Assim, os MIP mostraram-se promissores no desenvolvimento de ensaios biomiméticos.

Palavras-chave: Biotina. Polímeros impressos. ELISA magnético. Fluxo Lateral.

ABSTRACT

Biotin (vitamin B7) can be attached with different types of molecules and still be selectively recognized by avidin/streptavidin proteins due to the high affinity constant between them ($K_a = 1,0 \times 10^{15} \text{ L mol}^{-1}$). Thus, this interaction provides an excellent increase in the sensitivity of analyzes; which leads to the development of analytical methods for the determination of different biotinylated compounds. The use of biological materials, such as antibodies or proteins, in analyzes is often expensive and has low stability of biomolecules under adverse conditions, which has led to the synthesis of materials that can mimic the biological interactions of recognition; which has been successfully made by molecularly printed polymers (MIP). These polymers have advantages over biomolecules because they have low cost, easy preparation and high mechanical and thermal resistance. Thus, this dissertation explores the synthesis, characterization, optimization and application of different MIP that has biotin as the target molecule. Initial studies focused on the synthesis of magnetic MIP (MMIP) with restricted-access (RAMIP) to evaluate protein exclusion by modifying the polymer with bovine serum albumin (BSA) and polyethylene glycol (PEG). While RAMIP coated with BSA didn't present good results in the experiments, the RAMIP coated with PEG, after optimization, presented highly satisfactory results in protein exclusion (with values ranging from 98 to 99.4% of protein exclusion) and good results in the rebinding of biotin (2.0 mg of biotin per gram of polymer). The second part of the work was focused on the study of influence of molecular imprinting (non-covalent and semi-covalent) on the capacity of the selective recognition of MMIP. For this, the analyte-monomer complex was previously synthesized (by a covalent bond between biotin and allyl alcohol as functional monomer). This MMIP was submitted to the biotin recognition assays using non-covalent interactions, being nominated as semi-covalent MMIP; whose results were compared with non-covalent biotin MMIP previously optimized. The semi-covalent MMIP had an affinity constant for biotin of $5,9 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, while for non-covalent MMIP it was $2,4 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Finally, MIP and MMIP for biotin (synthesized via non-covalent) were applied in biomimetic assays using ELISA and Lateral Flow techniques. In the ELISA assays, it was evaluated MMIP recognition capacity by biotin-HRP and biotinylated DNA (of *E. coli* and *Salmonella* bacteria). For biotin-HRP, MMIP showed good retention results (in the range of 5.0 to 2500 ng mL⁻¹), and good signal intensity. For biotinylated DNA of both bacteria, MMIP showed higher retention of the amplicon when compared to MNIP. The application of MIP in Lateral Flow devices it wasn't reported before. Thus, after optimizing all the parameters to design the test line containing MIP (as solvent, mass, solutions, etc.), the system's response to different biotinylated molecules was evaluated: for BSA-biotin and Atto 655-biotin dye the results were not satisfactory; for biotin-HRP, biotin 4-fluorescein and the amplicons MIP showed good selective recognition response. Thus, the imprinted polymers are promising materials in the development of biomimetic assays.

Keywords: Biotin. Imprinted Polymers. Magnetic ELISA. Lateral Flow.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural química da biotina.	25
Figura 2 - Etapas da síntese do MIP.	28
Figura 3 - (a) Componentes da tira de fluxo lateral e (b) visão geral de uma tira de fluxo lateral montada e contendo as linhas de teste e controle.	35
Figura 4 - Síntese e modificação da magnetita.	43
Figura 5 - Esquema de síntese da biotina aliléster.	47
Figura 6 - Representação esquemática da amplificação por PCR e dupla marcação dos genes eaeA (<i>E. coli</i>) e yfiR (<i>Salmonella</i>) com os marcadores específicos.	54
Figura 7 - Procedimento esquemático para imunoenensaio magnético baseado em magneto MIP para detecção do amplicon duplamente marcado: (a) interação entre o MMIP e DNA, (b) limpeza para remover o excesso de reagentes e (c) leitura óptica e quantificação da reação usando TMB/H ₂ O ₂	56
Figura 8 - Esquema de detecção da biotina-HRP no sistema de fluxo lateral: (a) amostra contendo analito é adicionada na tira de amostra, e, com solução tampão TRIS, o analito flui pela membrana até (b) reconhecimento específico da biotina na linha de teste contendo MIP para biotina, cuja reação entre TMB, H ₂ O ₂ e HRP, (c) proporciona o aparecimento de coloração azul na linha (os excessos de analito e solução tampão fluem até a tira adsorvente).....	59
Figura 9 - Imobilização do HEMA na superfície do MMIP.	61
Figura 10 - Etapas da reação de recobrimento da superfície do RAMIP com PEG.	62
Figura 11 - Mecanismo de formação do derivado clorado do PEG.	63
Figura 12 - Mecanismo da reação de esterificação entre grupo hidroxila do RAMIP e o derivado clorado do PEG.	63
Figura 13 - Espectro vibracional da biotina na região do IV.	64
Figura 14 - Espectro vibracional do ácido acrílico na região do IV.	65
Figura 15 - Espectro vibracional do EGDMA na região do IV.	66
Figura 16 - Mecanismo de polimerização radicalar (etapas de iniciação e propagação) do EGDMA utilizando AIBN como iniciador.....	67
Figura 17 - Espectros dos comonômeros GDMA e HEMA na região do IV.....	68
Figura 18 - Espectro na região do IV para os diferentes RAMIP sintetizados de acordo com condições especificadas na Tabela 2.....	69

Figura 19 - Mecanismo de reação S_N2 no grupo hidroxila do comonômero HEMA..	70
Figura 20 - Mecanismo de hidrólise ácida da carbonila do comonômero HEMA.....	71
Figura 21 - Espectros na região do IV para os RAMIP lavados com solvente à frio.	72
Figura 22 - Espectros na região do IV para comparação entre MMIP, BSA e RAMIP@BSA.	73
Figura 23 - Espectros na região do IV para comparação entre MMIP, PEG e RAMIP@PEG.	73
Figura 24 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 25 000 x do MMIP (a), magneto RAMIP (b), magneto RAMIP@BSA 1% (c) e magneto RAMIP@BSA 2% (d).	74
Figura 25 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 25 000 x do MMIP (a), RAMIP (b), RAMIP@PEG 0,125 (c), RAMIP@PEG 0,25 (d) RAMIP@PEG 0,5 (e).	75
Figura 26 - Ilustração do momento magnético (M) de diferentes tipos de materiais sob aplicação de um campo magnético (H).	76
Figura 27 - Curvas de histerese magnética para o MMIP, RAMIP e as modificações com diferentes proporções de BSA.	77
Figura 28 - Curvas de histerese magnética para o MMIP, RAMIP e as modificações com diferentes proporções de PEG.	78
Figura 29 - Curvas TG para a BSA utilizada como modificador e os polímeros sintetizados.	79
Figura 30 - Curvas de análise termogravimétrica e calorimetria diferencial exploratória para BSA (a), magneto MIP (b) magneto RAMIP@BSA (c).	81
Figura 31 - Curvas de TG para PEG utilizado como modificador e os polímeros sintetizados.	82
Figura 32 - Espectros de RMN de sólido 1H do RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG (400 MHz).....	84
Figura 33 - Espectros de RMN de ^{13}C dos sólidos RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG (400 MHz).	85
Figura 34 - Espectros de XPS para os diferentes polímeros sintetizados.	86
Figura 35 - Espectros de fotoelétrons para N 1s e S 2p da proteína BSA.	88
Figura 36 - Espectros de fotoelétrons para O 1s e C 1s do RAMIP@PEG.	88
Figura 37 - Cromatograma HPLC/UV para 50,0 mg L ⁻¹ de biotina solubilizada em metanol; com tempo de retenção em 6,0 min.	91

Figura 38 - Curva analítica obtida por HPLC com método otimizado para análise de biotina (em intervalo de concentração de 5,0 até 100,0 mg L ⁻¹) solubilizada em metanol.....	92
Figura 39 - Isotermas de ligação da biotina (em intervalo de concentração de 5 até 100 mg L ⁻¹ solubilizada em metanol) em contanto com 10,0 mg dos diferentes polímeros.....	95
Figura 40 - Estudos de ligação para (a) biocitina e (b) tetraciclina solubilizadas em MeOH, com faixa de concentração de 5,0 até 50,0 mg L ⁻¹ , em contato com 10,0 mg dos diferentes polímeros (t = 2 h).....	96
Figura 41 - Otimização do tipo de solvente contendo 20,0 mg L ⁻¹ de biotina para interação com o RAMIP@PEG (10,0 mg).	97
Figura 42 - Dosagem de massa do adsorvente RAMIP@PEG (em intervalo analisado de 5,0 até 75,0 mg) em contanto com biotina (50,0 mg L ⁻¹ solubilizada em MeOH).	98
Figura 43 - Otimização do tempo de equilíbrio entre RAMIP@PEG e biotina, avaliando um intervalo entre 10 min e 300 min, sendo fixada a massa de RAMIP@PEG em 5,0 mg e concentração de biotina de 50,0 mg L ⁻¹ em MeOH.	99
Figura 44 - Isoterma de adsorção para biotina (de 5,0 até 100,0 mg L ⁻¹ em MeOH) em contato com os polímeros (10,0 mg) com tempo de interação de 90 minutos.	100
Figura 45 - Espectro de RMN ¹ H para a biotina (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	102
Figura 46 - Espectro de RMN ¹ H para biotina alil éster (CHCl ₃ -d, 600 MHz).....	103
Figura 47 - Espectro na região do infravermelho para biotina e biotina alil éster. ..	103
Figura 48 - Resultados para otimização da dosagem de massa de MMIP (intervalo de 2,0 até 30,0 mg) após interação por 2 horas com biotina (20,0 mg L ⁻¹) preparada em metanol para as duas sínteses avaliadas: (a) proporção 1:20 (analito:monômero) e (b) proporção 1:40 (analito:monômero).	105
Figura 49 - Resultados para otimização do tempo de interação (intervalo analisado de 5 até 270 minutos) entre o MMIP (15,0 mg) com biotina (20,0 mg L ⁻¹) preparada em metanol para a síntese proporção 1:20 (analito:monômero).	106
Figura 50 - Isoterma de adsorção da biotina (em intervalo de concentração de 2,0 até 100,0 mg L ⁻¹) para (a) MMIP semicovalente - 15,0 mg dos polímeros com interação por 60 min e no (b) MMIP não covalente - 10,0 mg dos polímeros com interação por 120 min.....	107
Figura 51 - Isoterma de ligação da biotina no MMIP semicovalente (15,0 mg de polímero com interação por 60 min) e no MMIP não covalente (10,0 mg de polímero	

com interação por 120 min) na faixa de concentração de $8,2 \times 10^{-6}$ até $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de biotina.....	109
Figura 52 - Ligação de biotina-HRP no MIP magnético por magneto ELISA; com intervalo de concentração de 5,0 até 800,0 ng mL ⁻¹ de biotina-HRP e 0,1; 0,3 e 0,5 mg mL ⁻¹ de MMIP. As barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas realizadas (n=3).....	111
Figura 53 - Comparação da capacidade de ligação da biotina-HRP no magneto MIP magneto NIP por magneto-ELISA, em intervalo de concentração de 5,0 até 800,0 ng mL ⁻¹ de biotina-HRP e 0,1; 0,3 e 0,5 mg mL ⁻¹ de MMIP e MNIP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas realizadas (n=3).....	112
Figura 54 - Ligação da biotina-HRP no MMIP por magneto-ELISA, na faixa de concentração de $1,12 \times 10^{-10}$ até $5,62 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ de biotina-HRP e uma quantidade fixa de 0,50 mg de MMIP. As barras de erro mostram o desvio padrão para as medidas (n = 3).....	113
Figura 55 - Ensaio de ligação do DNA amplificado de E. coli com dupla marcação nos polímeros magnéticos (0,55 mg de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração do amplicon de 0,52 até 207 ng mL ⁻¹ , e 1,35 µg de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3).....	114
Figura 56 - Ensaio de ligação do DNA amplificado de Salmonella com dupla marcação nos polímeros magnéticos (0,55 mg de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração do amplicon de 0,75 até 295 ng mL ⁻¹ , e 1,35 µg de antiFLU-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3).	115
Figura 57 - Efeito da concentração de anticorpo no sinal de absorvância no imunoenensaio magnético: 1,35 µg antiDIG-HRP na ligação do (a) amplicon marcado da E. coli em diferentes concentrações e (b) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 207 ng mL ⁻¹ ; 2,70 µg antiDIG-HRP na ligação do (c) amplicon marcado da E. coli em diferentes concentrações e (d) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 207 ng mL ⁻¹	116
Figura 58 - Efeito da concentração de anticorpo no sinal de absorvância no imunoenensaio magnético: 1,35 µg antiFLU-HRP na ligação do (a) amplicon marcado da Salmonella em diferentes concentrações e (b) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 295 ng mL ⁻¹ ; 2,70 µg antiFLU-HRP na ligação do (c) amplicon marcado da Salmonella em diferentes concentrações e (d) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 295 ng mL ⁻¹	117

Figura 59 - Tiras de fluxo lateral contendo a imobilização de duas linhas de polímeros (0,055 mg) preparados em diferentes solventes para avaliar o efeito dos mesmos na deposição do polímero.	118
Figura 60 - Diferença entre a capacidade de ligação de MIP para biotina-HRP antes e depois do processo de sonicação; usando 0,55 mg de polímero durante 1 min com amplitude de 70%.....	120
Figura 61 - Linhas contendo diferentes quantidade de MIP (0,025 e 0,050 mg) depositadas na membrana de nitrocelulose usando uma ponteira de 5 μ L com deposição manual.	120
Figura 62 - Imagens de MEV com ampliação de 6.00 K X da: (a) mambrana de nitrocelulose do fluxo vertical, (b) MIP depositado com etanol na membrana de VF, (c) MIP depositado com tampão TRIS na membrana de VF, (d) membrana de nitrocelulose do LF, (e) MIP depositado com etanol na membrana de fluxo lateral e (f) MIP depositado com solução tampão TRIS na membrana de LF.	121
Figura 63 - Esquema da reação colorimétrica utilizada para demonstrar a presença e eficiência do MIP no dispositivo de fluxo lateral: (a) amostra contendo BSA multiplamente biotinilada é adicionada na tira de amostra e, uma das biotinas interage com (b) biomolécula conjugada (nanopartículas streptAv-Au) na tira conjugada e (c) outra molécula de biotina dessa BSA interage com o MIP para biotina presente na linha teste.Na linha de controle o dendrímero biotinilado interage com a estreptavidina. Em ambas linhas é exibida coloração vermelha (resultado positivo).	123
Figura 64 - Reação colorimétrica para verificar a presença de polímeros imobilizados na membrana de nitrocelulose por diferentes métodos (MMIP à esquerda e MIP à direita, sendo 0,025 mg preparados em solução tampão TRIS) em reação com BSA biotina (3% m/v) e nananopartículas de streptAv-Au.	123
Figura 65 - Reação usando BSA-biotina 1% (m/v) e streptAV-AuNP (diluídas 8 vezes) em sistema LF contendo 0,025 mg (a) e 0,050 mg (b) de MIP e NIP.	124
Figura 66 - Reação realizada em sistema de LF utilizando 0,025 mg de polímeros, streptAv-AuNP (diluídas 8 vezes) e (a) BSA-biotina 3% (m/v) e (b) BSA-biotina 5% (m/v).	125
Figura 67 - Resultados obtidos para o sistema de fluxo lateral com solução tampão TRIS, biotina-HRP 250,0 ng mL ⁻¹ , e (a) 0,025 mg e (b) 0,050 mg de polímeros.	126
Figura 68 - Resultados obtidos para o sistema de fluxo lateral com solução tampão TRIS, biotina-HRP 500,0 ng mL ⁻¹ e (a) 0,025 mg e (b) 0,050 mg de polímeros.	126

Figura 69 - Resultados obtidos para o sistema de fluxo vertical com solução tampão TRIS, biotina-HRP 500,0 ng mL ⁻¹ , e (a) 0,025 mg e (b) 0,050 mg de polímeros.	127
Figura 70 - Avaliação do bloqueio da membrana (a) antes da reação com biotina-HRP 250,0 ng mL ⁻¹ e (b) após a reação; utilizando como bloqueadores (30 µL em cada tira de nitrocelulose) polietilenoglicol - PEG 400 1% (v/v), PEG 4000 1% (m/v), caseína 1% (m/v) e BSA 2% (m/v).....	127
Figura 71 - Análise da ordem de adição dos componentes da reação: (a) primeiro a adição de 30 µL de PEG 4000 1% (m/v) e depois deposição do MIP; (b) primeiro a deposição de MIP e depois adição de 30 µL de PEG 4000 1% (m/v).	128
Figura 72 - Avaliação do bloqueio da membrana no sistema de fluxo vertical usando 15 µL de PEG 4000 1% (m/v) após a reação com biotina-HRP 250,0 ng mL ⁻¹	129
Figura 73 - Reação da biotina-HRP (500,0 ng mL ⁻¹) usando solução tampão TRIS e membrana bloqueada com 30 µL de PEG 4000 1% (m/v) em direção a diferentes linhas de teste contntedo (0,050 mg de polímeros para cada uma delas): (a) MIP para biotina, (b) MIP para valerato de estradiol e (c) MIP para verde de metila.	129
Figura 74 - Resultados obtidos para análise de fluxo lateral na detecção do amplicon de E. coli (0,83 ng µL ⁻¹), utilizando 27,0 µg mL ⁻¹ de antiDIG-HRP. Branco possui a mesma concentração que o amplicon.....	130
Figura 75 - Resultados obtidos para análise de fluxo lateral na detecção do amplicon de E. coli (0,83 ng µL ⁻¹), utilizando 13,5 µg mL ⁻¹ de antiDIG-HRP. Branco possui a mesma concentração que o amplicon.....	131
Figura 76 - Resultados obtidos para análise de fluxo lateral na detecção do amplicon de Salmonella (1,2 ng µL ⁻¹), utilizando 13,5 µg mL ⁻¹ de antiFLU-HRP. Branco possui a mesma concentração que o amplicon.....	131
Figura 77 - Reação de seletividade realizada em fluxo lateral avaliando MIP e NIP frente à (a) biotina 4-fluoresceína 1,0 mg L ⁻¹ e (b) Atto 655-biotina 0,5 mg L ⁻¹ solubilizadas em solução tampão TRIS.....	132
Figura 78 - Fórmula estrutural química da (a) biotina 4-fluoresceína e (b) corante Atto 655.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos e funções de nanopartículas utilizadas como núcleo para MIP core-shell e exemplos de aplicação.....	31
Tabela 2 - Tempo de inserção dos comonômeros pró-hidrofílicos para síntese de diferentes RAMIP	44
Tabela 3 - Otimização da proporção do HEMA e GDMA utilizados na síntese do RAMIP	45
Tabela 4 - Quantidades de PEG (em mmol) e a proporção do mesmo em relação à massa de RAMIP (mantida constante em 100,0 mg) utilizadas para reação de recobrimento	46
Tabela 5 - Bandas do espectro de IV da biotina com as respectivas atribuições	65
Tabela 6 - Bandas do espectro de IV do ácido acrílico com suas respectivas atribuições.....	66
Tabela 7 - Bandas do espectro de IV do EGDMA com as respectivas atribuições...66	66
Tabela 8 - Bandas do espectro de IV para o HEMA e GDMA com as respectivas atribuições.....	68
Tabela 9 - Energia de ligação (E.L) e porcentagem atômica (% At.) obtidas pelos espectros de XPS dos componentes presentes nos diferentes materiais.....	86
Tabela 10 - Resultados da porosidade obtidos pelas isotermas de BET para as amostras de MMIP e suas modificações com diferentes concentrações BSA	90
Tabela 11 - Resultados da porosidade obtidos pelas isotermas de BET para as amostras de MMIP e suas modificações com diferentes concentrações de PEG.....	90
Tabela 12 - Porcentagem de proteína retida (em relação à concentração padrão adicionada inicialmente) para o MMIP e diferentes RAMIP@BSA	93
Tabela 13 - Porcentagem de proteína retida (em relação à concentração padrão adicionada inicialmente) pelos diferentes RAMIP@PEG	93
Tabela 14 - Atribuição das bandas com maior intensidade do espectro de IV da biotina	104
Tabela 15 - Atribuição das bandas com maior intensidade do espectro de IV da biotina alil éster.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN: 2,2'-azo-*bis*-(2-metilpropionitrila)

BET: Brunauer, Emmett, Teller

BSA: Albumina do soro bovino

DIG: Digoxigenina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSC: Calorimetria diferencial exploratória

E. coli: *Escherichia coli*

EGDMA: Etilenoglicol dimetacrilato

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FE-SEM: Microscopia eletrônica de varredura com campo de emissão

FLU: Fluoresceína

FT-IR: Infravermelho por transformada de Fourier

GDMA: Glicerol dimetacrilato

HEMA: 2-hidroxietil metacrilato

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HRP: *Horseradish peroxidase*

K_a : Constante de afinidade

K_d : Constante de dissociação

LF: Fluxo lateral

MeOH: Metanol

MIP: Polímero molecularmente impresso

MMIP: Polímero molecularmente impresso magnético

MPS: 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PEG: Polietileno glicol

RAMIP: Polímero molecularmente impresso com acesso restrito

RAMIP@BSA: Polímero molecularmente impresso recoberto com albumina bovina

RAMIP@PEG: Polímero molecularmente impresso recoberto com polietileno glicol

RMN: Ressonância magnética nuclear

SPE: Extração em fase sólida

SPE-LC: extração em fase sólida acoplada com cromatografia líquida

StreptAv-AuNP: nanopartículas de ouro modificadas com estreptavidina

TEOS: Tetraetilortosilicato

TG: Termogravimetria

TMB: tetrametil benzidina

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

v: Vibrações de estiramento

VF: Fluxo vertical

VSM: Magnetometria de análise vibrante

XPS: Espectroscopia de fotoelétrons de raios X

δ : Deslocamento químico (RMN)

δ : Vibrações de dobramento (FT-IR)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Biotina	25
1.2 Polímeros molecularmente impressos (MIP)	27
1.2.1 Polímeros molecularmente impressos magnéticos (MMIP)	30
1.2.2 Polímeros molecularmente impressos com acesso restrito (RAMIP)	32
1.3 Imunoensaios do tipo ELISA e Fluxo Lateral	34
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 RAMIP e MMIP semicovalente	39
3.1.1 Reagentes e soluções	39
3.1.2 Análises cromatográficas	39
3.1.3 Ensaios de otimização do MIP	40
3.1.4 Instrumentação	40
3.1.4.1 Caracterização das sínteses	40
3.1.4.2 Medidas analíticas	42
3.1.5 Procedimentos experimentais	43
3.1.5.1 Sínteses	43
3.1.5.1.1 Síntese das nanopartículas e do magneto MIP (MMIP) para biotina	43
3.1.5.1.2 Síntese do MMIP com acesso restrito (RAMIP)	44
3.1.5.1.3 Síntese do RAMIP recoberto com BSA (RAMIP@BSA)	45
3.1.5.1.4 Síntese do RAMIP recoberto com PEG (RAMIP@PEG)	45
3.1.5.1.5 Síntese covalente do complexo analito-monômero biotina aliléster	46
3.1.5.2 Síntese do MMIP semicovalente	47
3.1.5.3 Otimização das condições cromatográficas para análise da biotina	48
3.1.5.4 Estudos de otimização e avaliação da eficiência dos polímeros	48
3.1.5.4.1 Avaliação da capacidade de exclusão proteica pelos RAMIP magnéticos	48
3.1.5.4.2 Religação e seletividade	49
3.1.5.4.3. Avaliação de solvente, dosagem de massa, tempo, isoterma do RAMIP@PEG	49
3.1.5.4.4 Avaliação de solvente, dosagem de massa, tempo, isoterma do MMIP semicovalente	50

3.2 Ensaio de fluxo lateral e ELISA	50
3.2.1 Reagentes e soluções	50
3.2.1.1 Ensaio do tipo ELISA.....	50
3.2.1.2 Ensaio de fluxo lateral e fluxo vertical.....	51
3.2.2 Instrumentação	52
3.2.3 Procedimentos experimentais	52
3.2.3.1 Síntese do MIP e magneto MIP para biotina	52
3.2.3.2 Amplificação do DNA e dupla marcação das fitas	52
3.2.3.3 Ensaio ELISA.....	54
<u>3.2.3.3.1 Análise da peroxidase biotilada (biotina-HRP).....</u>	<u>54</u>
<u>3.2.3.3.2 Análise do DNA biotilado</u>	<u>55</u>
3.2.3.4 Ensaio de fluxo lateral e fluxo vertical.....	57
<u>3.2.3.4.1 Experimentos preliminares</u>	<u>57</u>
<u>3.2.3.4.2 Reação com BSA biotilada e nanopartículas de ouro de estreptavidina ..</u>	<u>58</u>
<u>3.2.3.4.3 Reação com biotina-HRP e TMB.....</u>	<u>59</u>
<u>3.2.3.4.4 Reação com DNA amplificado e duplamente marcado de E. coli e</u> <u>Salmonella.....</u>	<u>60</u>
<u>3.2.3.4.5 Reação com biotina 4-fluoresceína e Atto 655-biotina</u>	<u>60</u>
<u>3.2.3.4.6 Ensaio de seletividade.....</u>	<u>60</u>
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1 MMIP com acesso restrito (RAMIP)	61
4.1.1 Sínteses	61
4.1.2 Caracterizações	63
4.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	64
4.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) ...	74
4.1.2.3 Magnetometria de amostra vibrante (VSM).....	76
4.1.2.4 Análise termogravimétrica	79
4.1.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) de sólidos.....	83
4.1.2.6 Espectroscopia de fotoelétrons de Raio X (XPS)	85
4.1.2.7 BET	89
4.1.3 Otimização das condições cromatográficas para análise da biotina	90
4.1.4 Avaliação da capacidade de exclusão proteica	92
4.1.5 Avaliação da eficiência dos polímeros com acesso restrito	95
4.1.5.1 RAMIP@BSA	95

4.1.5.2 RAMIP@PEG.....	97
<u>4.1.5.2.1 Isoterma de adsorção para o RAMIP@PEG</u>	<u>99</u>
4.2 MMIP semicovalente	101
4.2.1 Síntese e caracterização do complexo-analito monômero.....	101
4.2.2 Ensaios de otimização do MMIP semicovalente: avaliação do solvente, dosagem de massa e tempo de interação.....	104
4.2.3 Isoterma de adsorção e cálculo da constante de afinidade (K_a).....	107
4.3 Aplicação em sistemas de ELISA e fluxo lateral (LF).....	110
4.3.1 Magneto ELISA	110
4.3.1.1 Avaliação da capacidade de ligação do MMIP pela biotina-HRP.....	110
4.3.1.2 Cálculo da constante de afinidade.....	112
4.3.1.3 Avaliação da ligação entre os amplicons de DNA marcados e o MMIP	114
4.3.2 Fluxo lateral e fluxo vertical	117
4.3.2.1 Imobilização e fluxo utilizando MIP magnético	117
4.3.2.2 Experimentos de sonicação e método de deposição	119
4.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	121
4.3.2.4 Reação com BSA biotinilada e nanopartículas de ouro modificadas com estreptavidina (streptAv-AuNP).....	122
4.3.2.5 Reação com biotina-HRP.....	125
4.3.2.6 Ensaio de seletividade.....	129
4.3.2.7 Detecção dos amplicons de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>	130
4.3.2.8 Reação com moléculas fluorescentes: biotina 4-fluoresceína e Atto 655-biotina.....	131
5 CONCLUSÕES	134
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	135
REFERÊNCIAS.....	136

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biotina

As vitaminas são substâncias orgânicas indispensáveis ao funcionamento do organismo humano, atuando em diversas rotas metabólicas na forma de cofatores. Uma vez que a grande maioria das vitaminas não é sintetizada por nenhuma via anabólica e aquelas que são produzidas não atendem à demanda, sua obtenção é feita principalmente por meio dos alimentos. (1,2)

As vitaminas são divididas em dois grandes grupos: lipossolúveis (as quais são A, D, E e K) e hidrossolúveis (complexo B e vitamina C). As vitaminas lipossolúveis compartilham algumas funções como atuar na regulação celular. Já as vitaminas hidrossolúveis executam papel de coenzimas ou precursores de coenzimas, sendo fundamentais para o metabolismo e, devido a sua importância, estão entre as vitaminas mais estudadas. (3)

O complexo B é constituído pelo maior número de vitaminas; as quais possuem estrutura química e funções muito diferentes; sendo elas tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, ácido pantotênico, biotina, ácido fólico e cobalamina. (3)

A biotina - ou vitamina B7 - (Figura 1) tem estrutura química composta por um anel imidazol ligado a um anel tetrahidrotiofeno, o qual contém cadeia lateral contendo grupo carboxila. A estrutura química da biotina é constituída por 3 carbonos assimétricos, formando 8 estereoisômeros; sendo que apenas a d-(+)-biotina possui atividade biológica. (4) Dentre os estudos realizados com as vitaminas do complexo B a biotina atraiu atenção devido algumas características diferenciadas que ela apresenta.

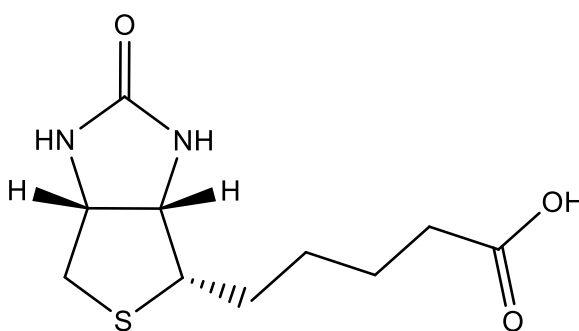


Figura 1 - Fórmula estrutural química da biotina.
Fonte: autor do trabalho.

A biotina é essencial no metabolismo dos lipídeos, quebra de aminoácidos, recomposição de intermediários metabólicos (como na gliconeogênese) e algumas funções nucleares. Além disso, ela é uma proteína que atua como grupo prostético na fixação do CO₂ para quatro enzimas: acetil-CoA carboxilase, propionil-CoA carboxilase, piruvato carboxilase e β-metilcrotonil carboxilase.(5)

Uma das características mais notáveis e importantes da biotina é a elevada afinidade que ela apresenta pela avidina (uma glicoproteína tetramérica obtida da clara do ovo) ou estreptavidina (composto análogo da avidina obtido da bactéria *Streptomyces avidinii*) – a ligação entre elas exibe umas das maiores constantes de afinidade da natureza, $K_a = 1,0 \times 10^{15} \text{ L mol}^{-1}$ (sendo considerada a ligação não covalente mais forte que existe). A alta afinidade permite que tais proteínas juntamente com a biotina funcionem como uma ferramenta importante em aplicações biológicas e diagnósticos. (6)

A ideia principal de aplicação é que a biotina acoplada com moléculas de baixo ou alta massa molar ainda pode ser reconhecida pela avidina, tanto em sua forma nativa quanto derivatizada. Assim, usando o complexo mediador biotina-avidina há um excelente aumento no nível de sensibilidade na análise de diferentes moléculas; o que permitiu o desenvolvimento de imunoenaios, sensores de bioafinidade e agentes de imobilização utilizando essa técnica. (7,8)

Wu e colaboradores (9) utilizaram eletroforese 2-D em gel para medir o dano oxidativo proteico pela quantificação de carbonilas proteicas (produtos gerados pela oxidação de proteínas). Para tanto, foi realizada reação de marcação das carbonilas proteicas com biotina-hidrazida. A separação dos produtos foi realizada no gel eletroforético e após revelação realizou-se a detecção utilizando-se o mediador estreptavidina-HRP.

Zhu et. al. (10) desenvolveram um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche para detecção de quatro diferentes antígenos, sendo que foram utilizados os métodos de reação de hibridização da cadeia para amplificação dos nucleotídeos dos antígenos e imobilização de nanopartículas contendo biotina-estreptavidina para aumentar o sinal de detecção.

Erdossy et al. (11) relatam o uso de polímeros impressos molecularmente (MIP) para o reconhecimento seletivo de proteínas, sendo que ocorreu uma maior discriminação da avidina e análogos frente à outras proteínas quando utilizado um

polímero impresso contendo sítios de ligação para biotina se comparado com um polímero impresso diretamente para avidina.

Entre os diversos tipos de materiais utilizados atualmente para o reconhecimento seletivo de moléculas, como no exemplo citado anteriormente, os polímeros molecularmente impressos tem mostrado resultados altamente satisfatórios.

1.2 Polímeros molecularmente impressos (MIP)

Os MIP (*Molecularly Imprinted Polymers*) são polímeros que realizam o reconhecimento específico por formarem cavidades que são complementares em tamanho e forma ao analito; sendo denominados também de polímeros biomiméticos por imitarem o sistema de reconhecimento biológico baseado em afinidade, como o sistema antígeno/anticorpo. (12)

O reconhecimento molecular do MIP é baseado nos sistemas biológicos; contudo, os polímeros apresentam diversas vantagens em relação aos biosistemas: baixo custo, fácil preparação (podem ser sintetizados de diferentes modos de acordo com a necessidade), alta resistência mecânica e térmica e podem ser armazenados por anos sem perda de eficiência. (12)

Em linhas gerais, os MIP são sintetizados pelo método conhecido como polimerização em “bulk” (com a formação de bloco polimérico), sendo esta realizada em sistema homogêneo na ausência de oxigênio sob fluxo de N₂ ou Ar e induzida com aquecimento ou radiação UV. O oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, pois impede a reação de polimerização radicalar. (13) Por meio da interação do analito por meio de ligação covalente ou não com as moléculas do monômero funcional, é formado inicialmente o complexo analito-monômero funcional. Posteriormente, ao ser adicionado no meio reacional um monômero estrutural que promove ligações cruzadas, será formada uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar em meio desaerado. (12)

O processo de moldagem molecular está exemplificado na Figura 2. De modo análogo ao exibido, é sintetizado um polímero não impresso (*Non Imprinted Polymer* – NIP) como material de controle. O NIP é sintetizado sem a presença da molécula molde e, portanto, não possui cavidades seletivas.

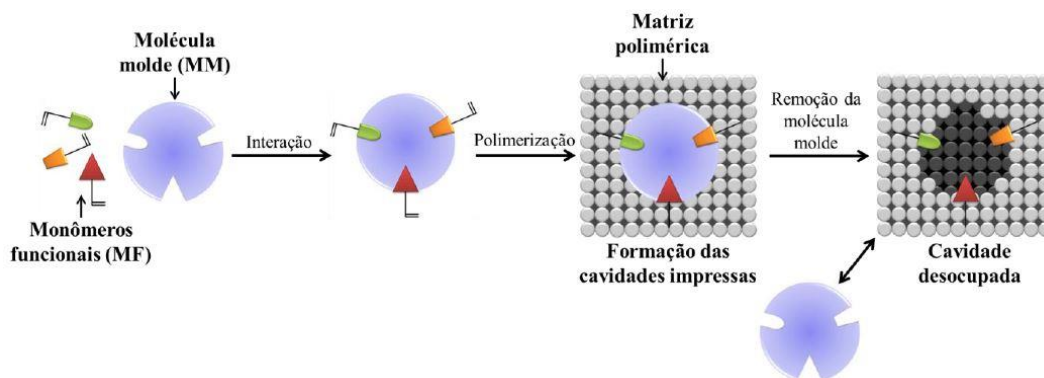


Figura 2 - Etapas da síntese do MIP.

Fonte: Foguel, M.V. (14)

Diferentes metodologias são aplicadas para obtenção dos polímeros. A polimerização em “bulk”, embora simples, apresenta algumas desvantagens como impressão irregular dos sítios seletivos e tamanho de partículas não-uniformes. Devido a estas limitações, outros métodos de preparo dos MIP são utilizados com o intuito de produzir partículas com tamanhos uniformes, sendo, dentre estas, mais aplicadas a polimerização por suspensão (15) e por precipitação (16)

Na polimerização por suspensão, a reação ocorre em dois solventes com polaridades opostas. A primeira etapa da síntese é a solubilização de todos os reagentes necessários para a reação (monômero, analito, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar) num solvente orgânico apolar. Em seguida, a mistura reacional é adicionada em água contendo um agente surfactante, cuja função é evitar a coagulação das gotas dos monômeros durante o processo. (15)

Análogo ao método de polimerização em “bulk”, outro método de preparo de MIP é o de polimerização por precipitação, onde, volumes superiores de solventes são empregados a fim de impedir a formação de uma pasta polimérica. Geralmente nesse método utiliza-se quantidades de solvente cerca de cinco vezes maiores do que no método “bulk”.

Uma vantagem desse método é o fato de não ser necessário o uso de nenhum tipo de estabilizante para evitar a coagulação das gotas de monômero. (17,18) A formação de partículas poliméricas a partir do método de polimerização por precipitação ocorre devido ao crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação, o que torna o polímero cada vez menos solúvel no meio.

São descritos vários processos de moldagem molecular, permitindo gerar locais com elevada capacidade e especificidade de reconhecimento molecular, que se

distinguem pela natureza da ligação estabelecida com a molécula-molde. A organização tridimensional dos grupos funcionais dos MIP é obtida pelo estabelecimento de uma ligação covalente ou não covalente entre os monômeros funcionais e a molécula-molde durante o processo de polimerização. (19)

Um dos primeiros exemplos de moldagem molecular de polímeros orgânicos reticulados descritos foi por Wulff e Sarhan, (20) tendo por base uma estratégia de ligação covalente. Nesse método é realizada uma ligação covalente entre o analito e o monômero funcional formando um complexo analito-monômero; o qual é polimerizado. O analito é removido utilizando-se uma reação de clivagem química, deixando a cavidade seletiva livre. Posteriormente, no processo de reconhecimento molecular, volta a ocorrer o estabelecimento de uma ligação covalente entre analito e o polímero. (21)

A abordagem covalente tem a vantagem de apresentar uma estequiometria conhecida entre o monômero funcional e a molécula-molde, formando uma quantidade homogênea de sítios de reconhecimento. Um dos inconvenientes deste método relaciona-se com o número limitado moléculas que permitam realizar ligações covalentes que permitam a formação do complexo analito-monômero; além disso, são necessários esforços consideráveis na síntese da própria molécula-molde. (21)

Assim, outro método de impressão utilizado é o semicovalente. Ele é assim denominado porque na etapa de polimerização é usada uma molécula molde que estabelece uma ligação covalente com os monômeros funcionais e, na etapa de religação, é estabelecida uma ligação de natureza não covalente. (22)

Uma das maiores vantagens do método semicovalente é que ele mantém a alta seletividade do MIP com impressão covalente e a religação do analito é realizada de maneira mais rápida e fácil. Esta abordagem comporta algumas limitações; relacionadas com o processo de hidrólise da molécula-molde, que, frequentemente não é direto, e com o fato de que durante a religação os requisitos estereoquímicos de um determinado grupo funcional podem ser muito diferentes dos locais de reconhecimento. (23)

O terceiro e último método de impressão utilizado na moldagem do MIP é a impressão não covalente. Neste método o analito é misturado diretamente com o monômero funcional, sendo que a interação entre ambos é não covalente – por exemplo, ligação de hidrogênio, interação iônica, etc. (24) Esta abordagem é particularmente interessante pela sua simplicidade, permitindo a obtenção de MIP que

apresentam uma afinidade elevada para o seu alvo e uma ampla aplicabilidade. Assim, usando essencialmente o mesmo procedimento e mudando a molécula alvo, podem ser desenvolvidos MIP com capacidade para reconhecer uma grande variedade de compostos. (25,26)

No entanto, o método não covalente apresenta algumas dificuldades significativas no processo de moldagem molecular. A primeira diz respeito a heterogeneidade dos locais receptores produzidos, uma vez que ela decorre do excesso de monômero funcional necessário se encontrar distribuído ao redor da matriz polimérica, fora das cavidades receptoras. Este aspecto conduz à existência de muitos pontos de interação não específicos entre as moléculas do analito e o polímero. (26)

Portanto, devido aos diversos métodos de obtenção das partículas e impressão molecular, os MIP podem ser sintetizados para diferentes tipos de moléculas (27–30) e com aplicação nas mais variadas áreas: cromatografia, (31) extração em fase sólida, (32) sensores, (33,34) catálise, (35) e liberação de fármacos. (36,37)

Os polímeros sintetizados pelos métodos citados anteriormente, embora muito eficientes, apresentam alguns problemas na eficiência de reconhecimento. As partículas formadas possuem as cavidades específicas distribuídas de maneira não homogênea e no interior da partícula, o que diminui a acessibilidade do analito na cavidade do MIP. (28)

Assim, um dos modos encontrados de minimizar os inconvenientes mencionados foi pela junção dos polímeros impressos com nanopartículas. Essa união gerou materiais do tipo *core-shell* no qual o núcleo é formado por nanopartículas sólidas recobertas com uma camada de MIP. (38)

1.2.1 Polímeros molecularmente impressos magnéticos (MMIP)

Nanopartículas são sólidos com tamanho de até 100 nm e que apresentam propriedades características do seu tamanho, como elevada área superficial em relação ao seu volume – o que permite modificações em sua superfície. (39)

Os diferentes tipos de nanopartículas mais comumente utilizadas como núcleo para o MIP *core-shell* (ou seja, um núcleo - *core* - composto por uma nanopartícula recoberta por uma fina camada de MIP - *shell*), bem como suas funções e aplicações podem ser vistas na Tabela 1. (40)

Tabela 1 - Tipos e funções de nanopartículas utilizadas como núcleo para MIP core-shell e exemplos de aplicação

Composição do núcleo	Função do núcleo	Analito	Aplicação	Referências
Magnetita	Separação magnética	Cloranfenicol; Ácido protocatecuico	SPE	(41,42)
Sílica	Controle da forma	β -Estradiol; dapsona	SPE; Sensor	(43,44)
Divinilbenzeno e/ou poliestireno	Dispersão das partículas, controle da forma	Cafeína, (S)-Propranolol, (S)-Atenolol; Tiabendazol	SPE; Cromatografia	(45,46)
Quantum Dots	Fluorescência	Citocromo C; p-nitrofenol	Sensor óptico	(47,48)
Ouro	Ganho de sinal em RAMAN e condutividade elétrica	Bisfenol A	Sensor	(49)

Fonte: adaptado de Pupin, R. R. et al. (40)

Dos materiais que podem ser aplicados como núcleo para o MIP encontram-se as nanopartículas magnéticas, dentre as quais os óxidos de ferro são os mais utilizados, devido às suas propriedades como superparamagnetismo e alta estabilidade. (50) A maghemita (γ - Fe_2O_3) e a magnetita (Fe_3O_4) são os óxidos com maior uso por apresentarem todas as propriedades já citadas e, ademais, por possuírem baixa toxicidade e biocompatibilidade comprovadas. (51)

A síntese de nanopartículas de magnetita pode ser realizada de diversas maneiras, sendo os métodos mais comumente reportados a coprecipitação, (52) hidrotérmico (53), sonicação (54) e poliol.(55) A coprecipitação é uma das sínteses amplamente utilizadas, devido à sua facilidade e rapidez; método no qual normalmente são utilizados sais de cloreto de ferro (II) e ferro (III) que precipitam em meio alcalino a magnetita. (56)

Entre as diversas vantagens apresentadas por essas partículas, as principais e mais importantes são suas características superficiais que permitem sua fácil encapsulação e modificação para protegê-las da degradação, conservando sua resposta magnética. (57) As modificações incluem desde simples funcionalizações na superfície com diferentes grupos funcionais até moléculas orgânicas (surfactantes, polímeros e componentes biológicos). (56)

A modificação dos núcleos magnéticos se fez necessária devido a razões como aglomeração das nanopartículas ou perda da camada de polímero, o que inviabiliza a utilização do material. Agentes de silanização, como tetraetilortosilicato (TEOS), tem sido extensivamente aplicados no recobrimento da magnetita pelo método de sol-gel. (58,59) A camada de silano formada possui alta densidade de grupos funcionais terminais, permitindo assim diversos tipos de reação de acoplamento covalente do polímero em sua superfície, reduzindo o problema lixiviação da camada polimérica. Mais além, a funcionalização com sílica permite grande biocompatibilidade e baixa toxicidade das nanopartículas.(60)

Deste modo, ao se combinar as melhores propriedades do material magnético com as do MIP, têm sido reportados os MIP magnéticos, que consistem em nanopartículas magnéticas decoradas/modificadas com polímeros molecularmente impressos. Ao contrário do MIP convencional, o MIP magnético possui a vantagem de ter uma elevada relação entre área superficial e volume devido ao seu núcleo ser composto por uma nanopartícula; o que torna as cavidades impressas mais acessíveis ao analito; melhorando a cinética de ligação. (61)

Nos métodos analíticos de separação, o polímero magnético é utilizado principalmente em extrações do tipo SPE; atuando como a fase sólida. A grande vantagem é que ao invés de se utilizar o cartucho (o qual demanda necessário trabalho para empacotamento, ativação das partículas, etc), o MIP magnético é aplicado diretamente na amostra, sem a necessidade de tratamento prévio da mesma. Além disso, o polímero é fácil e rapidamente separado da solução de análise pela aplicação de um campo magnético externo, como um ímã, por exemplo.(62)

Foram desenvolvidos diversos tipos de MIP magnético para análises de matrizes complexas como águas de rio contendo diferentes contaminantes - corantes alimentares,(63) antibióticos,(64) herbicidas; (65) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) como método de detecção.

1.2.2 Polímeros molecularmente impressos com acesso restrito (RAMIP)

O termo materiais de acesso restrito (do inglês *Restricted Access Materials* - RAM) surgiu na década de 1990, com o desenvolvimento de materiais adsorventes para cromatografia que realizassem a separação de determinadas moléculas,

permitindo a injeção direta de matrizes biológicas em sistemas on-line de extração em fase sólida acoplada com cromatografia líquida (SPE-LC). (66)

O acesso restrito destes materiais provém de uma barreira de difusão física (por meio do tamanho dos poros) e uma barreira química (modificação da superfície). A barreira química colabora na exclusão por tamanho, consistindo no recobrimento da partícula com um polímero hidrofílico ou proteínas, evitando assim a adsorção de macromoléculas biológicas. (66)

No contexto do acesso restrito, os MIP chamaram a atenção pelas suas cavidades seletivas que são adequadas ao tamanho do analito; excluindo as demais moléculas (barreira de difusão física). Por conseguinte, muitos trabalhos foram desenvolvidos a partir da construção de colunas contendo MIP como material tipo RAM e acoplados com cromatografia líquida (LC). (67)

No entanto, o contato do MIP com a fase móvel aquosa, foi um fator crítico a ser analisado porque, como reportado, ocorrem alguns inconvenientes principais com o uso desses polímeros em soluções aquosas. Nesse meio ocorrem ligações não específicas e há também ligações hidrofóbicas entre o meio e as moléculas, o que diminui a seletividade do material e, em contato com moléculas como proteínas e lipídeos (de amostras biológicas), podem adsorver fortemente na superfície do polímero, reduzindo suas propriedades de reconhecimento. (68,69)

Assim, começaram a surgir pesquisas voltadas para a modificação da superfície dos MIP, de forma que eles atuem no meio aquoso e mantenham sua seletividade e, mais além, façam a exclusão de macromoléculas. Dessa forma, surgiram os MIP com acesso restrito (*Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers* - RAMIP).

Os RAMIP podem ser preparados de diversas maneiras. A metodologia mais comum utilizada é a adição de comonômeros pró-hidrofílicos (que contém grupos hidroxilas livres) no processo de síntese escolhido. Dessa forma, o MIP hidrofílico irá realizar a exclusão de macromoléculas como proteínas (normalmente retidas pela superfície hidrofóbica do polímero convencional) e diminuir os problemas de ligações não-específicas. (70,71)

Além dos grupos hidrofílicos, também podem ser imobilizadas moléculas (por exemplo, proteínas) na superfície do polímero, com o mesmo intuito de realizar a exclusão molecular. (72)

1.3 Imunoensaios do tipo ELISA e Fluxo Lateral

Os imunoensaios são um dos métodos utilizados para análise de bactérias, vírus e fungos; os quais baseiam-se no sistema de reconhecimento antígeno-anticorpo. (73) Imunoensaios do tipo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) estão entre os mais comuns e, por causa da sua versatilidade por diferentes tipos de testes (por exemplo, direto, sanduíche, etc.), o método tem sido utilizado extensivamente pelos anos. (74)

Na década de 1960 foram reportados os primeiros imunoensaios com o uso de moléculas fluorescentes ou com ligante radioativo, sendo os primeiros experimentos realizados nessa área. (75) Na década de 1970 imunoensaios enzimáticos – como ELISA – foram desenvolvidos baseados nos mesmos princípios dos imunoensaios utilizando-se enzimas ao invés de moléculas radioativas como marcadores. (74,75)

Uma vez que a técnica mostrou ótimos resultados, a mesma foi aperfeiçoada pelas décadas e, devido à alta sensibilidade e seletividade, o ensaio tem sido usado até atualmente em diferentes aplicações: monitoramento ambiental, (76) controle de qualidade alimentar, (77) determinação de estresse proteico, (78) quantificação de hormônio, (79) análises para diagnósticos – HIV, Ebola (80) e Influenza (81) - entre outras.

O ensaio ELISA emprega anticorpos imobilizados geralmente em uma placa de poliestireno com número variável de poços. O método pode ser dividido em 8 passos principais, os quais são: (i) ativação do poço, (ii) lavagem da placa, (iii) imobilização dos anticorpos, (iv) lavagem para remover o excesso de anticorpos, (v) incubação com antígeno/analito, (vi) incubação com anticorpo marcado com molécula reportadora (para quantificação), (vii) lavagem e, então (viii) adição do substrato cromogênico e leitura óptica. (82)

Outra estratégia recente para análise qualitativa e semiquantitativa de diferentes analitos são imunoensaios de fluxo lateral (do inglês *Lateral Flow immunoassays* - LF). São sistemas de análise do tipo *Point of Care Tests* (POCT), ou seja, para uso em qualquer local; sem a obrigatoriedade de estar em um laboratório. Isso permitiu que os ensaios de fluxo lateral se tornassem popular em análises clínicas, de alimentos e diagnósticos médicos devido à rapidez na obtenção dos resultados, alta seletividade e estabilidade, baixo custo e fácil manuseio. (83)

O dispositivo de fluxo lateral basicamente consiste, como exibido na Figura 3a, em um cartão para suportar todos os componentes, um compartimento para inserir a amostra, um compartimento seguido à tira de amostra (tira conjugada) onde são adicionadas as moléculas para o bioreconhecimento que se ligam ao analito (moléculas marcadoras), membrana de nitrocelulose na qual flui a amostra e no final uma tira contendo o compartimento de absorção da amostra (tira adsorvente). (83)

A membrana de nitrocelulose, como mostrado na Figura 3b, contém duas linhas diferentes; a primeira (linha teste ou test line) é composta pelos anticorpos específicos contra o analito e a segunda (linha controle – control line) contém as partículas bioativas contra as moléculas marcadoras. Depois da reação onde a amostra contendo o analito flui pela tira, e nas linhas de teste e controle há uma mudança de coloração; a qual é indicativo da reação (resultado positivo). Se apenas a linha controle muda a coloração obtêm-se um resultado negativo e se apenas a linha teste muda a coloração é um indicativo de problema na reação ou no dispositivo. (84)

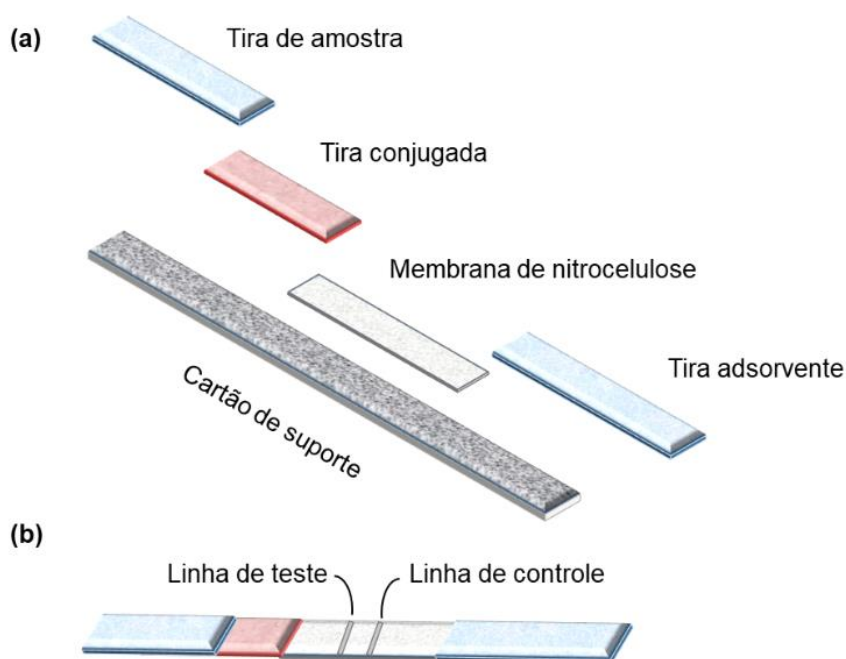


Figura 3 - (a) Componentes da tira de fluxo lateral e (b) visão geral de uma tira de fluxo lateral montada e contendo as linhas de teste e controle.

Fonte: autor do trabalho.

Os dispositivos de fluxo lateral podem ser divididos em três zonas principais: zona amostra/conjugada, zona teste e zona reservatório.

A amostra, bem como a solução tampão de análise e outros componentes, são aplicados na zona de amostragem que consiste em uma tira de amostra (sample pad) cuja constituição pode ser de nitrocelulose, nylon ou fibra de vidro. O segundo componente é a tira conjugada, cuja constituição é a mesma da tira de amostra, sendo a tira conjugada recoberta com quantidades conhecidas de um marcador (por exemplo, anticorpo ou proteína) específico ao analito. O marcador é acoplado a nanopartículas de látex ou metais coloidais como o ouro; cujas colorações dessas partículas são responsáveis pelo desenvolvimento de uma linha visível na zona de teste. (85)

A membrana da zona de teste, geralmente constituída por nitrocelulose ou nylon, é a zona onde um segundo marcador específico ao analito é imobilizado em uma faixa estreita (linha de teste) na membrana. Deste modo, se o analito estiver presente na amostra, o marcador presente na linha se unirá ao analito formando uma linha visível que indica a presença positiva da molécula de interesse. A intensidade da cor que aparece na linha de teste é proporcional à concentração do analito presente. Qualquer molécula conjugada (da tira conjugada) não ligada migrará pela membrana e continuará até a linha de controle, na qual um anticorpo específico ao analito é imobilizado. Assim, a molécula conjugada irá se ligar ao anticorpo específico formando uma linha visível, a qual é denominada de linha de controle e permite ao analista saber que o ensaio ocorreu como esperado. (85)

A zona do reservatório (adsorbent pad) é composta por celulose e possui a função de absorver toda solução tampão adicionada para análise e os demais componentes que não reagiram; sendo de extrema importância para impedir que os reagentes e solventes voltem à tira e ocasionem erros no experimento. (85)

Os dispositivos de LF tem sido aplicados em análises quali e semi quantitativas para avaliar contaminantes alimentares,(86) antibióticos,(87) biomarcadores em diagnósticos, (88) vírus (89,90) e bactérias (91,92); entre outras aplicações.

Similar aos dispositivos de LF há dispositivos de fluxo *vertical* (do inglês *Vertical Flow* - VF), os quais possuem princípio e aplicações semelhantes ao LF. A diferença está em como o sistema é construído. Os reagentes para reação (anticorpos, analitos, marcadores, etc.) são colocados diretamente na nitrocelulose e fluem, por efeito da gravidade, pela membrana até o compartimento absorvente que está embaixo da nitrocelulose. (73)

Devido à versatilidade e eficiência dos imunoenaios, como os citados anteriormente, por exemplo, os mesmos são amplamente empregados nas mais diversas análises. No entanto a produção de anticorpos demanda elevado tempo e alto custo. Dessa forma, os MIP tem sido utilizados como uma alternativa mais econômica para ensaios desse tipo. (93)

Para teste do tipo ELISA, a literatura reporta uma gama restrita de trabalhos nos quais MIP substituem os anticorpos como elementos de reconhecimento. (93–95) No caso dos ensaios de fluxo lateral, até o presente momento, não são reportados trabalhos a respeito do uso de MIP nesses sistemas.

Portanto, diante da versatilidade dos polímeros impressos, a presente dissertação exhibe as pesquisas desenvolvidas na síntese de diferentes MIP para biotina visando variadas aplicações. Inicialmente foi sintetizado, caracterizado e avaliado um RAMIP magnético para biotina modificado com diferentes agentes visando avaliar sua capacidade de exclusão proteica. Também foi sintetizado um MMIP para biotina utilizando as técnicas de impressão não covalente e semicovalente, com a realização de ensaios para verificar e comparar a performance desses polímeros. Finalmente, o MMIP para biotina foi aplicado em ensaios de magneto ELISA e no desenvolvimento de ensaios biomiméticos do tipo fluxo lateral (LF) realizando análises de moléculas biotiniladas e DNA biotinilado.

2 OBJETIVOS

Síntese, caracterização e otimização de diferentes MIP para biotina: convencional/magnético, não covalente/semicovalente e com acesso restrito; visando a aplicação em ensaios biomiméticos do tipo ELISA e Fluxo Lateral (LF).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 RAMIP e MMIP semicovalente

3.1.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para a síntese do Magneto-MIP (MMIP) convencional foram biotina, ácido acrílico, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2'-azo-bis-2-metilpropionitrila (AIBN); todos fornecidos pela Sigma-Aldrich®. Os solventes utilizados para síntese e remoção da molécula molde foram metanol (Panreac®) e ácido acético glacial (Synth®).

Para as modificações na superfície do MMIP foram utilizados 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), glicerol dimetacrilato (GDMA), poli(etilenoglicol) bis(carboximetil) éter (PEG) e albumina de soro bovino (BSA); todos fornecidos pela Sigma-Aldrich®. Para a modificação com PEG utilizou-se cloreto de tionila (Sigma-Aldrich®) e diclorometano (Synth®). Na reação com BSA foram utilizados glutaraldeído 25% (m/v) e borohidreto de sódio, ambos da Sigma-Aldrich®.

Para síntese e modificação das nanopartículas magnéticas os reagentes utilizados foram $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich®); NH_4OH (Synth®); tetraetilortosilicato (TEOS) da Acróis®; 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato (MPS) Sigma-Aldrich®, etanol e tolueno, ambos fornecidos pela Synth®.

A síntese do complexo analito-monômero para síntese do MMIP semicovalente foi realizada com biotina, álcool alílico, ácido p-toluenossulfônico (p-TSA); todos fornecidos pela Sigma-Aldrich®. O solvente utilizado no meio reacional foi tolueno (Synth®)

3.1.2 Análises cromatográficas

Todas as medidas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foram realizadas utilizando-se metanol e acetonitrila grau HPLC, ambos da Panreac®. Para otimização da fase móvel, a solução tampão fosfato foi preparada contendo fosfato de sódio monobásico anidro e fosfato de sódio dibásico anidro; ambos da Synth®. Para o preparo de fase móvel aquosa acidificada, utilizou-se ácido fosfórico (Mallinckrodt®).

A cromatografia de adsorção em coluna foi realizada utilizando-se sílica-gel (230-400 mesh, Acros). As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas obtidas a partir de cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F254 (Merck®). A visualização ocorreu pela revelação com solução etanoica de ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich®), seguido de aquecimento. Ambas cromatografias tiveram como eluente diclorometano (Synth®) e metanol (Panreac®)

3.1.3 Ensaios de otimização do MIP

Para os estudos de ligação dos MIP sintetizados foram preparadas soluções de biotina em água destilada (obtida pelo Milli-Q *Ultra Pure Water System* da marca Millipore®), metanol, acetonitrila (ambos Panreac®) e misturas desses solventes.

A otimização dos MIP sintetizados (estudo de dosagem de massa, tempo de interação e isoterma) foram realizadas em metanol. Para avaliação da seletividade foram analisadas biocitina e tetraciclina, ambas fornecidas pela Sigma-Aldrich®.

Para avaliação da capacidade de exclusão proteica dos polímeros preparou-se solução de diferentes concentrações de BSA em solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹.

3.1.4 Instrumentação

3.1.4.1 Caracterização dos produtos obtidos nas sínteses

Todos os materiais sintetizados, bem como as modificações, foram caracterizados por diferentes técnicas.

Para as medidas de infravermelho por transformada de Fourier foi empregado um espectrômetro FT-IR Vertex 70 da Bruker, com uma fonte de laser de HeNe e detector DLaTGS, utilizando uma faixa de leitura de 4000 a 400 cm⁻¹. A análise foi realizada diretamente nas amostras sólidas, no modo de refletância total atenuada (do inglês *Attenuated Total Reflectance* – ATR).

A morfologia dos polímeros foi observada utilizando o microscópio eletrônico de varredura com campo de emissão (FE-SEM; Jeol JSM 6330F). Os polímeros foram

sonicados em álcool isopropílico por 10 min e recobertos com carbono, para posterior análise no microscópio.

A porosidade do MIP foi avaliada pela técnica de Brunauer, Emmett e Teller (BET) medindo-se a sorção de N_2 utilizando-se o equipamento Micromeritics GEMINI VII. As amostras foram pré-tratadas em vácuo por 3 h e degaseificadas com hélio a 250 °C. A área superficial foi calculada de acordo com o método BET, o volume de poros calculado a partir da adsorção em $P/P_0 = 0,98$ e o tamanho dos poros pelo método Barrett-Joyner-Halenda (do inglês *BJH Method*).

A estabilidade térmica e composição dos materiais sintetizados foi avaliada por análise térmica, utilizando termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial (TG-DSC). As curvas TG foram obtidas em um sistema TG-DSC STARE, da Mettler Toledo. Utilizou-se mistura de ar comprimido e N_2 em uma vazão de 50 mL min^{-1} como gás de purga. A razão de aquecimento foi de 10 °C min^{-1} com 10,0 mg de massa das amostras. As curvas DSC foram obtidas usando DSC Q10 da TA Instruments®. A condição de gás de purga foi a mesma utilizada para a TG, com uma razão de aquecimento de 5 °C min^{-1} , com 10,0 mg de massa de amostra.

Para a caracterização magnética foi usado o equipamento LakeShore VSM série 7300 do Centro Atômico Bariloche, Divisão de Ressonâncias Magnéticas, Argentina.

A determinação da composição dos materiais, bem como análise da estrutura das ligações química foi realizada por análise de XPS. Utilizou-se um espectrômetro comercial UNI-SPECS UHV System com pressão menor que 5×10^{-7} Pa. A linha $Mg K\alpha$ foi utilizada ($h\nu = 1253,6$ eV) como fonte de ionização e a energia de passagem do analisador ajustada para 10 eV. A composição em porcentagem atômica da camada da superficial (<5 nm) foi determinada pelas proporções relativas das áreas dos espectros. A escala da energia de ligação dos espectros foi corrigida usando a componente de hidrocarbonetos fixa em 285,0 eV.

Pela análise de RMN de sólidos obteve-se espectros de 1H e ^{13}C utilizando espectrômetro Bruker Avance III 400WB HD (9,4 T) com sonda CP/MAS DVT Triple Resonance Low Gamma de 4 mm, com intervalo de frequência de ^{39}K até 2H , operando na faixa de temperatura de -120 °C até 150 °C; e sonda CP/MAS DVT Triple/Double Resonance com dupla ressonância BB/ 1H , com intervalo de frequências (BB) de ^{15}N a ^{31}P .

A síntese do template-monômero foi acompanhada empregando-se RMN, sendo que para obtenção dos espectros de ^1H foi utilizado espectrômetro Bruker: Fourier 300 MHz (7.0 T) e espectrômetro Bruker: Avance III 600 MHz HD (14,1 T). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de clorofórmio e dimetilsulfóxido (7,26 e 2,5 ppm, respectivamente, para o RMN de ^1H). A multiplicidade dos sinais dos hidrogênios nos espectros foi indicada segundo a convenção: d (duplete), dd (duplo duplete) e m (multiplete).

3.1.4.2 Medidas analíticas

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis da Bel Photonics modelo UV-M 51, comandado pelo programa UV Professional 2. Todas as medidas foram realizadas em cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e varredura do comprimento de onda no intervalo de 200 a 350 nm.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu® modelo 20A, com detector UV-Vis modelo SPD-20A, amostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A5, acoplado a um microcomputador. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa Shim-Pack VP-ODS 4.6 μm (tamanho da partícula) 12 nm (diâmetro poro), comprimento de 250 x 4,60 mm de diâmetro interno. A fase móvel foi preparada por uma mistura de solução aquosa contendo 0,1% de H_3PO_4 com acetonitrila (ACN) na proporção 80:20 (v/v), a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} . A detecção foi realizada utilizando comprimento de onda de 210 nm e volume de injeção de amostra de 10 μL . (96)

Para realização das medidas de pH, foi utilizado um pHmetro da marca Digital Gehaka® modelo PG 2000.

3.1.5 Procedimentos experimentais

3.1.5.1 Sínteses

3.1.5.1.1 Síntese das nanopartículas e do magneto MIP (MMIP) para biotina

O procedimento de síntese da magnetita (Fe_3O_4) é baseado no método apresentado por Kong et al. (62) e a Figura 4 apresenta resumidamente o procedimento experimental.

Brevemente, foi realizada a co-precipitação de 0,01 mmol de Fe^{2+} e 0,02 mmol de Fe^{3+} em meio básico (Para isso, solubilizou-se os sais de ferro em 80,0 mL de H_2O destilada aquecida à 80°C e foi gotejado 10,0 mL de NH_4OH). Posteriormente adicionou-se 0,8 mL de TEOS - responsável por revestir a magnetita (Figura 4a) com uma camada de sílica (Figura 4b) - para 200 mg das nanopartículas dispersas em etanol. Finalmente, as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foram colocadas em 50,0 mL de tolueno anidro e 5,0 mL de MPS por 12 horas, sendo o MPS utilizado para funcionalizar as nanopartículas com a inserção de um grupo metacrílico (Figura 4c).

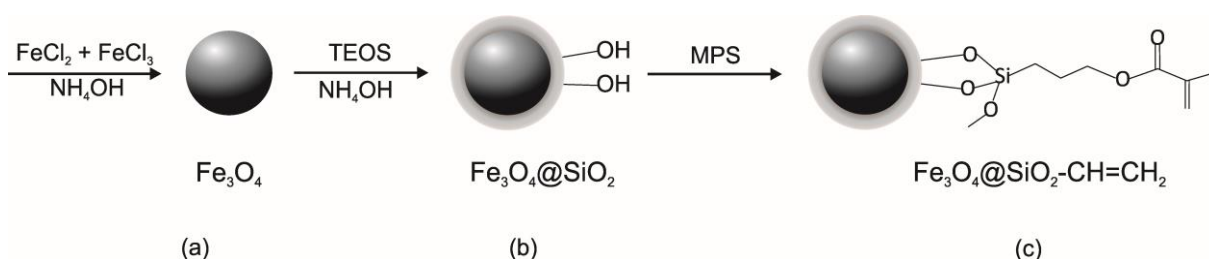


Figura 4 - Síntese e modificação da magnetita.

Fonte: autor do trabalho.

A síntese do MIP magnético para biotina pelo método não covalente já foi otimizada anteriormente pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor e apresentou ótimos resultados. (97)

Simplificadamente, o procedimento adotado foi a síntese por precipitação: biotina (0,2 mmol), ácido acrílico (0,08 mmol) e 40 mL de etanol (usado como solvente porogênico) foram misturados e deixados interagir por 12 horas a 25°C . A seguir, adicionou-se 200 mg de nanopartículas de magnetita modificadas e manteve-se o sistema sob agitação constante durante 2 horas. Por fim, acrescentou-se à mistura

4,0 mmol de EGDMA e 0,05 mmol de AIBN (iniciador radicalar). N₂ foi borbulhado continuamente na solução de maneira a impedir que o oxigênio interfira na polimerização. Por fim, o sistema foi levado ao aquecimento a 60 °C por 5 h. Finalizada a síntese, lavou-se o polímero em sistema soxhlet com metanol/água para remover a biotina e os reagentes em excesso. As águas de limpeza foram monitoradas por espectrofotometria na região do UV.

Analogamente ao MMIP foi sintetizado um MNIP como material de controle. Sua síntese é idêntica à do MMIP; contudo, não há adição do analito.

3.1.5.1.2 Síntese do MMIP com acesso restrito (RAMIP)

Empregou-se uma mistura de dois diferentes comonômeros pró-hidrofílicos para tornar o MMIP um material com acesso restrito: 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e glicerol dimetacrilato (GDMA). O procedimento de síntese adotado foi exatamente o mesmo do MMIP, variando-se o tempo de inserção dos comonômeros nas sínteses de 1 a 5 como mostra a Tabela 2 (sendo considerado o tempo de início da síntese como o momento após a adição do iniciador radicalar).

Tabela 2 - Tempo de inserção dos comonômeros pró-hidrofílicos para síntese de diferentes RAMIP

Síntese	Tempo de adição dos comonômeros após o início da síntese (min)
1	Adicionados antes do início da síntese
2	45
3	60
4	90
5	120

Fonte: autor do trabalho.

Mantendo a proporção analito: monômero funcional: monômero estrutural constante (1:4:20; respectivamente), foi otimizada a melhor proporção dos comonômeros hidrofílicos na síntese; baseando-se na proporção do monômero estrutural EGDMA. Pela estrutura do GDMA (uma mistura de isômeros) optou-se por trabalhar com uma menor proporção deste em relação ao HEMA.

Assim, foram realizadas 3 diferentes sínteses, com as proporções especificadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Otimização da proporção do HEMA e GDMA utilizados na síntese do RAMIP

Quantidade HEMA - GDMA (mmol)	Razão molar EGDMA:HEMA:GDMA
2,0 - 0,25	1: 0,5: 0,06
4,0 - 0,5	1: 1: 0,01
8,0 - 1,0	1: 2: 0,25

Fonte: autor do trabalho.

3.1.5.1.3 Síntese do RAMIP recoberto com BSA (RAMIP@BSA)

Após caracterização dos 5 diferentes RAMIP magnéticos sintetizados de acordo com a Tabela 2, aquele que apresentou maior quantidade de grupos hidroxila em sua superfície (Síntese 2) foi selecionado para o recobrimento com albumina de soro bovino (BSA). Assim, a reação de recobrimento foi adaptada de método descrito por Moraes et al. (98):

- i* - 100,0 mg de RAMIP foi deixado interagir por 60 min com 2,0 mL de BSA 1% (m/v) preparada em solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ a pH 6,0;
- ii* – A solução de BSA foi separada e 0,5 mL de glutaraldeído 25% (m/v) interagiu com o polímero por 2 h;
- iii* – 1,0 mL de solução aquosa de NaBH₄ 1% (m/v) com pH ajustado a 7 foi colocada em contato com o RAMIP por 5 min; e, por fim, as partículas foram lavadas extensivamente com água destilada.

A quantidade de BSA a ser imobilizada na superfície do RAMIP foi otimizada, sendo preparados polímeros contendo, além da BSA 1% (m/v) como descrito no procedimento acima, BSA 0,5% (m/v) e BSA 2% (m/v).

3.1.5.1.4 Síntese do RAMIP recoberto com PEG (RAMIP@PEG)

Para recobrimento do polímero com polietileno glicol (PEG), assim como descrito no item anterior, o RAMIP que apresentou maior quantidade de grupos

hidroxila livres (Síntese 2) foi selecionado para a reação com PEG. O procedimento experimental baseou-se em uma reação geral de esterificação; (99) sendo detalhado a seguir:

i – 100,0 mg de RAMIP foi colocado em contato com 5,0 mL de solução de PEG (preparado em diclorometano, o qual foi previamente tratado com hidreto de cálcio e destilado antes do uso).

ii – A temperatura do sistema foi ajustada para 0 °C e, gota a gota e com agitação magnética, adicionou-se 0,3 mL de cloreto de tionila. O sistema reacional foi mantido nessa condição por 5 min e, posteriormente, levado à 30 °C por 12 h.

iii – O produto final (RAMIP@PEG) foi lavado três vezes com diclorometano (usando rotoevaporador) e exaustivamente com água destilada. Posteriormente foi colocado para secar à vácuo.

Além da otimização do processo de síntese, avaliou-se a melhor concentração de PEG para recobrir o RAMIP. Foram preparadas 6 soluções de diferentes concentrações de PEG (de acordo com as proporções exibidas na Tabela 4), mantendo a quantidade de polímero constante; sendo a síntese realizada de acordo com o procedimento descrito acima.

Tabela 4 - Quantidades de PEG (em mmol) e a proporção do mesmo em relação à massa de RAMIP (mantida constante em 100,0 mg) utilizadas para reação de recobrimento

Síntese	Quantidade de PEG (mmol)	Proporção de PEG
1	0,025	0,1
2	0,0625	0,25
3	0,0937	0,375
4	0,125	0,5
5	0,25	1,0
6	0,50	2,0

Fonte: autor do trabalho.

3.1.5.1.5 Síntese covalente do complexo analito-monômero biotina aliléster

Previamente à síntese do MMIP semicovalente para biotina, realizou-se a síntese do complexo analito-monômero (Figura 5), alil 5-((4S)-2-oxohexahidro-1H-

tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato (denominado a partir deste ponto como biotina aliléster).

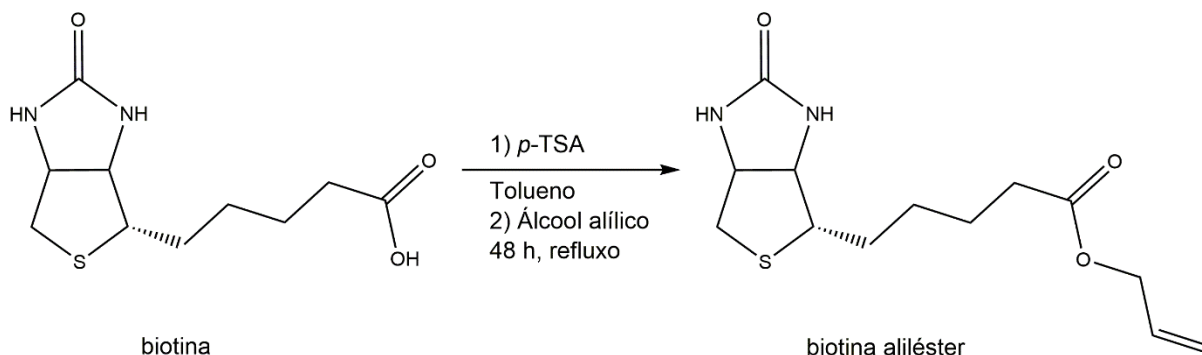


Figura 5 - Esquema de síntese da biotina aliléster.

Fonte: autor do trabalho.

A síntese foi conduzida baseando-se em Busch et al. (100) A uma solução de biotina (250,0 mg; 0,90 mmol) em 9,0 mL de tolueno adicionou-se ácido *p*-toluenossulfônico – *p*-TSA (0,090 mmol) sob agitação. Posteriormente foi adicionado álcool alílico (850,0 μ L; 12,6 mmol), sendo o sistema mantido sob refluxo a 110 °C por 48 horas. Finalizado esse período, o solvente foi evaporado e o sólido formado foi lavado duas vezes com acetato de etila. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (CH_2Cl_2 :MeOH 96:4 v/v), fornecendo 290,0 mg de produto em 87% de rendimento. Cromatografia em camada delgada forneceu $R_f = 0,33$ (CH_2Cl_2 :MeOH 96:4 v/v).

3.1.5.2 Síntese do MMIP semicovalente

A síntese do MMIP semicovalente foi conduzida de maneira similar à descrita para o MMIP: em um balão o complexo analito-monômero solubilizado em etanol, em conjunto com as (200,0 mg) nanopartículas de magnetita modificadas e EGDMA. Foi borbulhado N_2 continuamente na solução de maneira a impedir que o oxigênio interferisse na polimerização. AIBN (0,05 mmol) foi adicionado para iniciar a reação e, por fim, o sistema foi levado ao aquecimento à 60 °C por 5 h. Foram realizadas três sínteses com diferentes proporções de EGDMA (1,0; 2,0 e 4,0 mmol) em relação ao complexo analito-monômero (proporção mantida constante em 0,1 mmol).

Finalizada a síntese, o polímero foi submetido à reação de clivagem química para remoção da molécula molde do polímero. A hidrólise foi realizada em refluxo por 8 horas em MeOH contendo NaOH 1,0 mol L⁻¹. A reação de hidrólise foi finalizada adicionando solução de HCl 3,2% (v/v) por 1 hora. Após esse período, o polímero foi mantido em refluxo com metanol por 2 horas para remover o excesso de qualquer reagente que pudesse estar presente.

Analogamente ao MMIP foi sintetizado um MNIP como material de controle. Sua síntese é idêntica à do MMIP, sem a adição da biotina aliléster e com adição de álcool alílico na mesma proporção do complexo analito-monômero, com o intuito de manter a proporção molar dos grupos funcionais.

3.1.5.3 Otimização das condições cromatográficas para análise da biotina

Foram preparadas soluções de biotina em MeOH. Mantendo-se constante o fluxo da fase móvel e volume de injeção, respectivamente em 1,0 mL min⁻¹ e 10 µL, variou-se tanto a composição dos solventes da fase móvel quanto a proporção dos mesmos.

Utilizando método de eluição isocrático e com maior composição de fase aquosa, trabalhou-se no intervalo entre 80:20 v/v até 70:30 v/v dos seguintes eluentes: NaH₂PO₄ 25 mmol L⁻¹:MeOH; solução tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 6,6):ACN, solução tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 6,6):MeOH; solução aquosa 0,1% H₃PO₄:ACN.

3.1.5.4 Estudos de otimização e avaliação da eficiência dos polímeros

3.1.5.4.1 Avaliação da capacidade de exclusão proteica pelos RAMIP magnéticos

Pesou-se 10,0 mg dos diferentes polímeros sintetizados em tubos Eppendorf®. Adicionou-se 1,0 mL de diferentes concentrações de solução de BSA preparada em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 6,0. A solução de BSA e o RAMIP foi deixada em contato por 5 min sob leve agitação mecânica. Depois de transcorrido o tempo, o magneto RAMIP foi separado magneticamente e a solução analisada por UV-Vis.

3.1.5.4.2 Religação e seletividade

Para avaliar a capacidade de adsorção do MMIP e do RAMIP (e suas modificações) foram construídas curvas de isoterma. Assim, 10,0 mg de polímero foram pesadas e interagindo sob agitação mecânica com diferentes concentrações de biotina (de 5,0 até 100,0 mg L⁻¹) preparada em metanol. Após o tempo de interação, os polímeros foram separados com aplicação de um campo magnético (por um ímã de neodímio) e as soluções filtradas em filtro 0,45 µm de PTFE e levadas para análise por HPLC.

O estudo de seletividade foi realizado de maneira idêntica ao descrito acima para construção da curva isoterma, sendo preparadas soluções de biocitina e tetraciclina para interagir com os polímeros.

3.1.5.4.3. Avaliação de solvente, dosagem de massa, tempo, isoterma do RAMIP@PEG.

Os estudos de otimização começaram com uma avaliação preliminar do solvente para religação da biotina. Para isso, 10,0 mg de polímero foram colocadas em contato com 5,0 mL de solução 20,0 mg L⁻¹ de biotina preparada em diferentes solventes (água, metanol, etanol, acetonitrila e misturas entre água e os solventes orgânicos) por 2 horas. Ao fim de tempo de interação, as amostras foram filtradas e analisadas por HPLC.

Para avaliação da melhor quantidade de massa para análises com o RAMIP@PEG, realizou-se um estudo no qual pesou-se em tubos de vidro diferentes massas de polímero, de 5,0 até 50,0 mg. Essas massas foram colocadas para interagir com solução de biotina 50,0 mg L⁻¹ preparada em metanol. Após o tempo de interação, o polímero foi separado utilizando-se um ímã de neodímio e a soluções filtradas e levadas para análise por HPLC.

Após definida a melhor massa de polímero para os estudos, avaliou-se o melhor tempo de interação. 5,0 mg de MIP ficaram interagindo com 50,0 mg L⁻¹ de solução biotina preparada em metanol por diferentes tempos; de 10 até 300 min. Finalizado os tempos de interação, as soluções foram filtradas e analisadas por HPLC.

Com a massa, solvente e tempo de interação otimizados, o procedimento experimental adotado para construção da curva de isoterma para o RAMIP@PEG foi semelhante ao do MMIP.

3.1.5.4.4 Avaliação de solvente, dosagem de massa, tempo, isoterma do MMIP semicovalente.

Os estudos de otimização começaram com uma avaliação preliminar do solvente para religação da biotina. Para isso, 5,0 mg de polímero foram colocadas em contato com 4,0 mg L⁻¹ de biotina preparada em diferentes solventes (água, metanol, etanol e misturas entre água e os solventes orgânicos) por 2 horas. Ao fim de tempo de interação, as amostras foram filtradas e analisadas por HPLC.

Para avaliação da melhor quantidade de massa para análises com o MMIP semicovalente, realizou-se um estudo no qual foram pesadas em tubos eppendorf® diferentes massas de polímero, de 2,0 até 30,0 mg. Essas massas foram colocadas para interagir com solução de biotina 4,0 mg L⁻¹ preparada em metanol. Após o tempo de interação, o polímero foi separado utilizando-se um ímã de neodímio e a soluções filtradas e levadas para análise por HPLC.

Após definida a melhor massa de polímero para os estudos, avaliou-se o melhor tempo de interação. 15,0 mg de MIP ficaram interagindo com 2,0 mL de solução 20,0 mg L⁻¹ de biotina preparada em metanol por diferentes tempos; de 30 até 270 min. Finalizado os tempos de interação, as soluções foram filtradas e analisadas por HPLC.

Com a massa, solvente e tempo de interação otimizados, o procedimento experimental adotado para construção da curva de isoterma para o MMIP semicovalente foi semelhante ao do MMIP.

3.2 Ensaio de fluxo lateral e ELISA

3.2.1 Reagentes e soluções

3.2.1.1 Ensaio do tipo ELISA

O kit de substrato para ELISA (tetrametil benzidina – TMB e H₂O₂) foi comprado na Thermo Scientific® e a biotina-HRP na Fisher Scientific®. Solução 2,0 mol L⁻¹ de H₂SO₄ (Sigma-Aldrich®) foi preparada em água destilada®.

AntiFlu-HRP (fragmentos AntiFluoresceína-Fab) e AntiDig-HRP (fragmentos Anti-Digoxigenin POD Fab) foram comprados da Roche® Diagnostics S. L. Os iniciadores (do inglês *primers*) para a dupla marcação da *E. coli* e *Salmonella* na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram obtidos da TIB-Molbiol® GmbH (Berlin, Germany), cujas sequências estão amplamente detalhadas na literatura. (101)

As soluções tampão utilizadas nas análises de magneto ELISA foram preparadas em água destilada. As soluções foram TRIS 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,4 contendo NaCl 0,15 mol L⁻¹ e 0,05% Tween® 20 (nomeada de solução tampão TRIS) e 0,01 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ a pH 7,4 contendo 0,15 mol L⁻¹ NaCl, 0,05% Tween® 20 e 0,5% BSA (nomeada como solução tampão PBST). Todos os reagentes foram comprados na Sigma-Aldrich®.

3.2.1.2 Ensaios de fluxo lateral e fluxo vertical

Os compartimentos de tira conjugada (conjugate pad) de fibra de vidro e tira de amostra (sample pad) de fibra de celulose foram compradas da Millipore®. Cartões de suporte (adhesive backing cards) foram obtidos da Kenosha C.V. (Netherlands), enquanto as membranas de nitrocelulose e as tiras adsorventes (adsorbent pad) foram compradas na GE Healthcare Europe.

Nanopartículas de ouro modificadas com estreptavidina InnovaCoats® GOLD 40 nm (streptAv-AuNP) foram adquiridas da Innova Biosciences® (Cambridge, UK).

Membrana de nitrocelulose foi bloqueada utilizando-se polietileno glicol 400 (PEG 400), polietileno glicol (PEG 4000), caseína e albumina do soro bovino (BSA); todas fornecidas pela Sigma-Aldrich®.

A avaliação da capacidade de ligação do MIP pelas moléculas biotiniladas foi realizada utilizando-se albumina do soro bovino biotinilada (BSA-biotina), biotina 4-fluoresceína e o corante fluorescente Atto 665-biotina; todos da Sigma-Aldrich®. Para as reações com biotina-HRP utilizou-se como substrato TMB para membranas da Sigma-Aldrich®.

Soluções tampão foram preparadas em água destilada: tampão TRIS (o mesmo como descrito nos ensaios ELISA) e tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a pH 7,4, contendo

1,0% (m/v) BSA e 0,05% (v/v) Tween® 20 (nomeado a partir daqui como solução tampão de corrida).

3.2.2 Instrumentação

A superfície da nitrocelulose a deposição dos polímeros na membrana foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (EVO-10, Oxford LINCA). Ambos materiais foram recobertos previamente com carbono.

Biotina-HRP e os amplicons de DNA marcado nos ensaios ELISA foram quantificados utilizando-se espectrofotômetro TECAN Sunrise Infinite M200pro com software Magellan v 4.0.

Para desaglomerar as partículas de MIP utilizou-se um sonicador de ponta (SONOPLUS BANDELIN Ultrasonic Homogenizer mini20 com extensão de sonda MS 2.5).

3.2.3 Procedimentos experimentais

3.2.3.1 Síntese do MIP e magneto MIP para biotina

MIP magnético para biotina (MMIP) foi sintetizado como reportado anteriormente na seção 3.1.5.1.1. O procedimento experimental para síntese do MIP convencional foi o mesmo como descrito para o MMIP, exceto que as nanopartículas magnéticas não foram adicionadas no meio.

3.2.3.2 Amplificação do DNA e dupla marcação das fitas

As doenças transmitidas por alimentos são geralmente de natureza infecciosa ou tóxica e causadas por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas que entram no corpo humano por meio de alimentos contaminados ou pela água. Os patógenos transmitidos por alimentos podem causar diarreia grave ou diferentes tipos de infecções. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que centenas de milhões de pessoas em todo o mundo sofram de doenças infecciosas e alimentares; sendo as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella*, entre outras, a principal causa de doenças transmitidas por alimentos e água contaminada. Assim, é

interessante o desenvolvimento de métodos eficientes e rápidos de detecção deste tipo de bactéria. (102)

A amplificação do DNA e o processo de marcação foram otimizados previamente no grupo de pesquisa da Prof.^a Isabel Pividori. O procedimento experimental está detalhado em trabalhos anteriores, (101,103) os quais mostram excelentes resultados nos ensaios realizados com esse DNA. Portanto, o procedimento experimental será discutido brevemente.

A abordagem experimental foi realizada primeiramente pela liberação do genoma bacteriano dos dois patógenos estudados, *Salmonella* (*S. enterica*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), seguida pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para obter os amplicons duplamente marcados. Nos amplicons de cada bactéria, uma das extremidades terminais foi marcada utilizando-se um iniciador (primer) com biotina e a outra extremidade usando fluoresceína e digoxigenina como marcadores de codificação para os primers para *Salmonella* e *E. coli*, respectivamente. Os primers de marcação foram selecionados para amplificação específica dos genes *yfiR* (375 bp) da *Salmonella* e *eaeA* (151 bp) da *E. coli*.

Durante a PCR, foi realizada amplificação do genoma das bactérias e os marcadores de codificação foram colocados no final do amplicon (terminação 5'), sendo biotina (na sequência reversa) para ambas bactérias; fluoresceína (FLU) - sequência direta - para realizar detecção enzimática utilizando um anticorpo marcado com HRP (antiFLU-HRP) para *Salmonella* e digoxigenina (DIG) - sequência direta - para detecção enzimática utilizando antiDIG-HRP para *E. coli*.

O procedimento experimental descrito acima está ilustrado e resumido na Figura 6 a seguir:

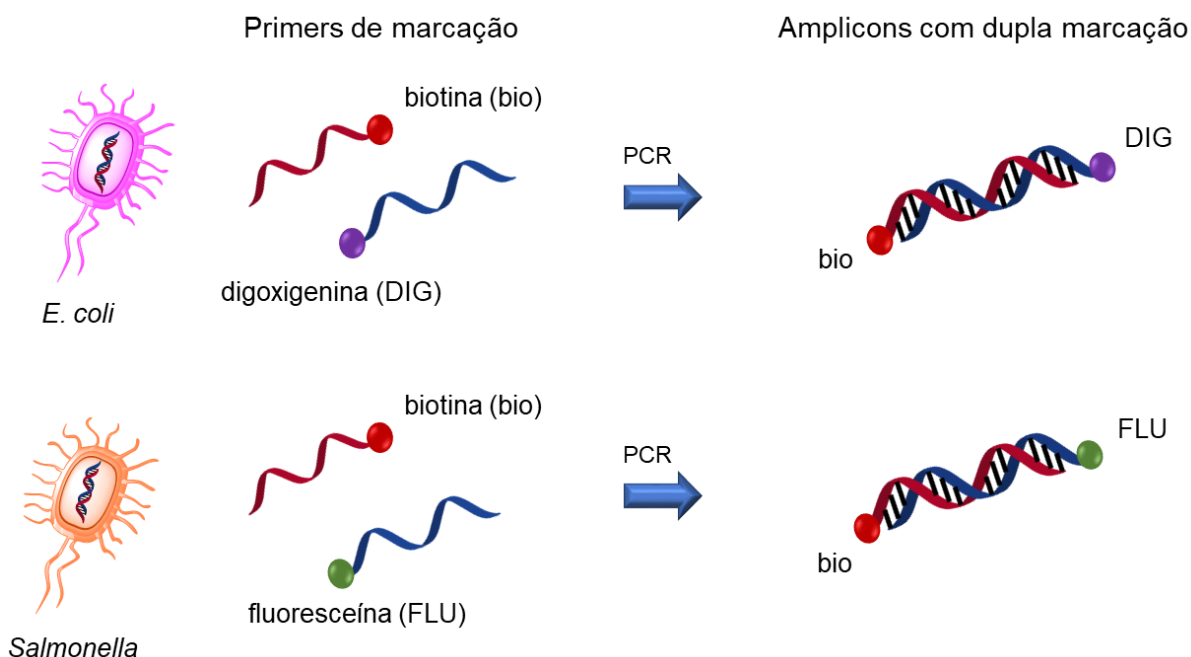


Figura 6 - Representação esquemática da amplificação por PCR e dupla marcação dos genes *eaeA* (*E. coli*) e *yfiR* (*Salmonella*) com os marcadores específicos.

Fonte: Adaptado de Ben Aissa et. al.(101)

3.2.3.3 Ensaios ELISA

3.2.3.3.1 Análise da peroxidase biotinilada (biotina-HRP)

A performance do MMIP no magneto ELISA foi avaliada usando a peroxidase (*horseradish peroxidase* - HRP) marcada com biotina, nomeada a partir deste ponto como biotina-HRP; com otimização da quantidade partículas e concentração de biotina-HRP para os ensaios.

O imunoenensaio magnético, cujos passos estão descritos a seguir, foi realizado em uma placa de 96 poços e com quantificação do analito por espectrofotometria na região do visível:

- i) Adicionou-se 100 μL de solução de MMIP/MNIP por poço (1,0; 3,0 e 5,5 mg mL^{-1} preparadas em solução tampão TRIS);
- ii) Depois de remover o sobrenadante, os poços foram lavados uma vez com solução tampão TRIS;

- iii) Os polímeros foram incubados com 100 μL de biotina-HRP (intervalo de concentração entre 5,0 até 800,0 ng mL^{-1}) preparada em tampão TRIS durante 30 minutos;
- iv) A solução de biotina-HRP foi removida e os poços foram lavados duas vezes com solução tampão para remover a biotina-HRP não ligada ao MMIP;
- v) Adicionou-se 100 μL de TMB/ H_2O_2 (1:1 v/v) por poço com incubação por 30 min;
- vi) A reação foi interrompida adicionando-se 100 μL de H_2SO_4 2,0 mol L^{-1} , sendo 150 μL desse sobrenadante transferidos para placa de leitura e medida a absorbância em 450 nm.

3.2.3.3.2 Análise do DNA biotilado

Os ensaios ELISA foram realizados para avaliar a capacidade de ligação do MMIP pelo DNA biotilado da *E. coli* e *Salmonella*.

A detecção dos amplicons duplamente marcados do DNA foi realizada de acordo com os passos exibidos pela Figura 7: (a) incubação do MMIP com DNA duplamente marcado e o respectivo anticorpo (antiDIG-HRP) para o marcador específico (digoxigenina - DIG) do amplicon; (b) lavagem com solução tampão para remover o excesso de reagentes e (c) leitura óptica da solução de substrato com TMB/ H_2O_2 por espectrofotometria no visível.

Na Figura 7 a reação é exemplificada para *E. coli*, sendo esse o mesmo procedimento para detecção da *Salmonella*. A única diferença é que a *Salmonella* foi marcada com fluoresceína (FLU) ao invés de digoxigenina (DIG), sendo utilizado o anticorpo antiFLU-HRP para detecção enzimática.

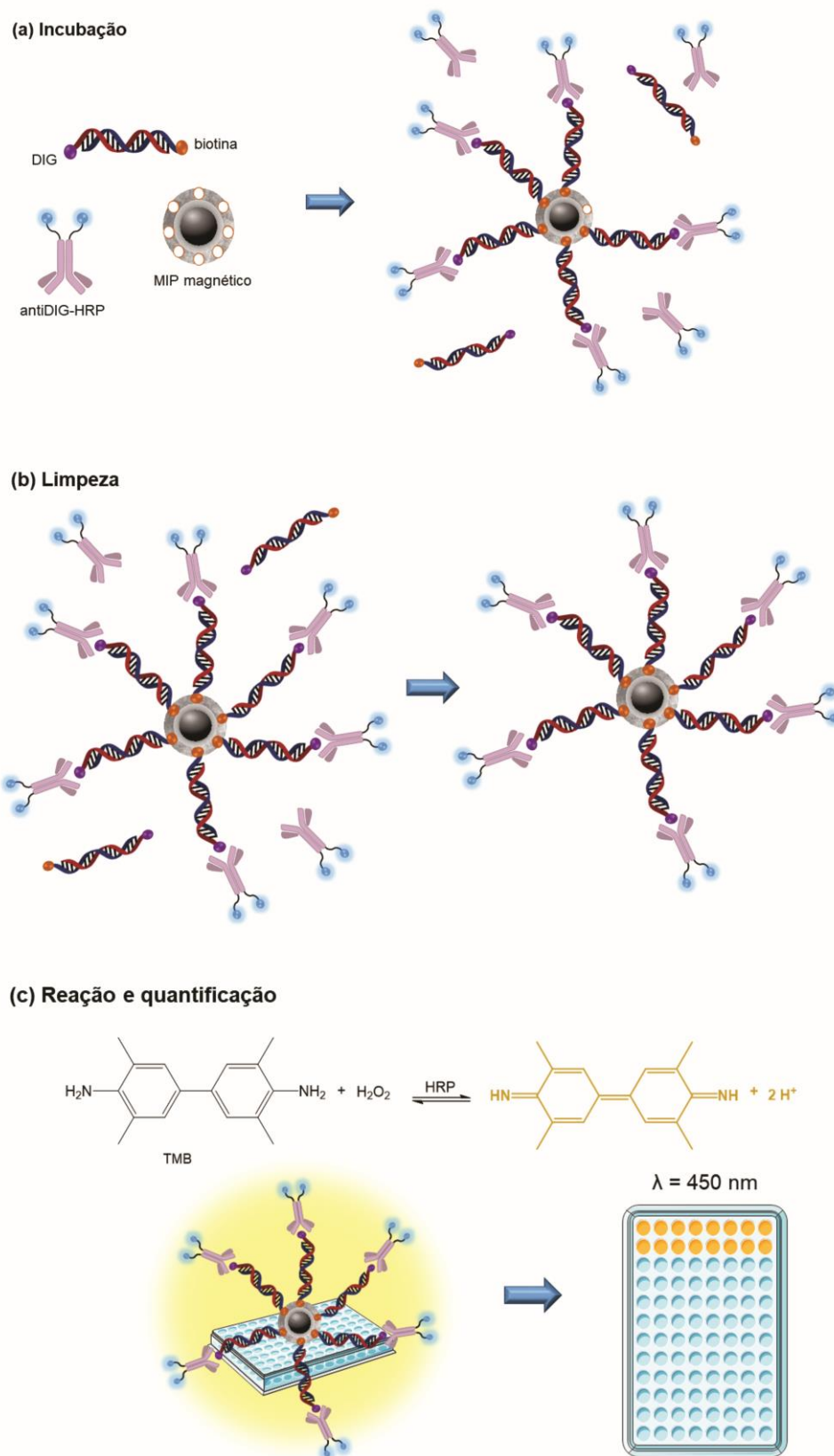


Figura 7 - Procedimento esquemático para imunoenensaio magnético baseado em magneto MIP para detecção do amplicon duplamente marcado: (a) interação entre o MMIP e DNA, (b) limpeza para remover o excesso de reagentes e (c) leitura óptica e quantificação da reação usando TMB/H₂O₂.

Fonte: Adaptado de Ben Aissa et. al. (104)

Descrevendo em detalhes, o procedimento adotado foi:

- i) Adicionou-se 100 μL de solução de MMIP/MNIP ($5,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em solução tampão TRIS) por poço;
- ii) Depois de remover o sobrenadante, os poços foram lavados uma vez com solução tampão TRIS;
- iii) Os polímeros foram incubados com 100 μL do amplicon duplamente marcado (intervalo de concentração entre 0,74 até $294,6 \text{ ng mL}^{-1}$ para *Samonella* e 0,52 até $206,8 \text{ ng mL}^{-1}$ para *E. coli*) preparado em solução tampão TRIS e 50 μL de anticorpo ($1,35 \mu\text{g}$ de antiFLU-HRP para *Samonella* e antiDIG-HRP para *E. coli*) durante 1 hora;
- iv) O sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com solução tampão TRIS duas vezes;
- v) Adicionou-se 100 μL de TMB/ H_2O_2 (1:1 v/v) por poço com incubação durante 30 min na ausência de luz;
- vi) A reação foi interrompida com a adição de 100 μL de H_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e a leitura óptica foi realizada medindo-se a absorbância em 450 nm.

Após cada passo de incubação ou lavagem, a placa de 96 poços foi posicionada sob uma placa contendo ímãs para realizar a separação magnética, até a deposição do MMIP no fundo da placa, seguido da separação do sobrenadante.

3.2.3.4 Ensaios de fluxo lateral e fluxo vertical

Os procedimentos experimentais foram conduzidos exatamente da mesma maneira para ambos os sistemas, fluxo vertical e lateral. Para simplificar, seguem detalhados os procedimentos para análise de fluxo lateral.

3.2.3.4.1 Experimentos preliminares

Foram realizados experimentos preliminares para verificar o fluxo de solução e a deposição de MMIP nas tiras de fluxo lateral.

A análise de fluxo de MMIP na membrana de nitrocelulose foi realizada da seguinte forma: solução contendo 5 μL de MMIP ($5,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão TRIS) e 40 μL de tampão PBST (10 mmol L^{-1} a pH 7,4, contendo 1% (m/v) de BSA e 0,5% de

Tween 20[®]) – nomeado como solução tampão de corrida - foi adicionado na sample pad. Adicionou-se lentamente 150 μL de tampão de corrida e observou-se o comportamento de MMIP na tira.

Para avaliar o efeito do solvente na deposição de MMIP na membrana de nitrocelulose, preparou-se soluções de MIP ($5,5 \text{ mg mL}^{-1}$) em: metanol, etanol, acetonitrila, 1-propanol, tolueno e solução tampão TRIS. 10 μL destas soluções foram pipetadas na membrana de nitrocelulose em um formato de linha e após a secagem dos solventes, foram adicionados 150 μL de tampão de corrida e as partículas depositadas na tira foram observadas.

O efeito de um agente de reticulação na imobilização do MMIP na nitrocelulose foi analisado. Preparou-se uma solução de 0,5% (v/v) de glutaraldeído em solução tampão TRIS e o procedimento foi o mesmo descrito acima para diferentes solventes.

A imobilização do MIP convencional (sem núcleo magnético) também foi avaliada. Portanto, foram analisadas diferentes quantidades de MIP (0,010; 0,025 e 0,050 mg por linha), volume de suspensão de polímero (5 μL e 10 μL) e modo de adição (manualmente ou usando uma micropipeta).

3.2.3.4.2 Reação com BSA biotinizada e nanopartículas de ouro de estreptavidina

Para verificar a presença de polímero na membrana de nitrocelulose, bem como sua eficiência, realizou-se uma reação colorimétrica; de acordo com o seguinte procedimento:

- i) Deposição de 0,025 mg e 0,050 mg de MIP nas membranas de nitrocelulose;
- ii) Adicionou-se 5 μL solução de nanopartículas de estreptavidina-ouro (streptAv-AuNP) e 40 μL de ácido bórico (10 mmol L^{-1} com sacarose 10%) na tira conjugada, a qual foi seca à temperatura ambiente durante 2 horas;
- iii) 15 μL de solução de biotina-BSA a 3,0% foram misturados com 100 μL de solução tampão de corrida e esta solução foi adicionada na tira de amostra. 150 μL de tampão de corrida foram adicionados gradualmente;
- iv) As tiras foram secas à temperatura ambiente e a cor do sistema foi avaliada.

3.2.3.4.3 Reação com biotina-HRP e TMB

A detecção de biotina-HRP foi realizada de acordo com o procedimento abaixo (esquema de acordo com a Figura 8):

- i) Diferentes quantidades de MIP foram depositadas na nitrocelulose, sendo a mesma seca por 30 min;
- ii) Adicionou-se uma mistura contendo 15 μL de biotina-HRP (500 ng mL^{-1}) e 100 μL de solução tampão TRIS na tira de amostra;
- iii) Foram adicionados 100 μL de solução tampão TRIS três vezes para eluir a biotina por meio da membrana de nitrocelulose;
- iv) O sistema foi deixado secando durante 30 min;
- v) TMB foi adicionado três vezes (5 μL cada uma) e a cor do sistema foi avaliada.

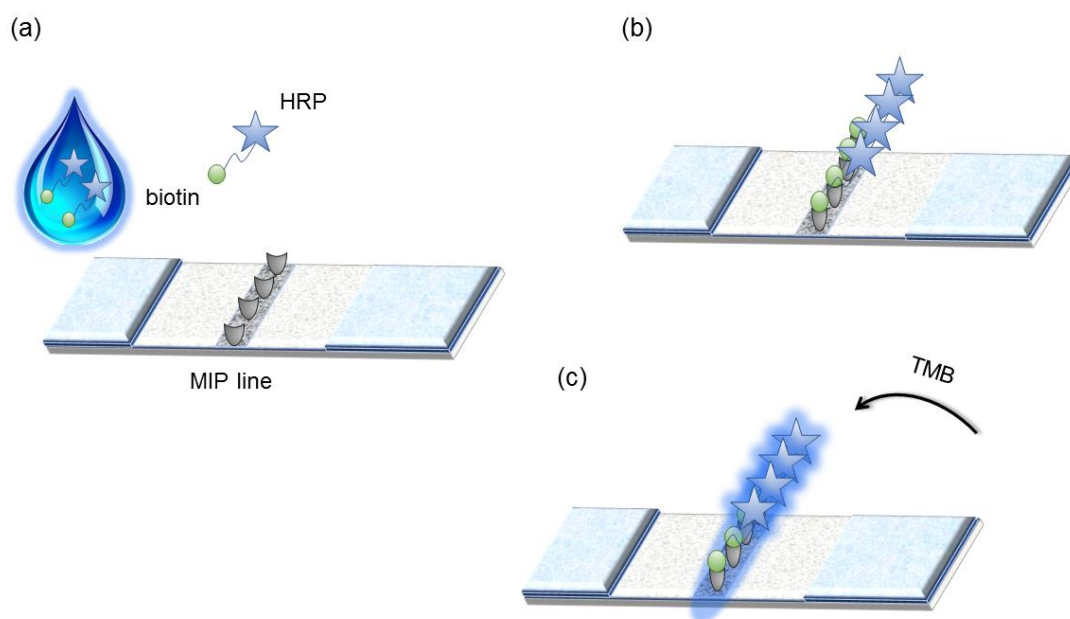


Figura 8 - Esquema de detecção da biotina-HRP no sistema de fluxo lateral: (a) amostra contendo analito é adicionada na tira de amostra, e, com solução tampão TRIS, o analito flui pela membrana até (b) reconhecimento específico da biotina na linha de teste contendo MIP para biotina, cuja reação entre TMB, H_2O_2 e HRP, (c) proporciona o aparecimento de coloração azul na linha (os excessos de analito e solução tampão fluem até a tira adsorvente).

Fonte: autor do trabalho.

3.2.3.4.4 Reação com DNA amplificado e duplamente marcado de *E. coli* e *Salmonella*

O princípio da reação para os amplicons do DNA no sistema de fluxo lateral foi o mesmo aplicado em ELISA: uma marcação na terminação 5' com biotina (para o reconhecimento específico pelo MIP) e na outra terminação com digoxigenina ou fluoresceína (para a leitura ótica pela reação enzimática usando antiDIG-HRP e antiFLU-HRP) para *E. coli* e *Salmonella* respectivamente; como exibido anteriormente nas Figura 6 e Figura 7.

Portanto, após a imobilização do MIP na membrana, primeiramente, fez-se fluir pela membrana solução dos amplicons nas concentrações de de 0,82 ng μL^{-1} de *E. coli* e 1,2 ng μL^{-1} para *Salmonella*. Em seguida, adicionou-se 13,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos respectivos anticorpos, antiDIG-HRP e antiFLU-HRP. Assim, após a eluição (usando solução tampão TRIS), a leitura visual foi realizada usando a solução TMB.

3.2.3.4.5 Reação com biotina 4-fluoresceína e Atto 655-biotina

Os corantes biotilados, biotina-4-fluoresceína e Atto 655-biotina foram preparados em solução tampão TRIS (1 mg mL^{-1}) e a reação de detecção foi realizada exatamente como descrito para biotina-HRP (item 3.2.3.4.3 e Figura 8).

3.2.3.4.6 Ensaio de seletividade

Para avaliar a seletividade das reações realizadas nos ensaios de fluxo vertical e lateral, além da capacidade de reconhecimento do MIP pela biotina, MIP preparados para outros analitos (hormônio e corante, preparado pelo grupo de pesquisa da Prof.^a Pilar Sotomayor) foram analisados na reação com biotina-HRP.

Portanto, 0,05 mg de MIP para biotina, MIP para valerato de estradiol e MIP para verde de metila foram depositados na membrana de nitrocelulose e reagiram, de acordo com o procedimento experimental 3.2.3.4.3, com biotina-HRP (500 ng mL^{-1}).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão discutidos em três grandes tópicos separados de acordo com os materiais sintetizados (RAMIP e MMIP semicovalente) e a aplicação nos sistemas de fluxo lateral (LF) e ELISA. Os subtópicos estão dispostos conforme os resultados obtidos de caracterizações, estudos de otimização e aplicação.

4.1 MMIP com acesso restrito (RAMIP)

4.1.1 Sínteses

As reações de síntese do RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG consistiram em reações de modificação na superfície do MIP magnético.

A síntese do RAMIP foi realizada adicionando-se os comonômeros pró-hidrofílicos na síntese do MMIP, com o intuito de deixar a superfície do MMIP polar (grupos hidroxila livres), como mostra a Figura 9; a qual exemplifica a reação com os grupos do HEMA. Como a mistura dos comonômeros é adicionada em tempos diferentes depois que a síntese do polímero se iniciou, ocorre ligação entre o grupo vinil com a cadeia polimérica em formação e, uma vez que o HEMA e GDMA apresentam grupos hidroxila livres, por repulsão com a cadeia polimérica hidrofóbica, esses grupos polares ficam orientados para fora do polímero, apresentando-se livres na superfície.



Figura 9 - Imobilização do HEMA na superfície do MMIP.

Fonte: autor do trabalho.

Como mostra a Tabela 3 foi otimizada a proporção dos comonômeros utilizados. A proporção 1 EGDMA: 1 HEMA: 0,01 GDMA apresentou melhores resultados no ensaio de religação com biotina (resultado não exibido) e não houve diferença significativa ao avaliar as três sínteses na capacidade de exclusão de

proteínas. Portanto, a proporção mencionada anteriormente foi escolhida para os experimentos de modificação com BSA e PEG.

O procedimento experimental adotado para imobilização da BSA (item 3.3.3.1.3) teve como princípio deixar a proteína interagindo por 1 hora com os grupos polares do RAMIP, estabilizando-a na superfície do polímero. Após esse tempo o glutaraldeído foi adicionado para fixar a proteína no polímero. O glutaraldeído 25%, devido à sua alta reatividade e concentração, forma uma cadeia polimérica entre si e por cima da proteína, fixando-a na superfície do polímero. Além disso, a proteína BSA tem um grande número de grupos amino livres, o que permite a reação espontânea com o aldeído, formando uma ligação C=N (imina). Por fim, o borohidreto de sódio foi adicionado como um agente redutor fraco, para terminar a reação do glutaraldeído. Mais além, o borohidreto reduz a imina (instável) para uma amina, permitindo que a proteína fique ligada com estabilidade na cadeia polimérica.

O PEG foi imobilizado a partir de uma reação de esterificação com a hidroxila presente na superfície do RAMIP. A Figura 10 exemplifica as etapas (não balanceadas) das reações de recobrimento do RAMIP, tal como descritas no procedimento experimental: primeiro ocorre a ativação do diácido carboxílico do PEG formando derivado clorado, ocorrendo posteriormente a reação nucleofílica do grupo hidroxila (do HEMA na superfície do MMIP) com o derivado clorado do PEG.

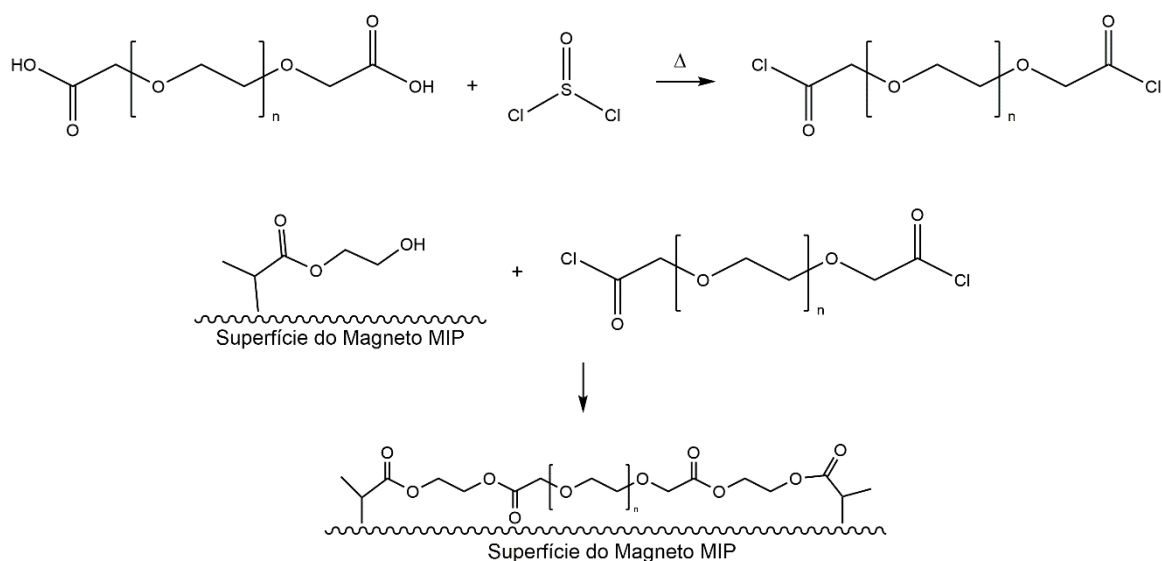


Figura 10 - Etapas da reação de recobrimento da superfície do RAMIP com PEG.

Fonte: autor do trabalho.

As Figura 11 e Figura 12 a seguir detalham todos os mecanismos propostos envolvidos.

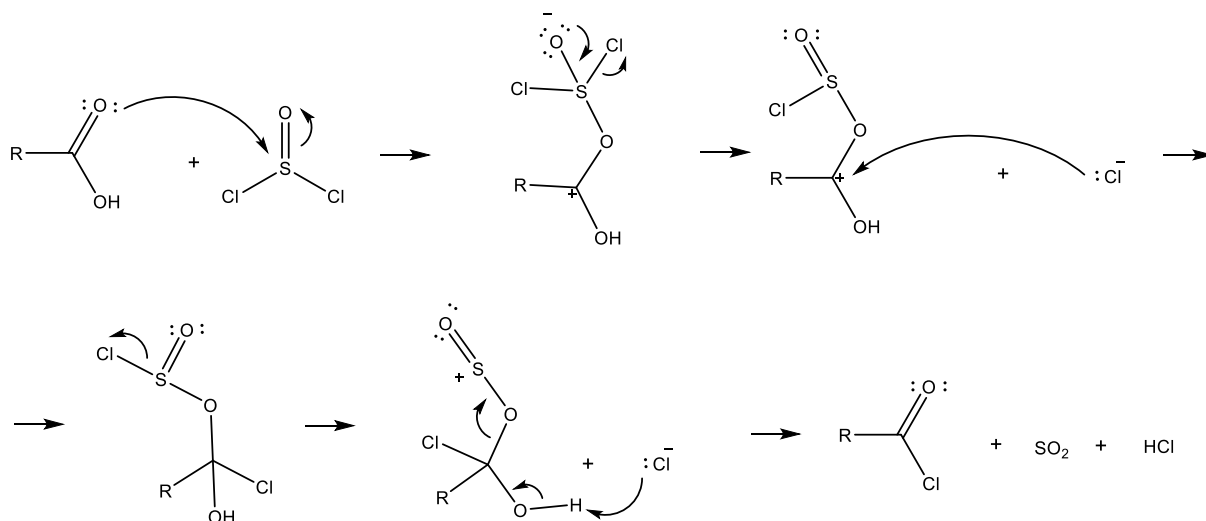


Figura 11 - Mecanismo de formação do derivado clorado do PEG.

Fonte: autor do trabalho.

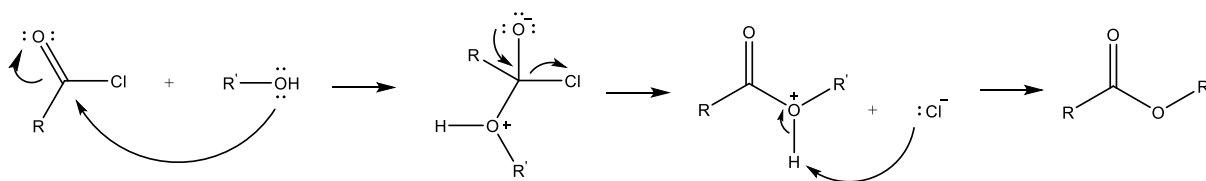


Figura 12 - Mecanismo da reação de esterificação entre grupo hidroxila do RAMIP e o derivado clorado do PEG.

Fonte: autor do trabalho.

4.1.2 Caracterização

A caracterização dos materiais será discutida por subtópicos de acordo com cada técnica utilizada. Para facilitar a comparação entre as sínteses e os diferentes materiais (RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG) os resultados serão discutidos em conjunto dentro de cada tipo de caracterização.

Uma vez que as sínteses de nanopartículas e do MMIP para biotina já foram otimizadas, (97) os estudos iniciais foram focados na síntese do RAMIP. O MMIP foi utilizado como padrão de comparação para todas as modificações realizadas.

4.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Como mostra a Tabela 2 o primeiro estudo foi baseado no tempo de inserção dos comonômeros HEMA e GDMA. Para confirmar a presença dos grupos hidroxila na superfície do polímero, foram realizadas medidas de FTIR de todas as sínteses.

Para comparação e acompanhamento das sínteses, foram realizadas análises de todos os reagentes envolvidos na síntese do RAMIP, como exibido da Figura 13 até a Figura 17.

As bandas atribuídas provêm basicamente de vibrações de estiramento (ou deformação axial), representada por ν ; ou por vibrações de dobramento (deformação angular), representada por δ . As atribuições encontram-se tabeladas e detalhadas a seguir de cada espectro de infravermelho (IV), o qual contém a estrutura do reagente.

Para grande parte das amostras há presença em 2350 cm^{-1} de uma banda pouco intensa referente ao dióxido de carbono (estiramento assimétrico), a qual não interfere nas análises uma vez que poucos grupos funcionais absorvem nessa região.

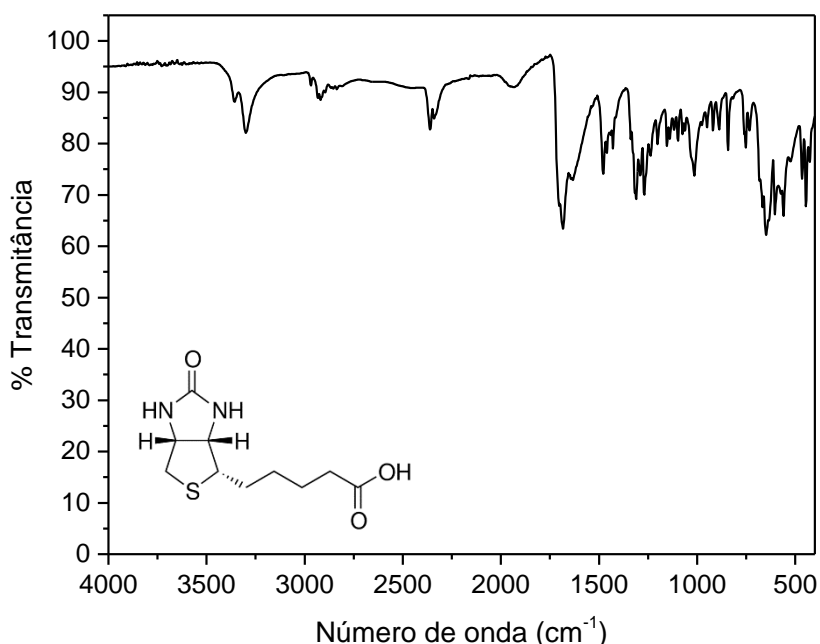


Figura 13 - Espectro vibracional da biotina na região do IV.

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 5 - Bandas do espectro de IV da biotina com as respectivas atribuições

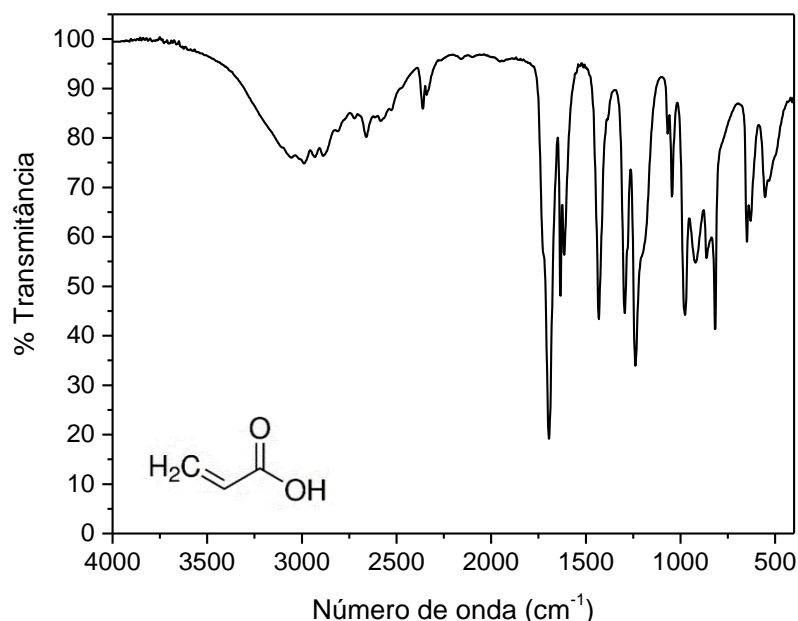
Principais bandas (cm⁻¹)	3360	3200	2980-2820	1680	1633	1460	1320-1250
Atribuições	v O-H livre	v N-H	v C-H sp ³	v C=O com sobreposição de δ N-H		δ CH ₂	v C-O

Fonte: autor do trabalho.

A biotina apresenta as bandas finas características de amida e ácido carboxílico, respectivamente, em 3360 cm⁻¹ e 3200 cm⁻¹. Após a limpeza do polímero impresso no sistema soxhlet (como descrito no procedimento experimental 3.1.5.1.1), o MMIP não apresentou as bandas respectivas e características da biotina (dados não exibidos), indicando que a molécula molde foi removida eficientemente.

O monômero funcional mais adequado utilizado para a síntese do MMIP, ou seja, aquele que vai interagir com os grupos funcionais do analito a fim de formar a cavidade seletiva, foi o ácido acrílico.

Como exibido pela Figura 14, as principais bandas são de estiramento O-H larga que ocorre entre 3100 e 2800 cm⁻¹ se sobrepondo às absorções C-H. A absorção mais forte do espectro corresponde à carbonila em 1700 cm⁻¹.

**Figura 14** - Espectro vibracional do ácido acrílico na região do IV.

Fonte: autor do trabalho.

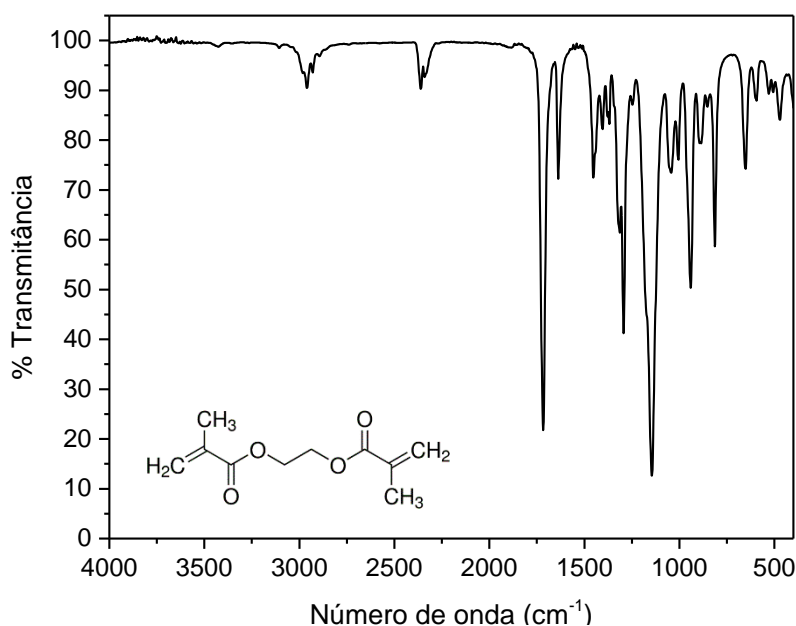
Tabela 6 - Bandas do espectro de IV do ácido acrílico com suas respectivas atribuições

Principais bandas (cm⁻¹)	3350-2520	1700	1620	1450	1200	925
Atribuições	v O-H	v C=O	v C=C	δ CH ₂	v C-O	δ OH

Fonte: autor do trabalho.

O monômero estrutural EGDMA, aquele que forma a estrutura reticulada do polímero, conforme observado na Figura 15, expõe todas as bandas de éster que são as mais intensas (1715 e 1290 cm⁻¹) e C-H sp² e sp³ de estiramento e dobramento; além dos dobramentos angulares referentes às ligações duplas em 1460 cm⁻¹.

Uma vez que o EGDMA forma a estrutura polimérica, sendo o reagente utilizado em maior quantidade, tanto o MMIP quanto MNIP, após devidamente limpos, apresentam apenas as bandas referentes ao EGDMA (dados não exibidos).



Fonte: autor do trabalho.

Tabela 7 - Bandas do espectro de IV do EGDMA com as respectivas atribuições

Principais bandas (cm⁻¹)	2960-2932	1715	1640	1460	1320	1290	1145	1010	940	810
Atribuição	v C-H sp ³	v C=O	v C=C	δ =CH ₂	v C-O		δ =C-H fora do plano			

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 16 mostra o mecanismo de reação entre iniciador radicalar AIBN e o EGDMA. A primeira etapa de iniciação consiste na formação de estrutura radicalar a

partir da quebra da estrutura do AIBN, favorecida por aquecimento ou luz UV. A etapa seguinte consiste na iniciação da formação da cadeia polimérica pelo ataque radicalar do AIBN no EGDMA. Por conseguinte, há as etapas de propagação, onde a cadeia polimérica vai se expandindo até a terminação, quando há finalização dos radicais presentes.

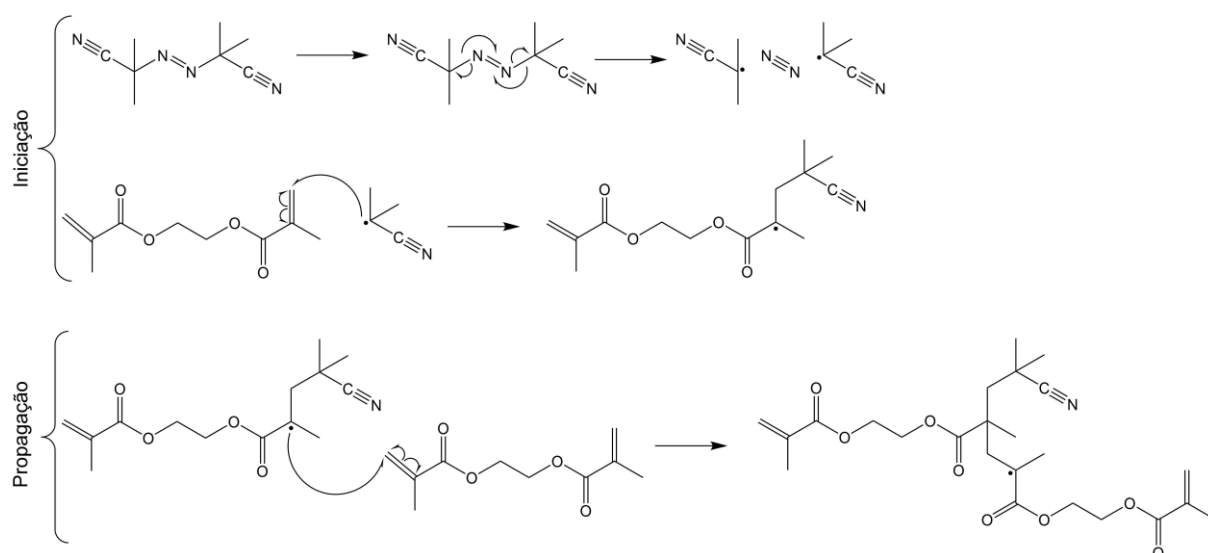


Figura 16 - Mecanismo de polimerização radicalar (etapas de iniciação e propagação) do EGDMA utilizando AIBN como iniciador.

Fonte: adaptado de SELLERGREN e HALL. (105)

Os comonômeros hidrofílicos HEMA e GDMA apresentam estrutura química semelhante e, como mostra a Figura 17 e Tabela 8, as bandas de ambos são similares. O HEMA apresenta maior intensidade no estiramento O-H em comparação com o GDMA, uma vez que esse consiste em uma mistura de isômeros, apresentando grupos ésteres em conjunto com grupos hidroxila.

Assim, com o intuito de propiciar a maior quantidade de grupos hidroxila na superfície do RAMIP, utilizou-se uma mistura dos comonômeros.

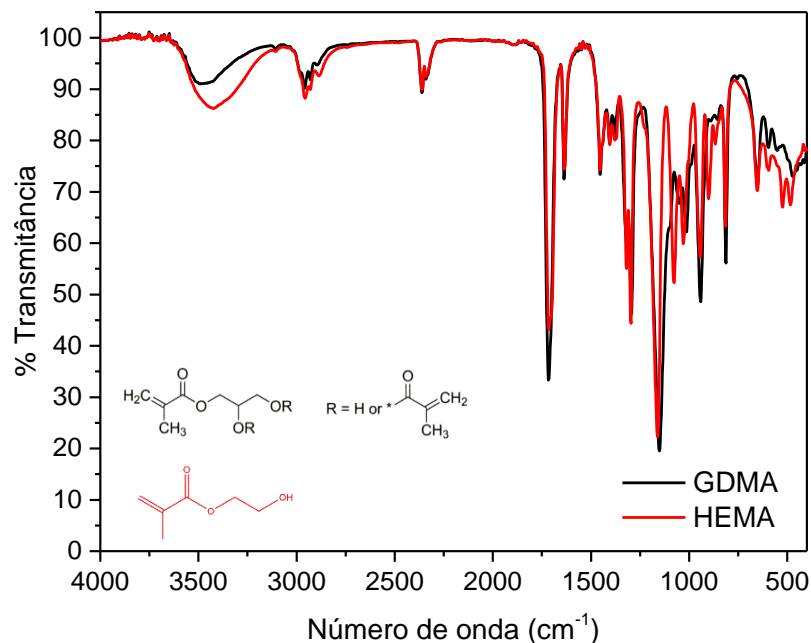


Figura 17 - Espectros dos comonômeros GDMA e HEMA na região do IV.

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 8 - Bandas do espectro de IV para o HEMA e GDMA com as respectivas atribuições

Principais bandas (cm⁻¹)	3600-3100	2955-2835	1713	1634	1455	1325-1282	1155	932	808
Atribuições	v O-H	v C-H sp ³	v C=O	v C=C	δ =CH ₂	v C-O	δ =C-H (fora do plano)		

Fonte: autor do trabalho.

A Tabela 2 especifica a otimização do tempo de inserção do HEMA e GDMA para síntese do RAMIP, sendo denominadas sínteses de 1 a 5. A verificação da presença dos regentes foi monitorada pela presença de grupos hidroxila no MMIP (Figura 18).

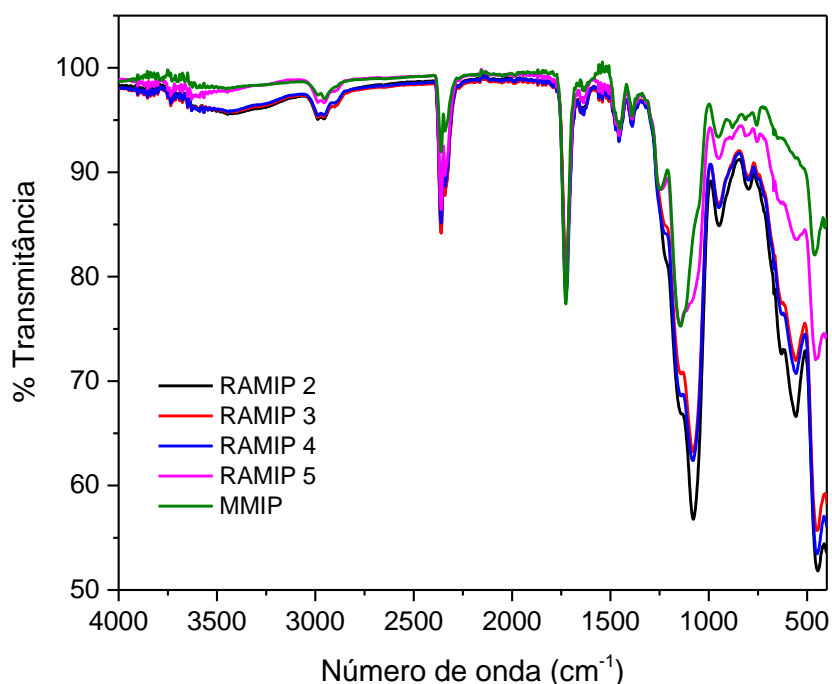


Figura 18 - Espectro na região do IV para os diferentes RAMIP sintetizados de acordo com condições especificadas na Tabela 2.

Fonte: autor do trabalho.

O RAMIP 1 não é mostrado porque a síntese não ocorreu. O polímero não foi formado, possivelmente porque os comonômeros foram adicionados ao mesmo tempo que todos os outros reagentes. Assim, como o mecanismo de polimerização é radicalar e não diferencia ligações duplas, houve formação de radicais do EGDMA, HEMA e GDMA, os quais ligaram entre si de maneira desordenada, não permitindo a construção da cadeia polimérica, como mostra o mecanismo da Figura 16.

No entanto, não se observou bandas definidas da hidroxila nos RAMIP de 2 até 5, como uma ausência de definição no espectro na região de 3500 cm^{-1} até 3000 cm^{-1} ; não sendo possível determinar qual modificação foi bem-sucedida.

Possivelmente a lavagem dos polímeros no sistema soxhlet proporcionou condições para que os grupos hidroxila dos comonômeros que estivessem imobilizados na superfície polimérica fossem hidrolisados.

O meio utilizado para limpeza do polímero, metanol com ácido acético glacial em alta temperatura (aproximadamente $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) favorece reações tanto no grupo hidroxila quanto na carbonila, conforme os mecanismos propostos nas figuras a seguir.

Como mostra a Figura 19, na presença de um ácido forte, o metanol age como uma base, se tornando protonado. Como hidroxilas são grupos nucleófilos, eles podem reagir com álcoois protonados. Assim, o grupo hidroxila do HEMA atua como

nucleófilo sobre o metanol protonado, ocorrendo reação S_N2 e gerando como produto final um éter.

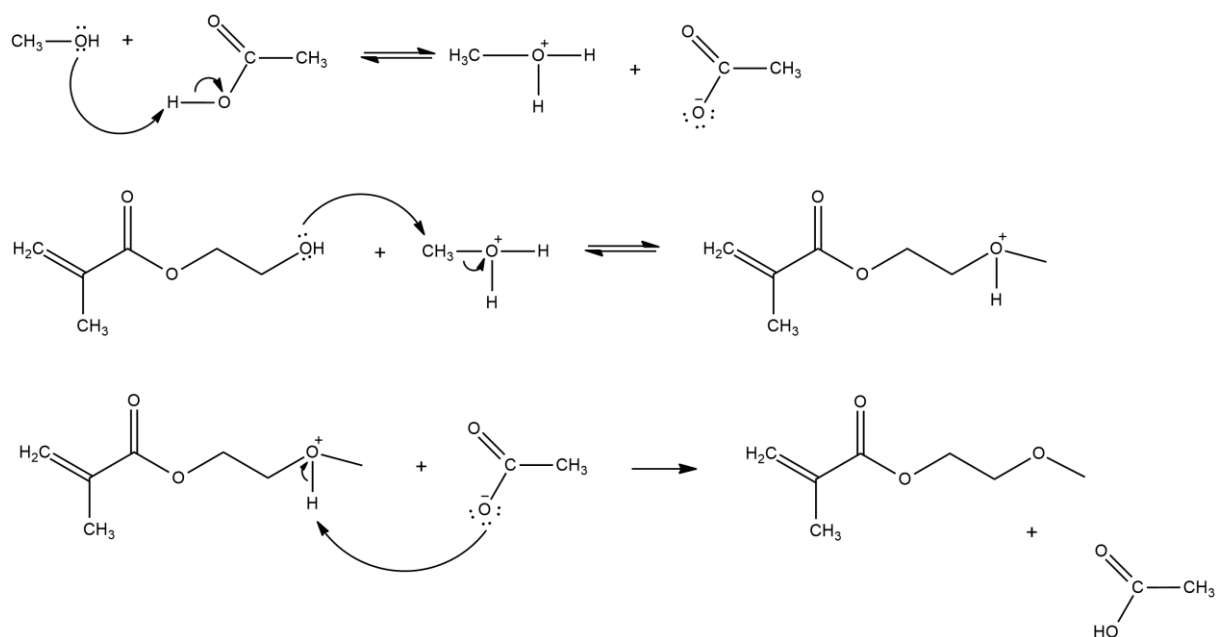


Figura 19 - Mecanismo de reação S_N2 no grupo hidroxila do comonômero HEMA.

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 20 exibe o mecanismo de hidrólise do grupo éster. As condições de limpeza proporcionaram um meio no qual o ácido acético funcionou como um catalisador protonando a carbonila e o metanol realizou um ataque nucleofílico. Após rearranjo e remoção de prótons, tem-se como produtos finais o éster e o etilenoglicol.

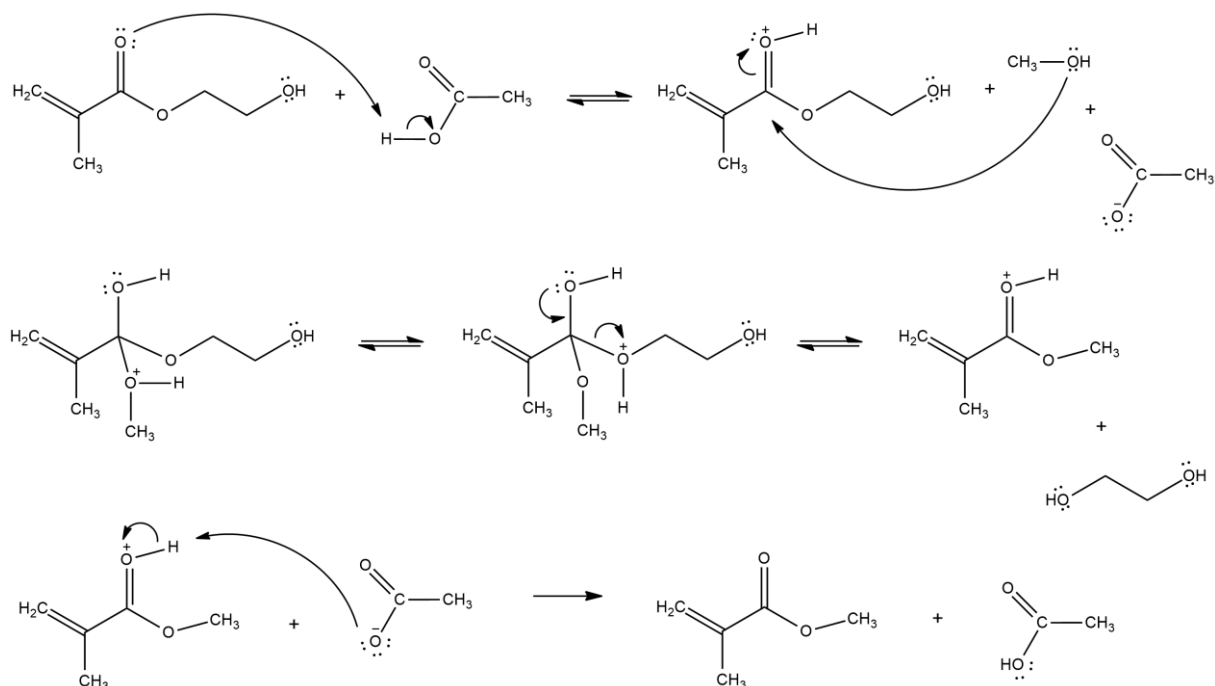


Figura 20 - Mecanismo de hidrólise ácida da carbonila do comonômero HEMA.

Fonte: autor do trabalho.

Com o intuito de corrigir esse problema, novos polímeros foram sintetizados nas mesmas condições de 1 a 5 descritas anteriormente e lavados com os solventes a frio. Utilizando ácido acético apenas na primeira solução de limpeza e em menor proporção, os polímeros foram lavados com metanol e água sob agitação mecânica na ausência de aquecimento, sendo trocados os solventes a cada hora.

As novas sínteses foram caracterizadas novamente por IV, como mostra a Figura 17. O RAMIP 1 mais uma vez não foi formado. As sínteses de 2 a 5 mostram a presença do estiramento OH, o qual vai diminuindo de intensidade conforme o tempo de inserção do reagente foi aumentando. Tal fato ocorreu uma vez que conforme o tempo de inserção foi aumentando, a cadeia polimérica já estava mais formada ou em formação, o que diminui a quantidade de HEMA e GDMA que poderiam ficar ligados na superfície.

Além disso, a baixa intensidade do sinal (se comparada com o espectro dos comonômeros livres) pode ser explicada porque a quantidade de grupos hidroxila imobilizadas na superfície não é grande e, como a análise foi realizada no sólido, a medida ficou limitada pelo limite de detecção do equipamento.

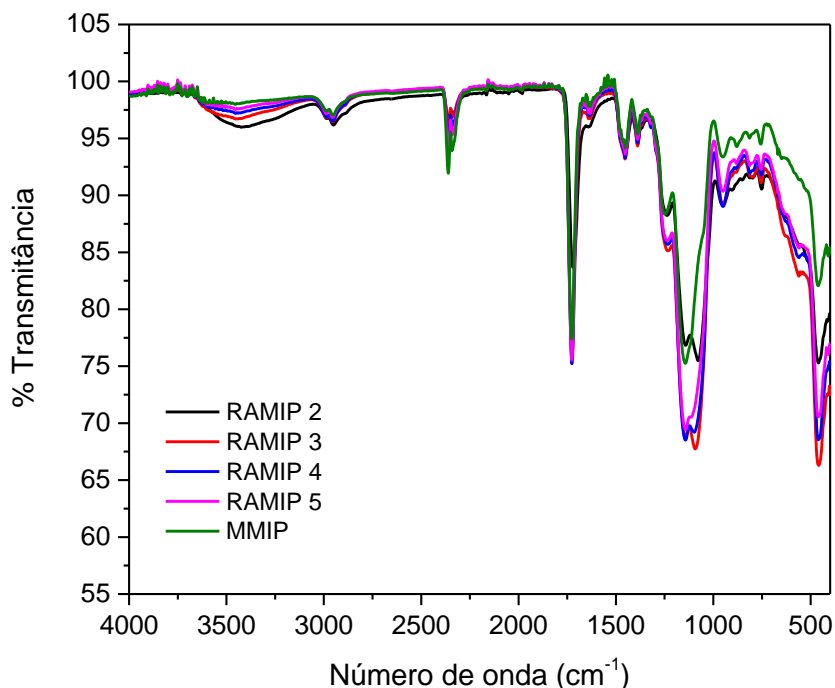


Figura 21 - Espectros na região do IV para os RAMIP lavados com solvente à frio.
Fonte: autor do trabalho.

Uma vez que a síntese 2 apresentou maior intensidade no sinal de hidroxila, esse RAMIP foi o escolhido para realizar as modificações posteriores com BSA e PEG.

A Figura 22 exibe uma comparação entre os espectros de BSA, MMIP e RAMIP@BSA. Não é possível observar diferença significativa entre MMIP ou RAMIP@BSA para afirmar que houve deposição da BSA sob a superfície do polímero, possivelmente porque o glutaraldeído recobre a BSA. Não ocorre o surgimento/desaparecimento de nenhuma banda referente à BSA. Assim sendo, a confirmação do recobrimento com BSA foi realizada por outras técnicas.

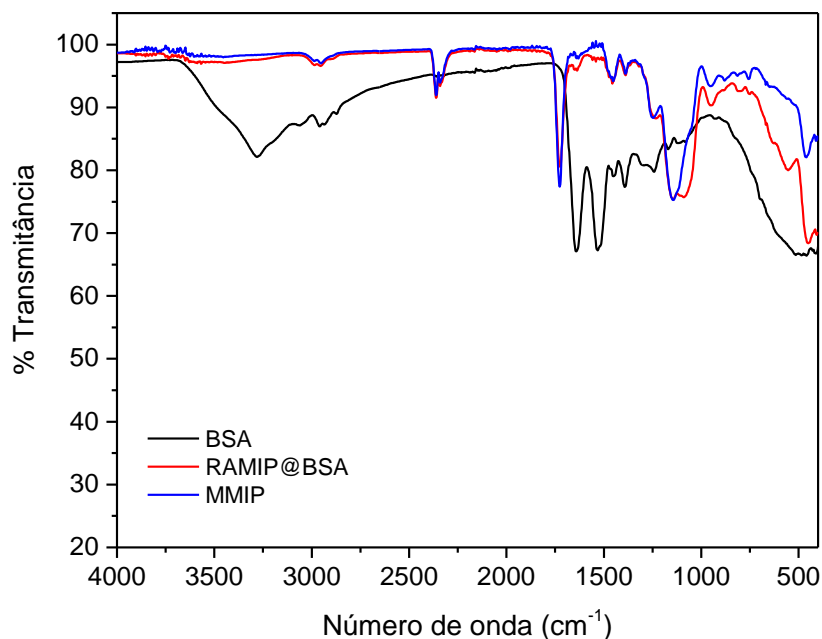


Figura 22 - Espectros na região do IV para comparação entre MMIP, BSA e RAMIP@BSA.
Fonte: autor do trabalho.

Pela Figura 23 também não é possível afirmar que houve recobrimento com PEG. Embora ocorra um ligeiro aumento da intensidade da banda em 2950 cm⁻¹ de carbono sp³ e 1140 cm⁻¹ de estiramento C-O, a mudança é muito sutil e não há mais nenhuma banda ou mudança que mostre a diferença entre o MMIP e RAMIP@PEG. A confirmação da reação também foi realizada por outras técnicas.

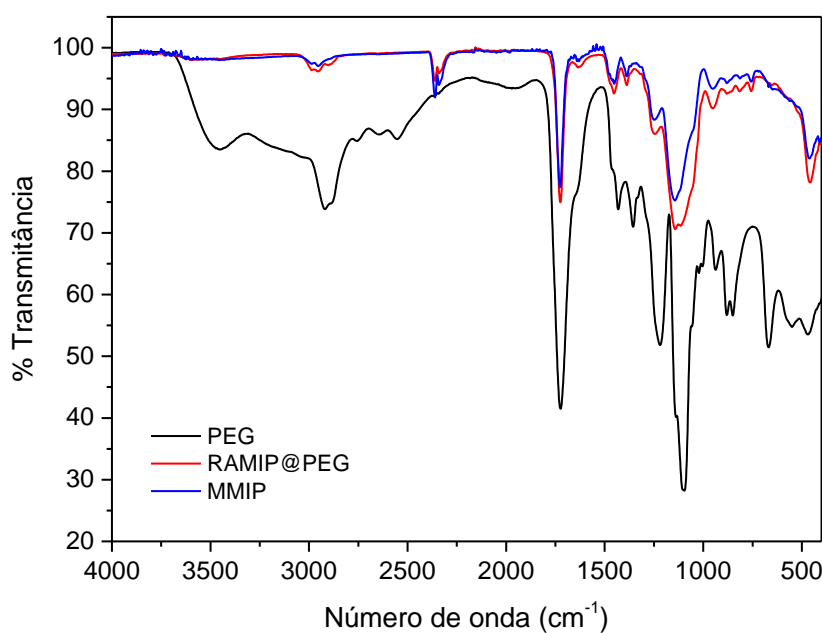


Figura 23 - Espectros na região do IV para comparação entre MMIP, PEG e RAMIP@PEG.
Fonte: autor do trabalho.

4.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Todos os polímeros sintetizados foram levados para análise de MEV-FEG com o intuito de observar sua morfologia, distribuição e características superficiais

Pela Figura 24 pode-se observar que as partículas obtidas no magneto MIP (a) e magneto RAMIP (b) tem um formato esférico e uniforme, sendo que a adição dos comonômeros no RAMIP não alterou as características superficiais do MMIP. Em (c) e (d) é possível verificar que a BSA foi imobilizada com sucesso sob a superfície do RAMIP, uma vez que, com o aumento da porcentagem de BSA utilizada, a área recoberta com a proteína é maior. No entanto, o recobrimento apresentou-se como um problema nos estudos futuros de religação da biotina uma vez que, como mostra o MEV, a BSA encobriu totalmente as partículas poliméricas, impedindo que a biotina se religasse ao MMIP com sucesso.

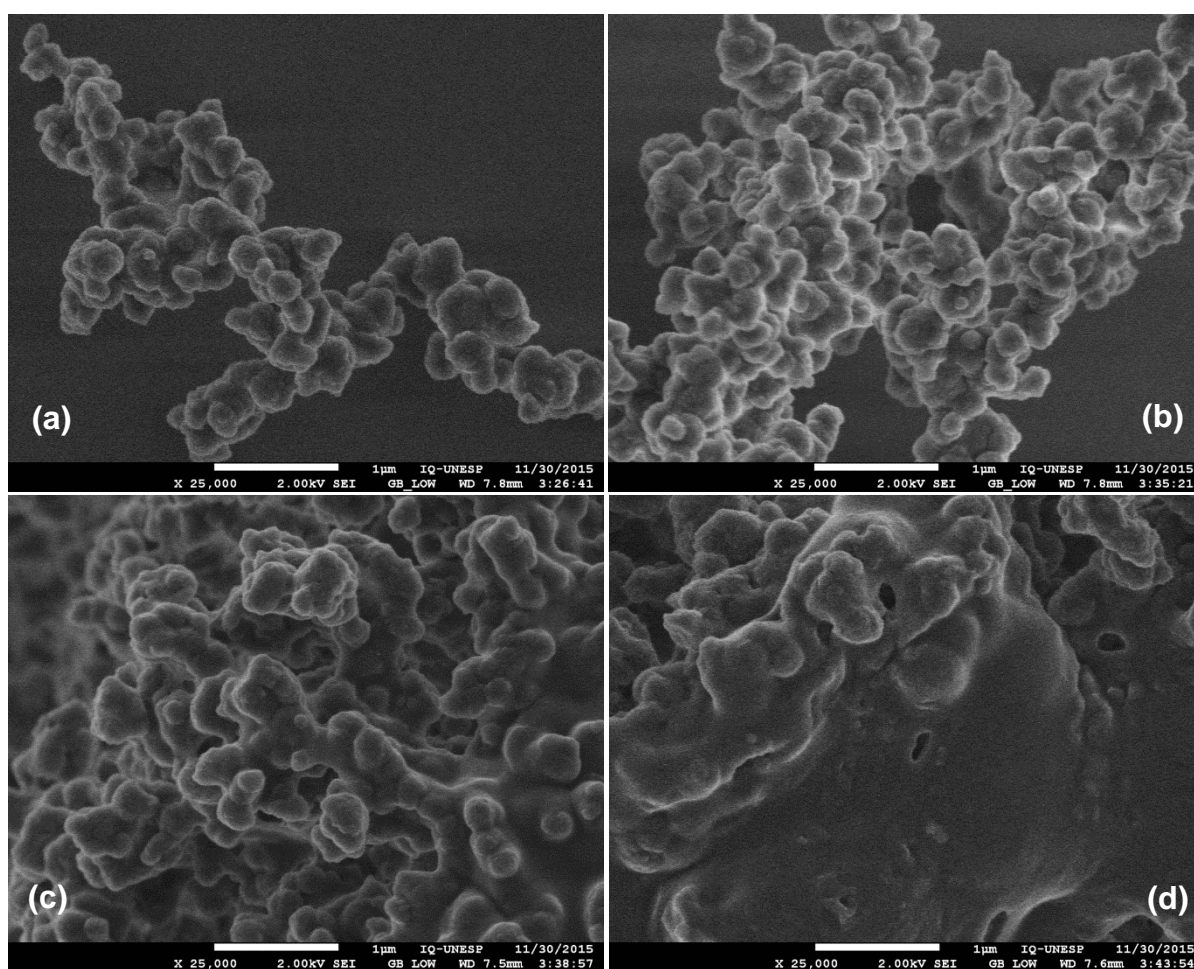


Figura 24- Imagens de MEV-FEG com ampliação de 25 000 x do MMIP (a), magneto RAMIP (b), magneto RAMIP@BSA 1% (c) e magneto RAMIP@BSA 2% (d).

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 25 exibe as imagens de MEV-FEG para o RAMIP@PEG. É possível observar que as partículas obtidas no magneto MIP (a) e magneto RAMIP (b) tem um formato esférico e uniforme, além de estarem ligeiramente aglomeradas. Em (c), (d) e (e), não é possível verificar diferença na superfície ou morfologia das partículas de polímero após a modificação com diferentes proporções de PEG (respectivamente sínteses 1,2 e 4; de acordo com a Tabela 4).

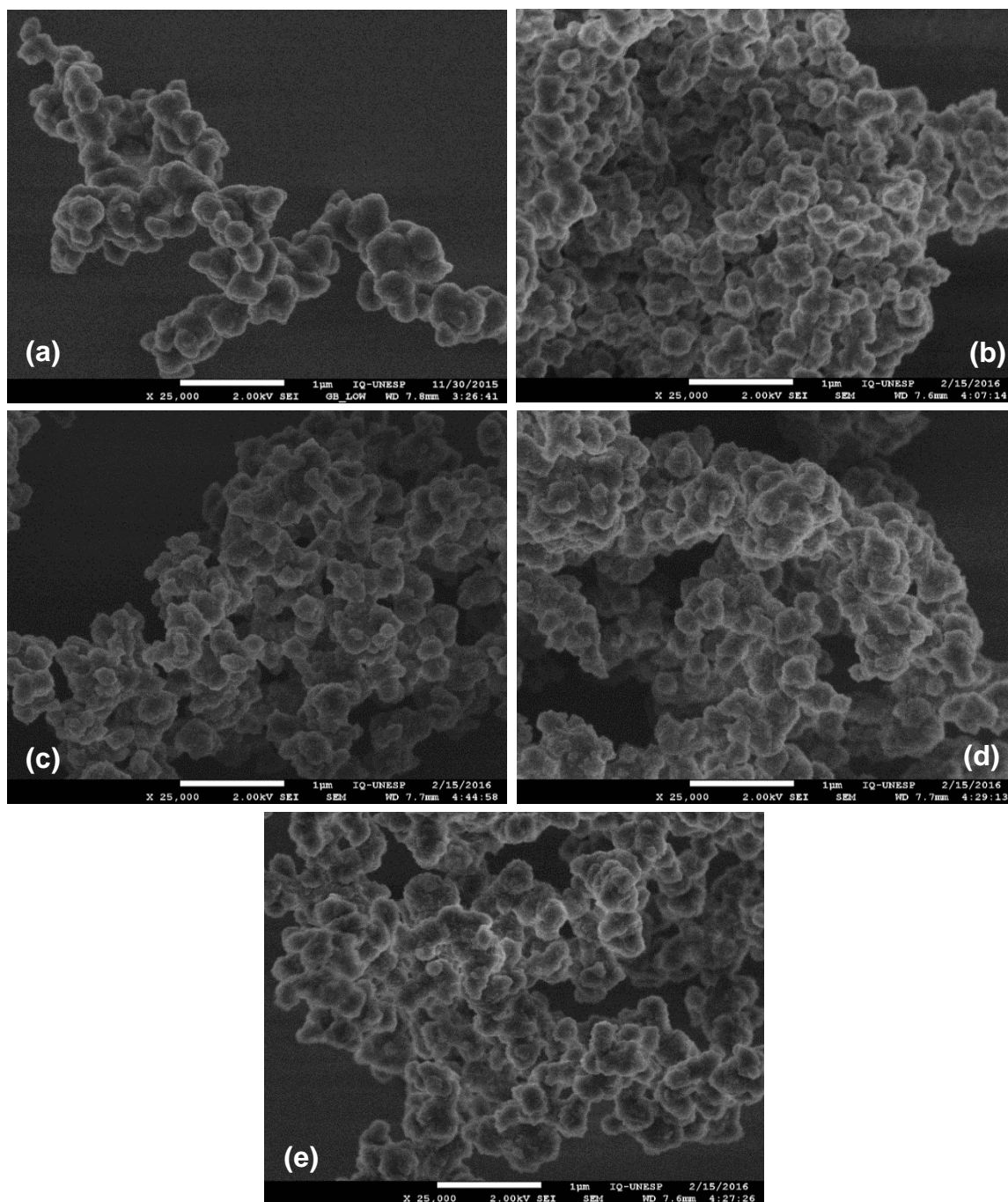


Figura 25 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 25 000 x do MMIP (a), RAMIP (b), RAMIP@PEG 0,125 (c), RAMIP@PEG 0,25 (d) RAMIP@PEG 0,5 (e).

Fonte: autor do trabalho.

4.1.2.3 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)

As propriedades magnéticas das nanopartículas de Fe_3O_4 são definidas pelo tamanho, área superficial e estrutura cristalina. Para tanto, a magnetometria é um método utilizado a fim de determinar o magnetismo de um material quando submetido à aplicação de um campo magnético.

Baseando-se na resposta à presença de um campo magnético externo, existem três principais classificações para os materiais: diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos (nessa última classificação há subclasses antiferromagnéticas e ferrimagnéticas). As nanopartículas dos materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos apresentam características superparamagnéticas. (106)

Uma vez que as nanopartículas utilizadas nesse trabalho são de magnetita, esperou-se um comportamento superparamagnético dos materiais (as nanopartículas, devido seu tamanho, possuem um domínio único – ou seja, uma única orientação magnética; apresentando assim superparamagnetismo). (107)

Portanto, todas as sínteses foram caracterizadas com o propósito de verificar se há conservação das propriedades magnéticas após as diversas modificações. Para análise dos resultados, as curvas obtidas experimentalmente foram comparadas com as reportadas pela literatura, como a exibida pela Figura 26.

A Figura 26 mostra curvas de magnetização de materiais (M), quando se aplica um campo magnético (H) externo.

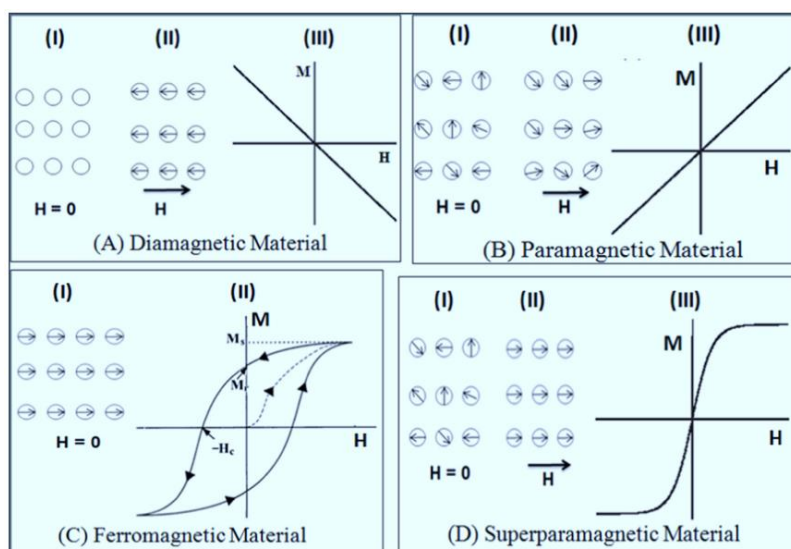


Figura 26 - Ilustração do momento magnético (M) de diferentes tipos de materiais sob aplicação de um campo magnético (H).

Fonte: SODIPO et al. (106)

No caso dos materiais ferromagnéticos, o material é colocado sob aplicação de um campo até atingir uma magnetização de saturação (M_s); gerada pelo alinhamento máximo dos momentos magnéticos do material. Com a diminuição do campo, a magnetização diminui para o valor de magnetização remanescente (M_R). O campo necessário para remover a magnetização de um material depois de ser submetido ao campo magnético externo é chamado de campo coercitivo ($-H_c$) que vai aumentando continuamente até atingir um valor oposto ao da magnetização de saturação, completando o ciclo que representa a histerese do material. Ao variar a orientação do campo aplicado é removida a magnetização do material. Para os materiais superparamagnéticos, devido aos monodomínios, apresenta-se uma curva de histerese de alta magnetização de saturação e zero de remanência. (106)

Pela Figura 27 é possível observar que para o MMIP e as modificações com BSA não é observada histerese, nem magnetização remanescente e nem de coercitividade (o ponto meio dos gráficos está em zero), como esperado para materiais superparamagnéticos.

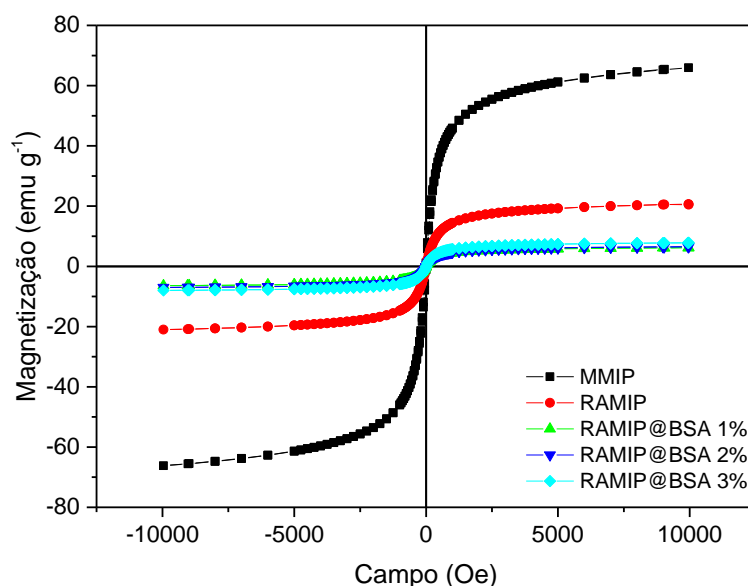


Figura 27 - Curvas de histerese magnética para o MMIP, RAMIP e as modificações com diferentes proporções de BSA.

Fonte: autor do trabalho.

No entanto, é possível visualizar uma queda nos valores de magnetização de saturação. Para o MMIP há um valor de aproximadamente 65,0 emu g⁻¹, enquanto que para o RAMIP esse valor cai para 20,0 emu g⁻¹. Isso pode ser explicado pela adição de mais reagentes que modificam a estrutura polimérica. Já com a adição da

BSA, independente da porcentagem imobilizada, como há um recobrimento total da superfície do MMIP, o valor de magnetização situa-se ao redor de $6,0 \text{ emu g}^{-1}$. Experimentalmente observou-se que após a adição da BSA, a aplicação do campo magnético com ímã de neodímio foi muito menos eficiente na separação do polímero da solução; uma vez que a grande quantidade de material recobrindo as nanopartículas diminuíram sua resposta magnética (comparando com o MMIP, esse valor cai ao redor de dez vezes).

Para o RAMIP@PEG o estudo de magnetização é apresentado na Figura 28. Do mesmo modo como para a BSA, ocorre diminuição no valor de magnetização do MMIP conforme vão sendo realizadas as modificações. Também avaliou-se a influência da quantidade de PEG (em equivalentes com o polímero, de acordo com a Tabela 4) no comportamento magnético do material.

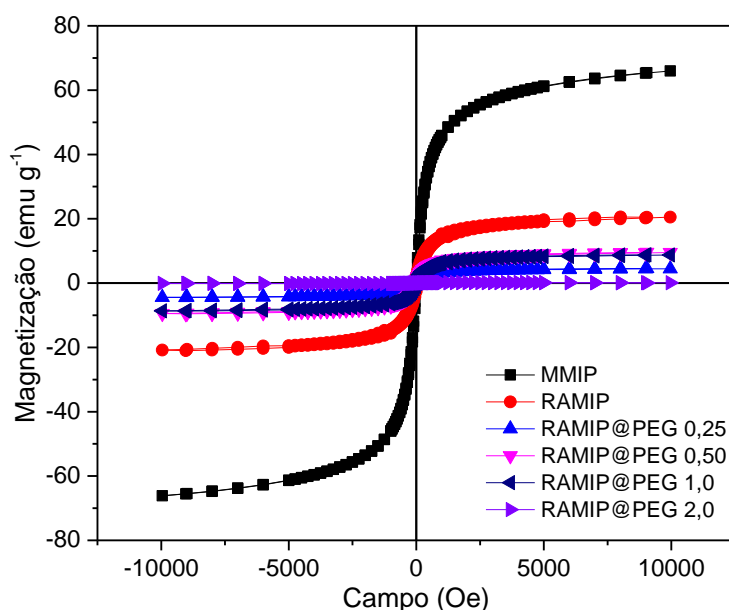


Figura 28 - Curvas de histerese magnética para o MMIP, RAMIP e as modificações com diferentes proporções de PEG.

Fonte: autor do trabalho.

Para o RAMIP@PEG contendo 0,50 e 1,0 equivalentes de PEG, têm-se magnetização ao redor de $10,0 \text{ emu g}^{-1}$. Para 0,25 equivalentes o valor é de $5,0 \text{ emu g}^{-1}$, o qual está fora do padrão se comparar com as outras proporções. O valor esperado também seria ao redor de $10,0 \text{ emu g}^{-1}$, uma vez que é a menor proporção utilizada. Possivelmente ocorreu algum erro experimental durante o processo de síntese.

Ademais, é interessante observar que, ao utilizar excesso de PEG (2,0 equivalentes), o polímero perde totalmente sua magnetização (valor encontrado ao redor de $0,1 \text{ emu g}^{-1}$); uma vez que o excesso de PEG recobre toda a superfície do RAMIP. Experimentalmente observou-se que o campo magnético do ímã de neodímio não atraiu as partículas da referida síntese. Portanto, a quantidade de PEG utilizada para modificar o RAMIP se mostrou um fator necessário de otimização, a qual foi realizada por meio de outros experimentos.

4.1.2.4 Termogravimetria

Com o intuito de verificar a estabilidade térmica dos polímeros e a presença dos modificantes na sua superfície, realizaram-se análises termogravimétricas (TG) e de calorimetria diferencial exploratória (DSC).

Como mostra a Figura 29 todos os materiais apresentam perda de água adsorvida na sua estrutura ao redor de $100 \text{ }^\circ\text{C}$. A BSA apresenta estabilidade térmica até a temperatura $210 \text{ }^\circ\text{C}$, após a qual há início do processo de decomposição, com perda de massa de 100%. O magneto MIP apresentou maior estabilidade (sem perda de massa significativa) do que o magneto RAMIP@BSA, cujas temperaturas de início de decomposição são, respectivamente, $350 \text{ }^\circ\text{C}$ e $295 \text{ }^\circ\text{C}$.

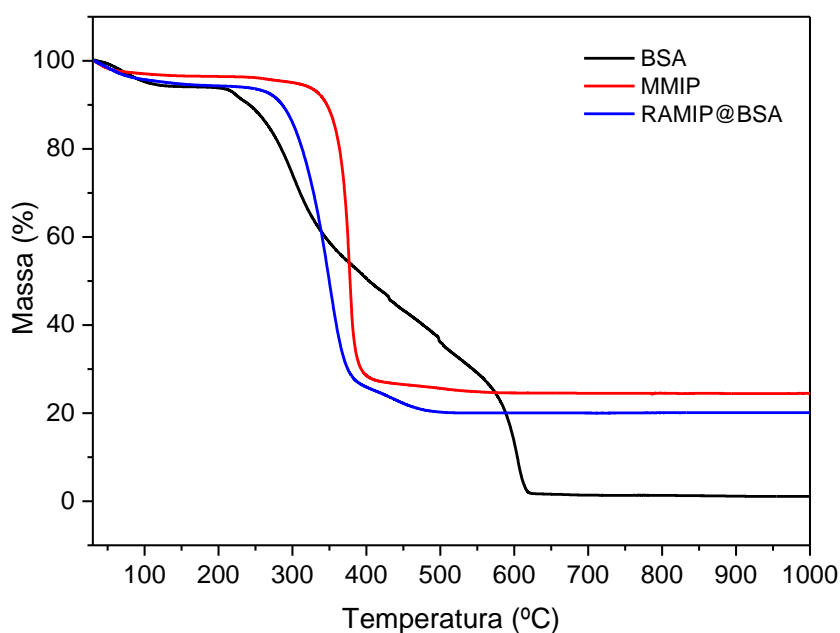


Figura 29 - Curvas TG para a BSA utilizada como modificador e os polímeros sintetizados.
Fonte: autor do trabalho.

Avaliando o perfil das curvas é possível verificar a presença de interação da BSA com o polímero, uma vez que essa interação altera as propriedades termogravimétricas. A BSA apresenta duas quedas de massa significativas (entre 200 e 600 °C), sendo que as mesmas não são observadas quando a proteína está em contato com o polímero. Mais ainda, a diferença no perfil da perda de massa entre o MMIP e o RAMIP@BSA indica a presença da proteína na superfície; uma vez que a BSA é um composto orgânico e que, ao ser decomposto, se comporta de modo diferente do MMIP, um material contendo diferentes componentes.

Ademais é possível concluir que a BSA estava imobilizada no magneto RAMIP uma vez que esse teve uma perda de massa maior do que o magneto MIP, cujos valores são respectivamente 77,1% e 72,4%. Assim, a proteína ao se decompor totalmente, deixa o magneto RAMIP com massa menor no final do processo e, pela diferença de massa do resíduo do RAMIP e do RAMIP@BSA, é possível concluir que foi imobilizada aproximadamente 4% de BSA na superfície do polímero.

Na Figura 30 pela DSC da BSA é possível observar que a partir de 300 °C ocorrem vários processos exotérmicos, os quais possivelmente são provenientes da desnaturação e decomposição da proteína, a qual perde sua estrutura. O magneto MIP apresenta apenas um processo exotérmico em 385 °C e o magneto RAMIP@BSA apresenta dois processos exotérmicos, entre 370 °C e 450 °C, possivelmente devido a interação que ocorreu entre o polímero e a proteína imobilizada em sua superfície.

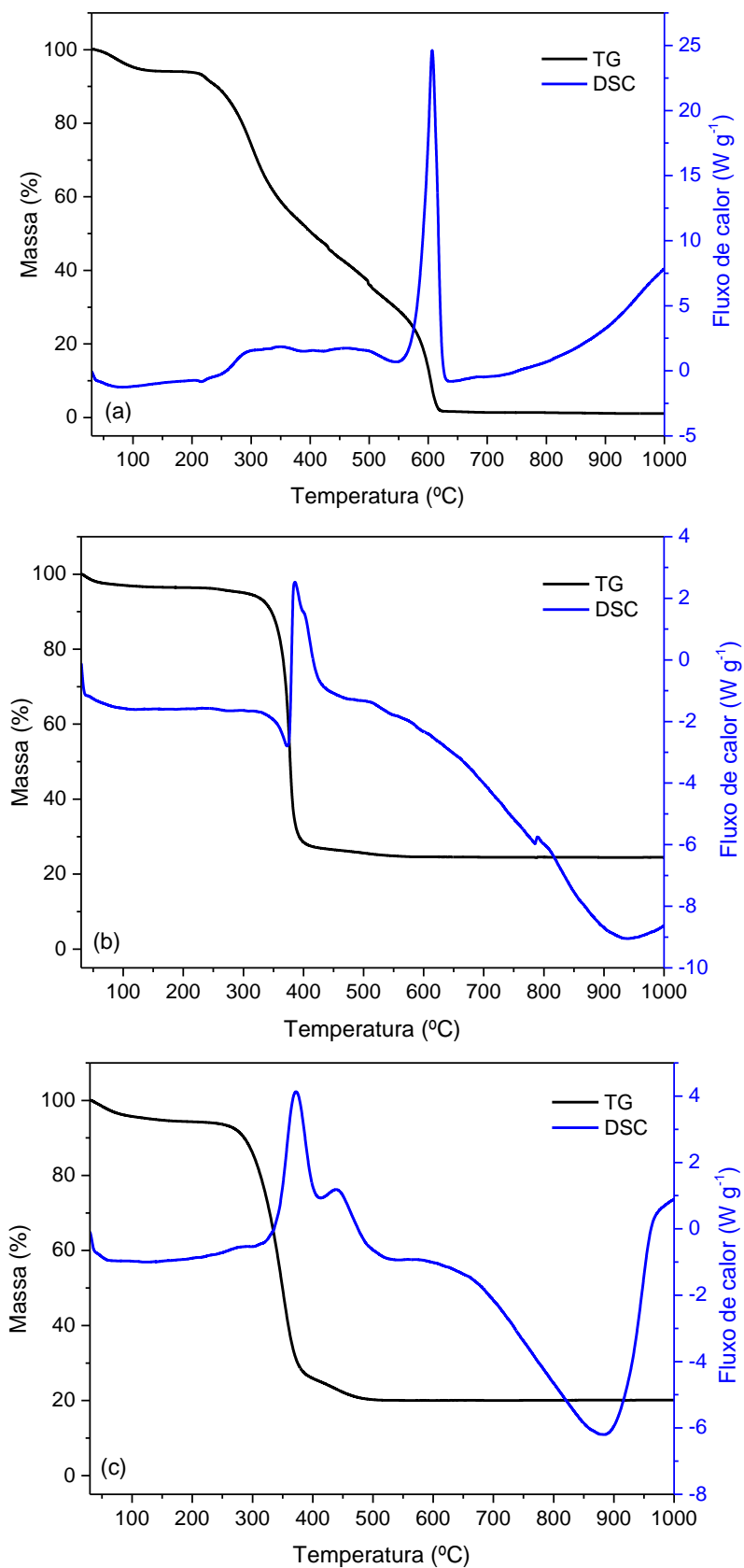


Figura 30 - Curvas de análise termogravimétrica e calorimetria diferencial exploratória para BSA (a), magneto MIP (b) magneto RAMIP@BSA (c).

Fonte: autor do trabalho.

Como mostra a Figura 31, os materiais apresentam perda de água adsorvida na sua estrutura até 100 °C. O PEG apresenta estabilidade térmica até a temperatura de 175 °C, após a qual há início do processo de decomposição, com perda de massa de 100%. O magneto RAMIP apresentou maior estabilidade (sem perda de massa significativa) do que o magneto RAMIP@PEG, cujas temperaturas de início de decomposição são, respectivamente, 310 °C e 255 °C.

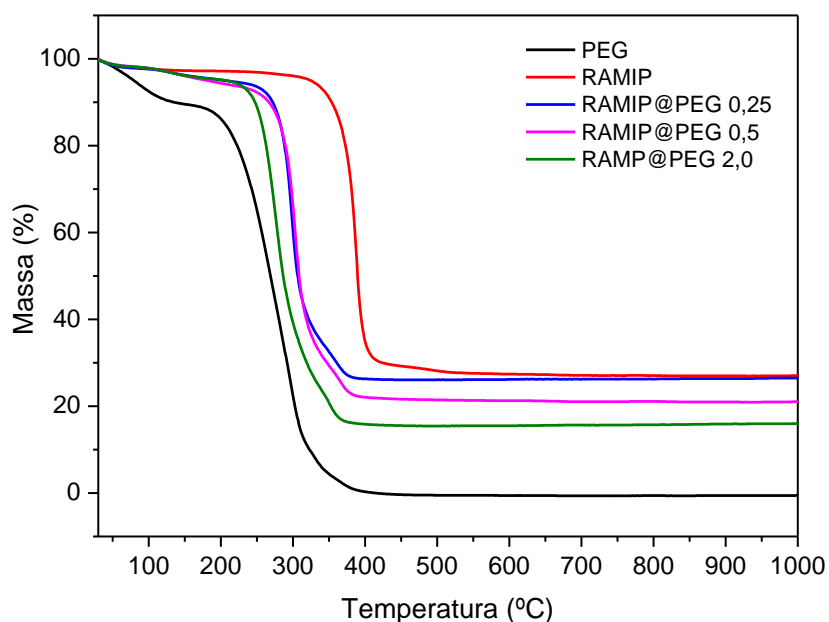


Figura 31 - Curvas de TG para PEG utilizado como modificador e os polímeros sintetizados.

Fonte: autor do trabalho.

Ademais é possível concluir que o PEG estava imobilizado no magneto RAMIP uma vez que o MIP@PEG apresentou perda de massa maior do que o magneto RAMIP, cujos valores são respectivamente 74,1%, 78,2% e 84,2%, restando com resíduo possivelmente os óxidos de ferro resultantes da decomposição da magnetita (os polímeros e agentes modificantes são componentes orgânicos totalmente decompostos no processo no intervalo de temperatura avaliado).

Além do mais, a perda de massa do RAMIP@PEG é proporcional à quantidade de PEG imobilizada. Com o aumento da proporção de PEG imobilizada há maior perda de massa; e, ao comparar com o RAMIP, e, uma vez que o PEG se decompõe totalmente, é possível concluir que a massa decomposta é referente ao PEG. Assim, pela diferença de massa dos resíduos (comparando MMIP e os RAMIP@PEG), é possível concluir que foi imobilizado de 1,8% de PEG (para proporção 1 polímero: 0,25 PEG) até 12,4% de PEG (para proporção de 1 polímero: 2 PEG).

4.1.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para sólidos

A análise de RMN dos polímeros sólidos foi realizada com o intuito de verificar se a BSA e o PEG foram imobilizados com sucesso na superfície do RAMIP, sendo possível acompanhar as mudanças no ambiente químico (tanto de ^1H quanto ^{13}C) devido à presença dos agentes modificantes. Para atribuição dos sinais, levou-se em conta a estrutura dos polímeros e modificantes; as quais são conhecidas. No entanto, por serem espectros de segunda ordem, tornou-se inviável realizar a integração ou cálculo da constante de acoplamento.

O RAMIP apresenta sinais de baixa intensidade com deslocamentos químicos típicos de hidrocarbonetos, todos em campo alto (Figura 32). Em 0,16 ppm observa-se o sinal de menor deslocamento químico; o qual pode ser atribuído para as hidroxilas dos comonômeros pró-hidrofílicos, utilizados na mesma proporção do monômero estrutural. Em 0,96 ppm há sinal dos hidrogênios correspondentes ao grupo metila. O sinal de 1,37 ppm é atribuído aos grupos metileno.

Ainda no RAMIP é possível analisar os sinais de menor intensidade, referentes aos hidrogênios dos ésteres (grupo funcional presente que se repete por toda unidade polimérica). Em 2,1 ppm observa-se o sinal referente aos hidrogênios α , os quais são desblindados pelo efeito anisotrópico da carbonila. E de 3,5 a 4,4 ppm observa-se um sinal largo e sem definição, corresponde aos hidrogênios do carbono ligado ao oxigênio por ligação simples. Eles apresentam desblindagem decorrente do efeito de eletronegatividade.

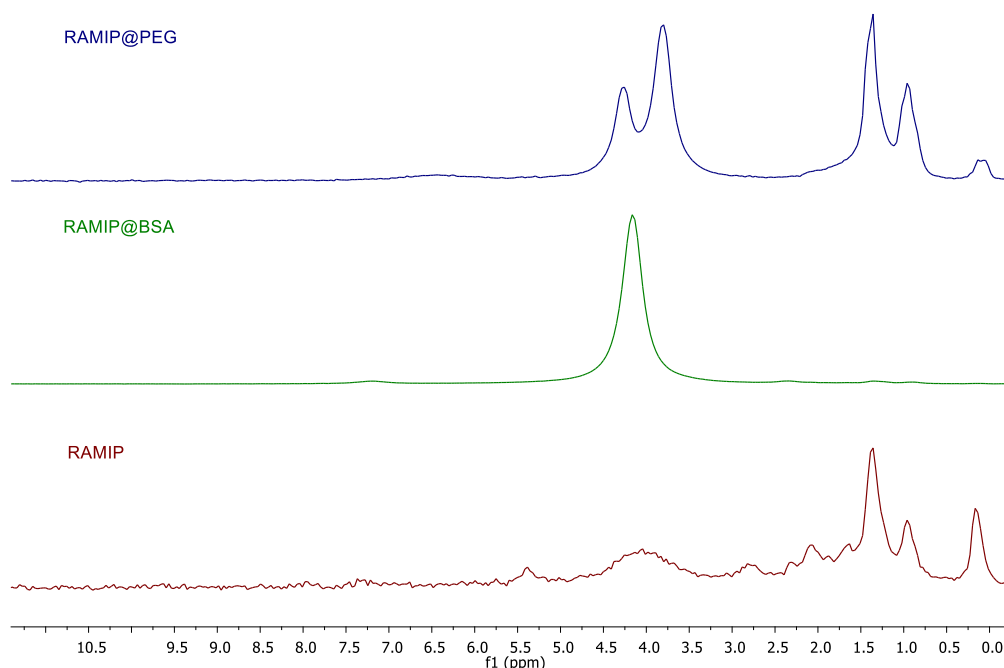


Figura 32 - Espectros de RMN de sólido ^1H do RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG (400 MHz).
Fonte: autor do trabalho.

No espectro de ^1H correspondente ao RAMIP@BSA observa-se um único e intenso sinal em 4,2 ppm, possivelmente pertencente aos hidrogênios do grupo amina; o qual é predominante na BSA devido aos aminoácidos que a compõe. Em comparação com o RAMIP, os sinais da cadeia polimérica desapareceram porque, como observado nas imagens de MEV, a BSA recobre totalmente o polímero e, por estar presente em excesso, apresenta um sinal intenso.

Para o RAMIP@PEG é observado um sinal intenso que se desdobra, formando um falso duplo dubleto com efeito telhado, o que indica que há acoplamento entre os prótons envolvidos no sinal – em campo alto do RAMIP e campo baixo do PEG. Analisando o espectro seria esperado sinal de hidrogênio da metila, um duplo duplo dubleto (correspondente à $[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_n$) e, no entanto, os sinais se misturam formando de um falso duplo dubleto; sendo um espectro de segunda ordem. O desdobramento e o efeito telhado podem ser atribuídos à simetria da molécula de PEG e devido ao ambiente químico diferente dos mesmos em contato com a superfície do polímero.

O espectro de ^{13}C (Figura 33) não fornece tantas informações porque a estrutura básica dos polímeros é basicamente a mesma: cadeias repetidas de ésteres e unidades de hidrocarbonetos. Assim, de 13 até 30 ppm há um sinal largo correspondente às ligações CH_2 e CH_3 . Em 45,2 ppm observa-se um sinal mais fino

e intenso correspondente à ligação C-O. Por fim, em 177,4 ppm visualiza-se o sinal correspondente à carbonila (C=O); sendo o carbono mais desblindado devido ao efeito de anisotrópico.

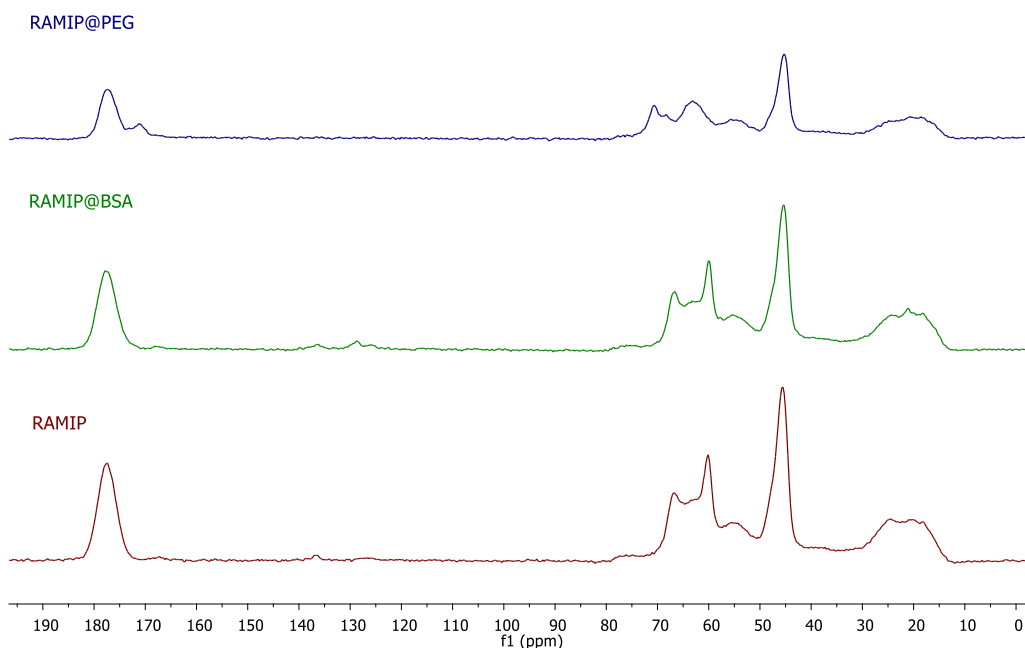


Figura 33 - Espectros de RMN de ¹³C dos sólidos RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG (400 MHz).
Fonte: autor do trabalho.

Ainda na região da carbonila, para o espectro do RAMIP@PEG, é interessante observar o aparecimento de um sinal em 171,2 ppm; sendo possível atribuir este sinal à reação de esterificação com PEG. Como a reação é feita na superfície utilizando grupos funcionais diferentes (mais a cadeia linear do PEG), as ligações de ésteres formadas estão num ambiente químico diferente da carbonila da estrutura principal do polímero (que provém do EGDMA); sendo assim, possível diferenciar a carbonila do PEG da carbonila do EGDMA.

4.1.2.6 Espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS)

A técnica de Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X (XPS) foi realizada para analisar a composição química superficial dos diferentes polímeros sintetizados.

Na técnica de XPS, fótons de raios X, ao incidirem na amostra interagem com os elétrons do material. Ao ganhar energia os elétrons atingem a superfície da amostra abandonando-a. Assim, a técnica mede a distribuição de energia de ligação dos

elétrons emitidos, sendo essa calculada pela diferença entre a energia do fóton primário e a energia cinética do fotoelétron.

Dos espectros de XPS obtidos (Figura 34), pelos valores de energia de ligação e porcentagem atômica (Tabela 9), mostram diferenças na quantidade de carbono e oxigênio (permitindo distinguir MMIP, RAMIP e RAMIP@PEG) e a presença de nitrogênio e enxofre (confirmando o recobrimento com BSA).

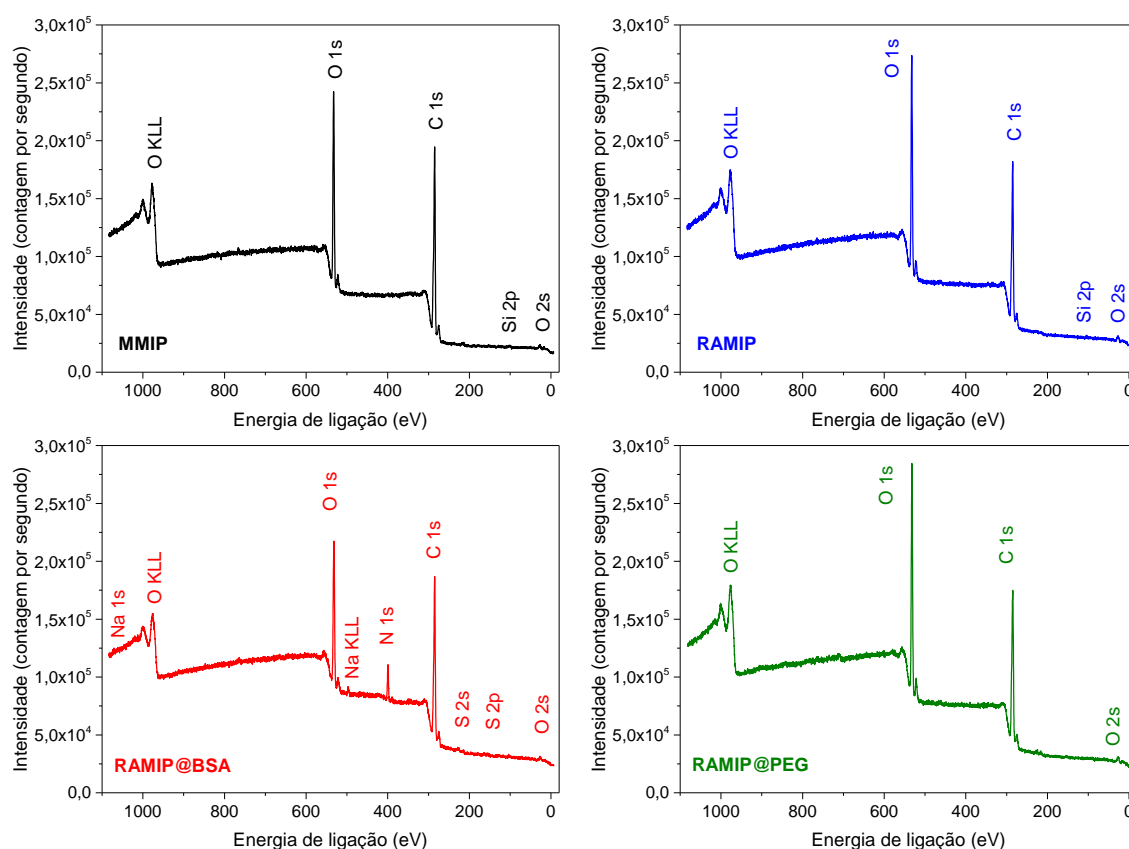


Figura 34 - Espectros de XPS para os diferentes polímeros sintetizados.
Fonte: autor do trabalho.

Tabela 9 - Energia de ligação (E.L) e porcentagem atômica (% At.) obtidas pelos espectros de XPS dos componentes presentes nos diferentes materiais

Material	C 1s		O 1s		N 1s		S 2p		Si 2p	
	E.L (eV)	% At	E.L (eV)	% At.	E.L (eV)	% At.	E.L (eV)	% At.	E.L (eV)	% At.
MMIP	285,0	74,7	532,7	24,5	-	-	-	-	100,7	0,80
RAMIP	285,3	71,2	532,3	28,6	-	-	-	-	103,5	0,25
RAMIP@BSA	285,1	71,1	531,8	21,5	399,5	6,50	165,1	0,40	103,6	0,60
RAMIP@PEG	285,0	70,2	532,3	29,7	-	-	-	-	102,7	0,07

Fonte: autor do trabalho.

A energia dos fotoelétrons é influenciada pela densidade eletrônica do átomo; sendo os percentuais relativos à composição elementar e energias das ligações apresentadas obtidos diretamente a partir das áreas das curvas.

As bandas mais intensas, em torno de 285,0 eV, são típicas do átomo de carbono; as que se localizam em torno de 400,0 eV se referem ao átomo de nitrogênio; e as demais, em torno de 530,0 eV, são bandas relacionadas aos grupos oxigenados. (108), (109).

É possível concluir, resumidamente, a partir dos dados da Tabela 9, que:

- Ocorreu imobilização dos grupos hidroxila na superfície do RAMIP, uma vez que, comparando este polímero ao MMIP, aumentou-se a porcentagem de oxigênio presente e houve aumento na energia de ligação do carbono;
- A presença dos elementos N e S comprovam a presença da proteína BSA na superfície do RAMIP. Esses elementos provêm dos aminoácidos e resíduos de aminoácidos que compõe a estrutura proteica – A BSA é composta por aminoácidos como Lisina (resíduo amino), Metionina e Cisteína (resíduo de S), dentre diversos outros. (110)
- O Na⁺ é um metal que está presente na estrutura terciária da BSA, assim como outros metais. (111) O índice KLL, como visto também para o elemento O em 978,6 eV é referente ao elétron removido do átomo pelo preenchimento do estado 1s (camada K) por um elétron da camada L, juntamente com a remoção de um elétron da camada L.
- As reações de polimerização sobre as nanopartículas modificadas são efetivas e apresentam grande homogeneidade, uma vez que a porcentagem de Si presente (componente principal da modificação da nanopartícula com TEOS) é de no máximo 0,8%.

A deconvolução das bandas da Figura 34 (C 1s, O 1s, N 1s e S 2p) apresentou o tipo de ligação e grupo funcional (exibindo assim os tipos de compostos orgânicos presentes)

Pela Figura 35 é possível observar que a deconvolução de N 1s mostra as ligações do nitrogênio com carbono (N-C) e com o hidrogênio (CN-H); confirmando a presença dos grupos aminos da proteína. Na deconvolução de S 2p é possível visualizar a ligação entre enxofre e carbono (S-C) em dois estados de spins diferentes.

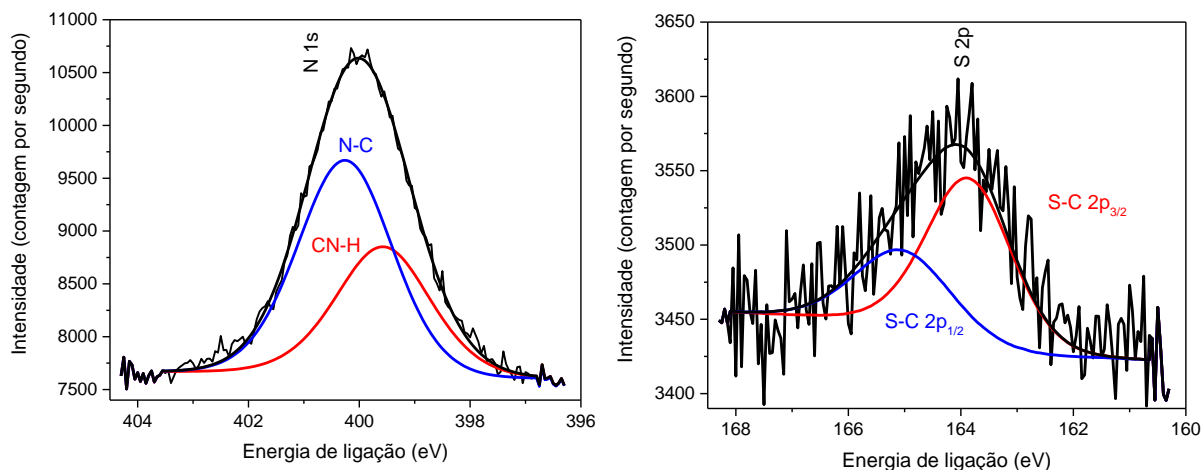


Figura 35 - Espectros de fotoelétrons para N 1s e S 2p da proteína BSA.

Fonte: autor do trabalho.

Para o RAMIP@PEG, a presença do modificador foi monitorada pela intensidade porcentagem das ligações C-O presentes no polímero; provenientes da reação de imobilização do PEG que foi realizada por meio de uma esterificação entre a hidroxila do RAMIP e o PEG ácido ativado (Figura 10), formando um éster. Portanto, foi monitorada a quantidade das hidroxilas e das ligações de éster, comparando-se RAMIP e RAMIP@PEG.

Assim sendo, foi realizada a deconvolução de O 1s e C 1s para RAMIP@PEG (Figura 31) e RAMIP (gráficos semelhantes ao do polímero modificado com PEG e, portanto, os dados não são exibidos aqui).

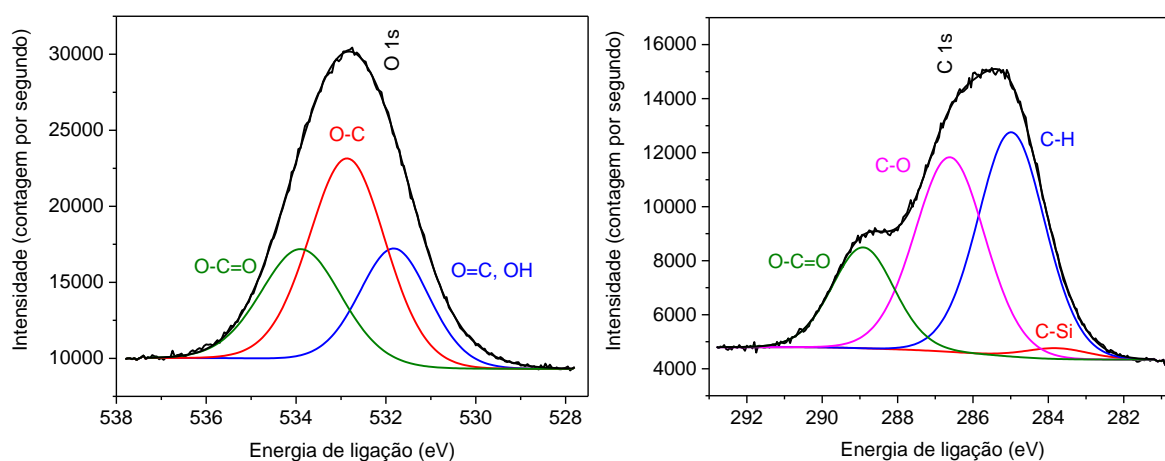


Figura 36 - Espectros de fotoelétrons para O 1s e C 1s do RAMIP@PEG.

Fonte: autor do trabalho.

Pelo cálculo da área dos picos de interesse, temos que a porcentagem de ligação éster (O-C=O) aumentou de 16,2% no RAMIP para 17,6 % no RAMIP@PEG;

enquanto que a porcentagem de hidroxila diminuiu de 25,14 % no RAMIP para 24,1 % no RAMIP@PEG. Mais ainda, houve aumento da ligação O-C de 42,0% do RAMIP para 45,9% no RAMIP@PEG.

Portanto, é possível concluir que a reação de imobilização e recobrimento do PEG sobre a superfície do RAMIP foi realizada com sucesso.

4.1.2.7 Adsorção e dessorção de nitrogênio com ajuste pelo método BET

Das principais diferenças entre MIP e NIP estão os poros que consistem na cavidade seletiva para o analito no MIP. Para medir a porosidade emprega-se a técnica de adsorção e dessorção de nitrogênio, sendo o método de BET (Brunauer, Emmett e Teller) usualmente utilizado para os polímeros impressos a fim de verificar a formação e tamanho dos poros dos polímeros (o que permite diferenciar MIP e NIP) pela medida de área superficial, uma vez que um tamanho de superfície maior é diretamente proporcional à quantidade de cavidades formadas.

Como os resultados de análise de BET para diferenciar MMIP e MNIP para biotina e verificar a eficiência da síntese dos mesmos já foram otimizados previamente (97), o foco da análise de BET foi determinar se as modificações realizadas na superfície do MMIP ocasionaram alguma interferência na superfície ou cavidades do MMIP. Assim, a síntese foi otimizada avaliando-se também o impacto da proporção dos agentes modificantes (BSA de 1 a 3% e PEG de 0,25 até 2,0 para 1,0 de RAMIP) em contato com o MMIP.

Pela Tabela 10 observa-se que a aplicação da BSA na superfície do MIP não se apresentou efetivo como esperado. A área superficial do RAMIP vai diminuindo conforme há um incremento na concentração de BSA depositada, o que indica que as cavidades seletivas ficam menos expostas. Este fato também é comprovado pela drástica diminuição no volume dos poros que ocorre com o aumento da porcentagem de BSA; e, quando comparados ao MMIP, ocorre um decréscimo de até quatro vezes na quantidade de poros. Esse resultado é corroborado pelas imagens de MEV (Figura 24), que mostra que a BSA recobre toda superfície do polímero, diminuindo a disponibilidade dos poros e, conseqüentemente, das cavidades seletivas.

Tabela 10 - Resultados da porosidade obtidos pelas isotermas de BET para as amostras de MMIP e suas modificações com diferentes concentrações BSA

Material	Área Superficial / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Volume médio dos poros / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
MMIP	62,2	0,0832
RAMIP	20,2	0,0611
RAMIP@BSA 1%	15,1	0,0668
RAMIP@BSA 2%	11,8	0,0325
RAMIP@BSA 3%	8,6	0,0298

Fonte: autor do trabalho.

A Tabela 11 apresenta os resultados de BET para o RAMIP@PEG, os quais se apresentaram altamente satisfatórios. Ocorreu um aumento da área superficial devido à formação de uma nova camada polimérica ao redor do RAMIP e, no entanto, o volume médio dos poros se manteve basicamente constante: $0,10 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ para o RAMIP com média de $0,129 \pm 0,004 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ para o RAMIP@PEG. Esse resultado é relevante uma vez que independente da proporção de PEG utilizado o polímero é recoberto com o modificador (como mostram as outras técnicas de caracterização) e ao mesmo tempo mantém as cavidades seletivas expostas para ligação com a biotina.

Tabela 11 - Resultados da porosidade obtidos pelas isotermas de BET para as amostras de MMIP e suas modificações com diferentes concentrações de PEG

Material	Área Superficial / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Volume médio dos poros / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
RAMIP	20,0	0,100
RAMIP@PEG 1,0: 0,25	42,0	0,131
RAMIP@PEG 1,0: 0,5	46,8	0,124
RAMIP@PEG 1,0: 2,0	39,0	0,132

Fonte: autor do trabalho.

4.1.3 Otimização das condições cromatográficas para análise da biotina

Após devidamente caracterizadas, todas as sínteses tiveram seu desempenho avaliado frente à capacidade de religação com a biotina, cuja quantificação foi monitorada por HPLC. Para tanto, o método de análise foi desenvolvido.

Baseando-se em métodos reportados na literatura, foram analisadas diferentes condições de composição da fase móvel (solução tampão fosfato, MeOH, ACN, NaH_2PO_4 , etc.), como descrito no procedimento experimental (item 3.3.3.2).

Após variação das condições experimentais com os diversos eluentes (resultados não exibidos), a Figura 37 exhibe o cromatograma para a melhor condição de separação e quantificação obtida. A fase móvel foi composta por solução aquosa contendo 0,1% de H_3PO_4 com acetonitrila (ACN) na proporção 80:20 (v/v), a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ no modo isocrático; detecção utilizando comprimento de onda de 210 nm e volume de injeção de amostra de $10 \mu\text{L}$.

No cromatograma (Figura 37) é possível observar que o analito apresenta um pico com alta intensidade de sinal, simétrico (sem calda) e tempo de retenção de 6,0 min. Além disso, apresentou um bom fator de retenção ($\kappa = 1,6$); quando comparado com o ideal: um valor entre 1 e 5 – para que o analito não elua com o volume morto ($\kappa = 1$) ou com altos tempos de retenção (acima de 5).

Curvas analíticas foram construídas para cada análise realizada. A Figura 38 exemplifica uma curva que apresenta linearidade; com $R^2 = 0,9998$, na faixa de concentrações de biotina de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $100,0 \text{ mg L}^{-1}$.

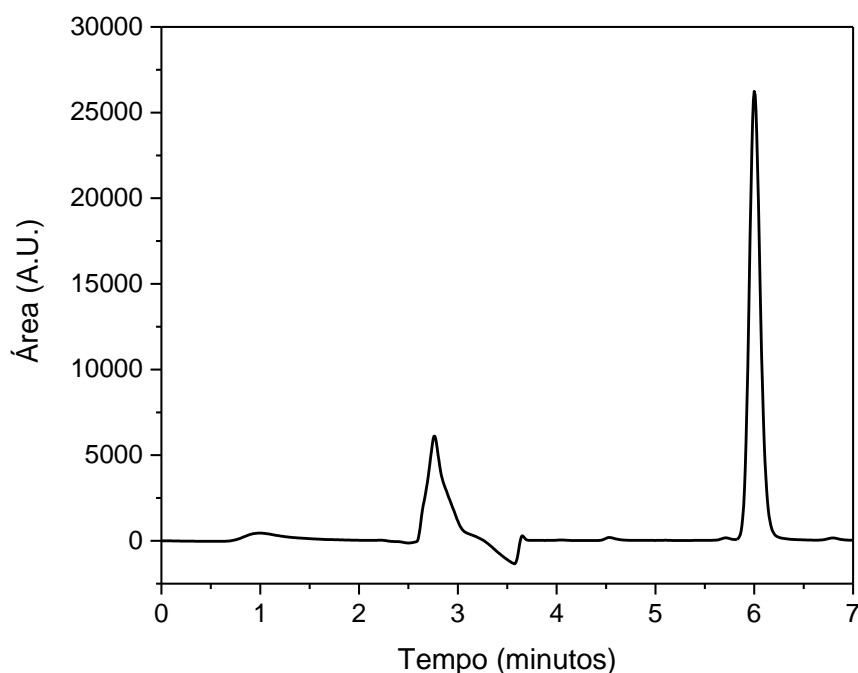


Figura 37 - Cromatograma HPLC/UV para $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ de biotina solubilizada em metanol; com tempo de retenção em 6,0 min.

Fonte: autor do trabalho.

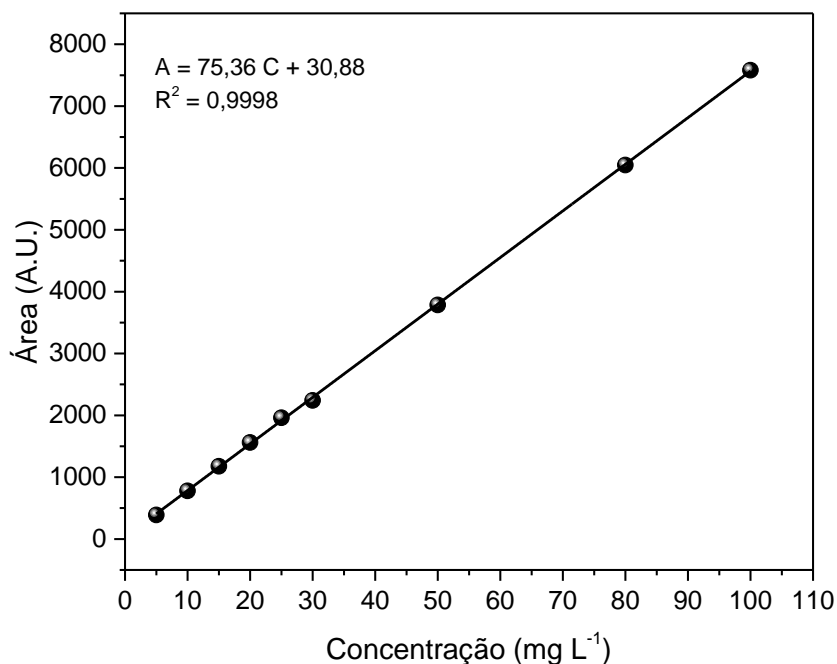


Figura 38 - Curva analítica obtida por HPLC com método otimizado para análise de biotina (em intervalo de concentração de 5,0 até 100,0 mg L⁻¹) solubilizada em metanol.

Fonte: autor do trabalho.

Para a análise de moléculas como biocitina e tetraciclina nos estudos de seletividade também foi otimizado o método cromatográfico para quantificação (resultados não exibidos).

4.1.4 Avaliação da capacidade de exclusão proteica

Uma vez que os materiais foram amplamente caracterizados e as modificações foram confirmadas, avaliou-se a performance do MMIP, RAMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG na exclusão proteica.

Os polímeros foram colocados em contato com diferentes concentrações de BSA preparada em solução tampão fosfato a pH = 6,0. Após separação magnética, as soluções foram levadas para análise. Os resultados de porcentagem de exclusão proteica para os polímeros são apresentados nas tabelas 12 e 13 a seguir.

Tabela 12 - Porcentagem de proteína retida (em relação à concentração padrão adicionada inicialmente) para o MMIP e diferentes RAMIP@BSA

Concentração padrão de BSA (%)	Quantidade de proteína retida (%)			
	MMIP	RAMIP@BSA 0,5%	RAMIP@BSA 1,0%	RAMIP@BSA 2,0%
0,1	10,4	-13,8	-4,8	23,1
0,5	6,9	18,4	13,1	15,9
1,0	11,7	21,0	14,6	16,8

Fonte: autor do trabalho.

Pela Tabela 12 é possível observar que a modificação com BSA não foi bem-sucedida; uma vez que, ao comparar-se os valores de retenção proteica entre MMIP e RAMIP@BSA, este último apresentou valores muito maiores (independente da % de BSA utilizada para recobrir o MMIP). Isso pode ser explicado porque no pH trabalhado a BSA apresenta cargas (uma vez que seu $pI = 4,7$) e, portanto, ocorre interação das proteínas em solução com a proteína que recobrem o polímero.

Alguns valores negativos obtidos podem ser explicados por falhas na medida, como turbidez da solução (se não for agitada de modo homogêneo, a BSA torna-se turva); ou a proteína em contato com o polímero, sob agitação forte, pode remover a camada polimérica da nanopartículas por atrito mecânico, fazendo com que o excesso de material que fica no meio proporcione uma absorbância maior do que os padrões; gerando valores negativos na porcentagem de retenção.

Como o recobrimento do MMIP com a BSA não é homogêneo, os valores observados na Tabela 12 não apresentam um padrão. Dessa forma, a BSA não se apresentou como uma boa candidata para modificar o MMIP visando a obtenção de um material com acesso restrito.

Tabela 13 - Porcentagem de proteína retida (em relação à concentração padrão adicionada inicialmente) pelos diferentes RAMIP@PEG

Concentração padrão de BSA (%)	Quantidade de proteína retida (%)					
	Síntese 1	Síntese 2	Síntese 3	Síntese 4	Síntese 5	Síntese 6
0,1	1,4	0,61	2,5	3,2	0,50	3,9
0,5	6,7	2,8	2,5	0	4,4	5,7
1,0	22,2	16,3	7,0	14,9	14,8	15,2

Fonte: autor do trabalho.

A Tabela 13 apresenta os resultados de exclusão proteica para as diferentes sínteses do RAMIP@PEG. Devido às diferentes quantidades de PEG recobrimo o

MMIP, os resultados obtidos apresentaram variações. O resultado mais promissor obtido foi para a síntese 2, na qual é utilizada a proporção equivalente a 1 RAMIP: 0,25 PEG; a segunda menor de todas.

O experimento foi repetido para a síntese 2 e a faixa de exclusão proteica ficou entre $97,8 \pm 2,2$ e $96,0 \pm 1,8$ % de proteínas excluídas; respectivamente, para as concentrações de 0,1 e 0,5% de solução padrão de BSA.

No caso da maior concentração de BSA padrão, 1,0%, para todas as sínteses (MMIP, RAMIP@BSA e RAMIP@PEG) os polímeros apresentaram alto valor de retenção. Uma possível explicação é a saturação de proteínas em solução, sendo 1,0% uma concentração elevada para experimentos utilizando proteínas.

Os valores para os polímeros controle (resultados não apresentados) - MNIP, RANIP@PEG e RANIP@BSA - foram semelhantes aos das tabelas acima, uma vez que a superfície modificada deles é a mesma que dos polímeros impressos. Como a diferença entre eles é a cavidade seletiva, para esse experimento, não há necessidade de comparação entre polímero impresso e não impresso.

4.1.5 Avaliação da eficiência dos polímeros com acesso restrito

4.1.5.1 RAMIP@BSA

Como tanto os resultados de caracterização quanto exclusão proteica não foram promissores para o RAMIP@BSA, ao invés deste ser otimizado (exigindo tempo e gasto de reagentes), foi realizado apenas um teste preliminar para verificar a capacidade de ligação deste polímero pela biotina.

O RAMIP@BSA foi finalmente descartado para uso mostrando-se ineficaz após os ensaios de ligação, tanto com biotina quanto com outras moléculas. Como mostra a Figura 39 a seguir, quando comparado com o MMIP, conforme aumenta a % de BSA imobilizada, ocorre aumento da quantidade de biotina retida por g de polímero – valor representado por Q, o qual poder calculado a partir da seguinte relação:

$$Q = \frac{(C_i - C_e) \times V}{m}$$

Onde C_i é a concentração inicial do analito, C_e a concentração remanescente no equilíbrio, V é o volume de solução adicionada e m representa a quantidade (em gramas) de material adsorvente (MMIP).

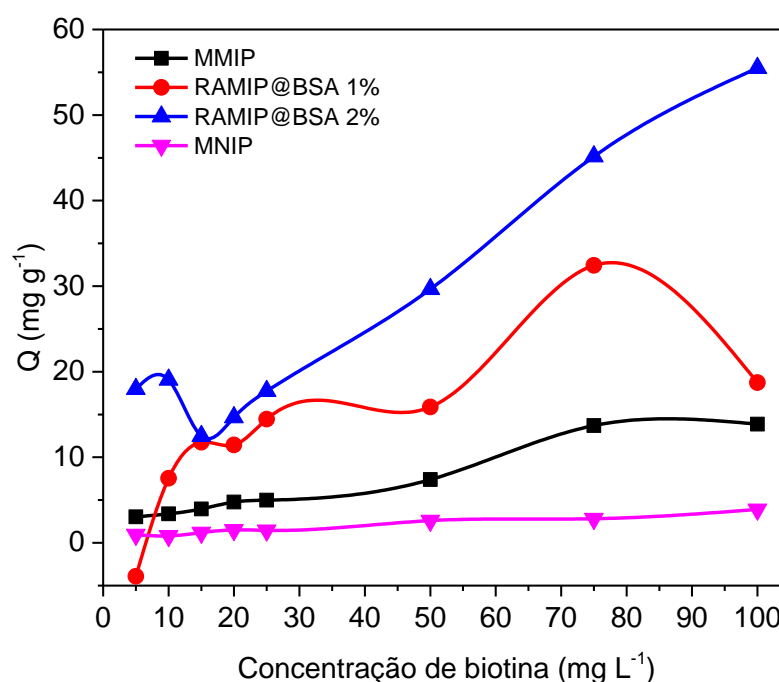


Figura 39 - Isotermas de ligação da biotina (em intervalo de concentração de 5 até 100 mg L⁻¹ solubilizada em metanol) em contanto com 10,0 mg dos diferentes polímeros.

Fonte: autor do trabalho.

Como mostraram as caracterizações, a proteína encobre a superfície do MMIP (MEV) e veda as cavidades seletivas (diminuição do volume de poros; análise de BET). Assim, era esperado que a ligação de biotina no RAMIP@BSA fosse baixa. No entanto, a quantidade de massa de biotina ligada por grama de aumentam com o aumento da quantidade de BSA imobilizada.

Avaliando as estruturas químicas das moléculas e o pH utilizado (6,0) é possível concluir que ocorre interação inespecífica entre a biotina e BSA. Embora ambas moléculas estejam com carga global negativa ($\text{pH} > \text{pK}_a$ da biotina e $\text{pH} > \text{pI}$ soelétrico da BSA), a proteína possui grande quantidade de resíduos de aminoácidos livres e com diferentes cargas (devido à variada composição dos mesmos). Havendo a possibilidade de interação entre analito e proteína tanto por interação iônica quanto por ligações de hidrogênio.

Portanto, ficou comprovado que ocorre ligação inespecífica entre biotina e RAMIP@BSA, o que ocasiona a perda de seletividade do polímero impresso. Foram construídas isotermas (Figura 40) que mostram a ligação inespecífica entre a biocitina; para a qual muda totalmente o comportamento da isoterma e, para a tetraciclina, não houve retenção significativa nos polímeros. Para a biocitina os resultados obtidos foram semelhantes à isoterma com biotina: com o aumento da % de BSA presente, houve aumento da quantidade de analito ligada ao polímero.

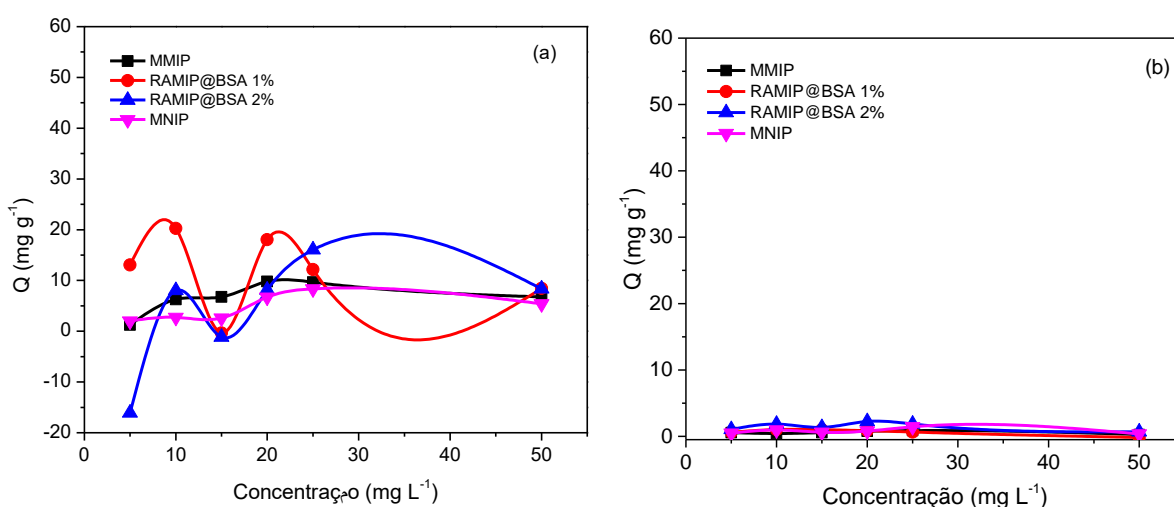


Figura 40 - Estudos de ligação para (a) biocitina e (b) tetraciclina solubilizadas em MeOH, com faixa de concentração de 5,0 até 50,0 mg L⁻¹, em contato com 10,0 mg dos diferentes polímeros (t = 2 h).

Fonte: autor do trabalho.

4.1.5.2 RAMIP@PEG

Com o intuito de maximizar a retenção da biotina ao RAMIP@PEG foram otimizadas diferentes condições de reação; como tempo de interação para atingir o equilíbrio, solvente de ligação e massa de adsorvente. Em todas as etapas as quantificações foram realizadas por HPLC.

O primeiro estudo realizado foi a natureza do solvente no qual a biotina deve ser solubilizada para interagir com o polímero, sendo que o meio no qual o analito está solvatado interfere diretamente na ligação do mesmo com o polímero. Como mostra a Figura 41, foram avaliadas soluções aquosas, orgânicas e misturas em diferentes proporções entre elas.

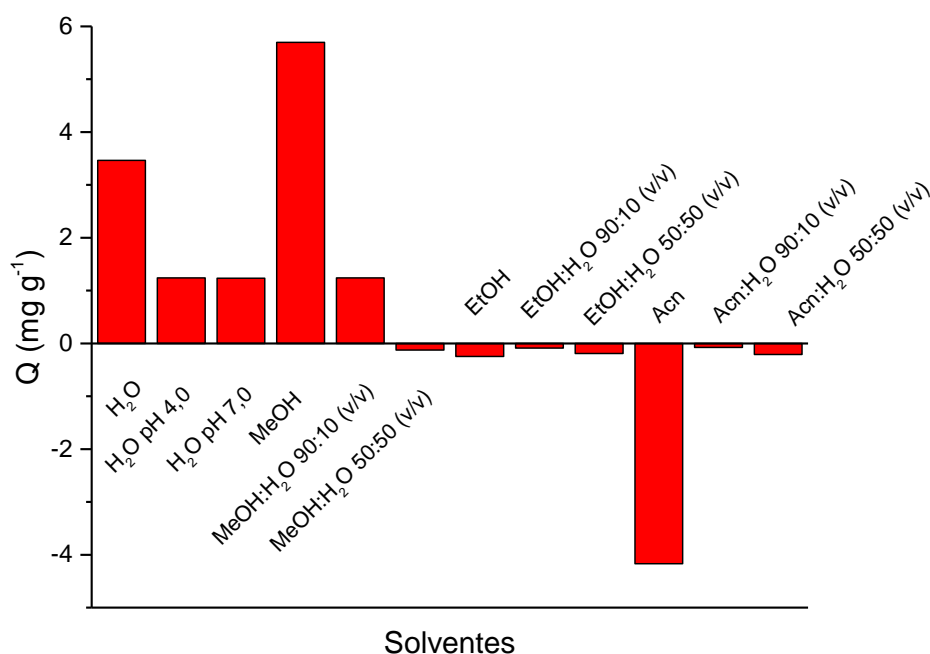


Figura 41 - Otimização do tipo de solvente contendo 20,0 mg L⁻¹ de biotina para interação com o RAMIP@PEG (10,0 mg).
Fonte: autor do trabalho.

Dos diversos tipos de solução avaliadas MeOH foi a qual apresentou melhores resultados, com um Q de aproximadamente 5,7 mg de biotina retida por grama de polímero; sendo o solvente adotado para os posteriores estudos. É interessante observar que o valor cai quando adicionada água (90:10 v/v) e diminui mais ainda com aumento da quantidade de água na mistura (50:50 v/v).

Para as soluções aquosas a H₂O destilada mostra o segundo maior valor de retenção, sendo que este diminui ao ajustar o pH; possivelmente por interferência do

HCl e NaOH utilizados para adequar o pH para valor ácido e outro básico. Etanol, ACN e todas as misturas apresentaram valores negativos. Uma possível explicação é que a biotina ao invés de se ligar ao MIP tem preferência por permanecer solvatada. Tal fenômeno possivelmente ocorre pela mudança nas constantes dielétricas e capacidade de solvatação dos solventes ao serem misturados.

O segundo procedimento estudado foi a dosagem da massa de polímero para reconhecimento da biotina, com variação de massa de 5 até 75,0 mg e concentração de biotina fixa em 50,0 mg L⁻¹; cujo resultado é apresentado na Figura 42.

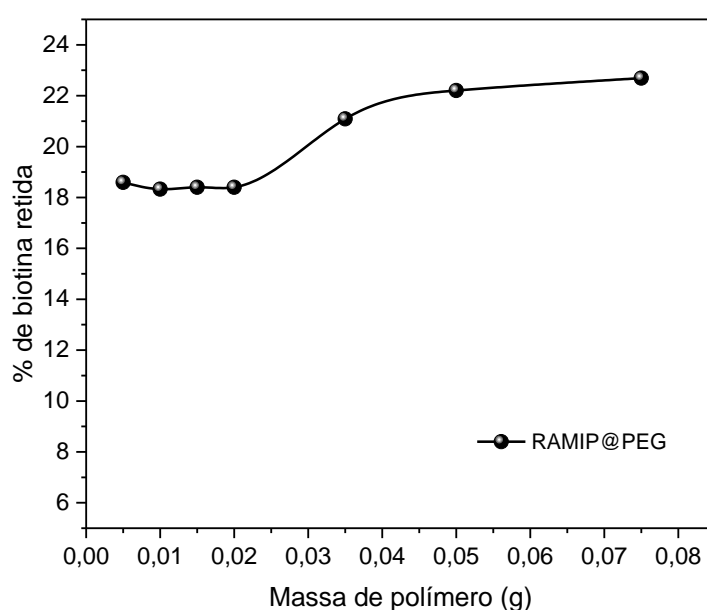


Figura 42 - Dosagem de massa do adsorvente RAMIP@PEG (em intervalo analisado de 5,0 até 75,0 mg) em contato com biotina (50,0 mg L⁻¹ solubilizada em MeOH).

Fonte: autor do trabalho.

O estudo de massa mostrou que a porcentagem de retenção da biotina permaneceu em uma faixa sem grandes variações (de 18 a 24% de retenção) com o aumento significativo de massa. Portanto, para as análises que se seguiram optou-se por trabalhar com a concentração de massa de polímero fixa em 5,0 mg.

O terceiro experimento realizado foi avaliar o melhor tempo de interação entre o analito e o polímero, ou seja, o tempo de equilíbrio; no qual ocorre adsorção da maior quantidade de biotina no polímero (Figura 43).

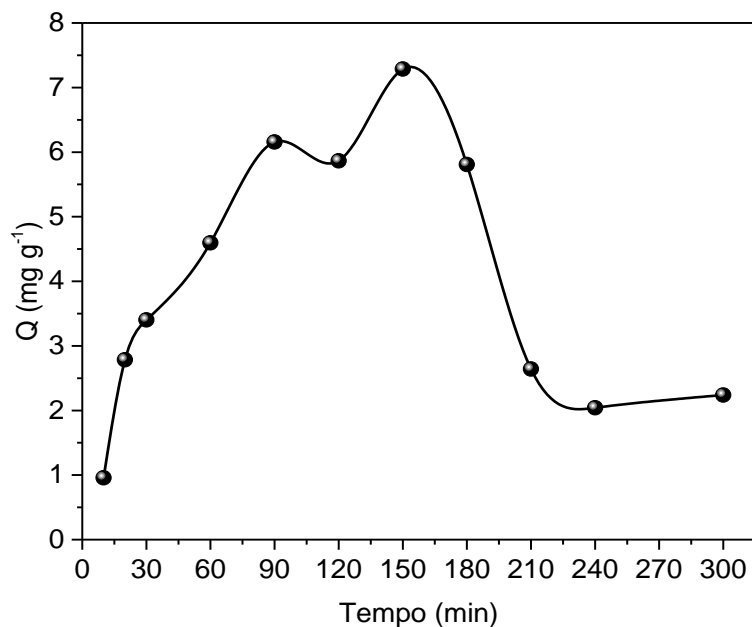


Figura 43 - Otimização do tempo de equilíbrio entre RAMIP@PEG e biotina, avaliando um intervalo entre 10 min e 300 min, sendo fixada a massa de RAMIP@PEG em 5,0 mg e concentração de biotina de 50,0 mg L⁻¹ em MeOH.

Fonte: autor do trabalho.

Pela otimização do tempo de equilíbrio a maior retenção de biotina aconteceu entre os tempos de 90 e 180 min. Após 180 min ocorre dessorção da biotina, com uma diminuição muito grande do valor de Q. Como no intervalo entre 90 e 180 min a variação de Q não foi considerável (menor do que uma unidade), o tempo de 90 min foi escolhido como o melhor para as análises, já que apresenta maior valor de Q e ainda não está próximo de ocorrer a dessorção como em 180 min.

4.1.5.2.1 Isoterma de adsorção para o RAMIP@PEG

A isoterma de adsorção representa a quantidade de determinado soluto adsorvido por uma superfície adsorvente. Esse ensaio de afinidade exprime Q (sendo a quantidade em massa de analito retido por massa de adsorvente) em função da concentração do soluto. (112)

Para a construção da curva de isoterma de adsorção colocou-se em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido em diferentes concentrações iniciais (de 5,0 até 100,0 mg L⁻¹) e em temperatura ambiente até o equilíbrio (tempo de 90 min) com o adsorvente (5,0 mg dos polímeros modificados com PEG); determinando-se assim a quantidade de material adsorvido; como exibido na Figura 44

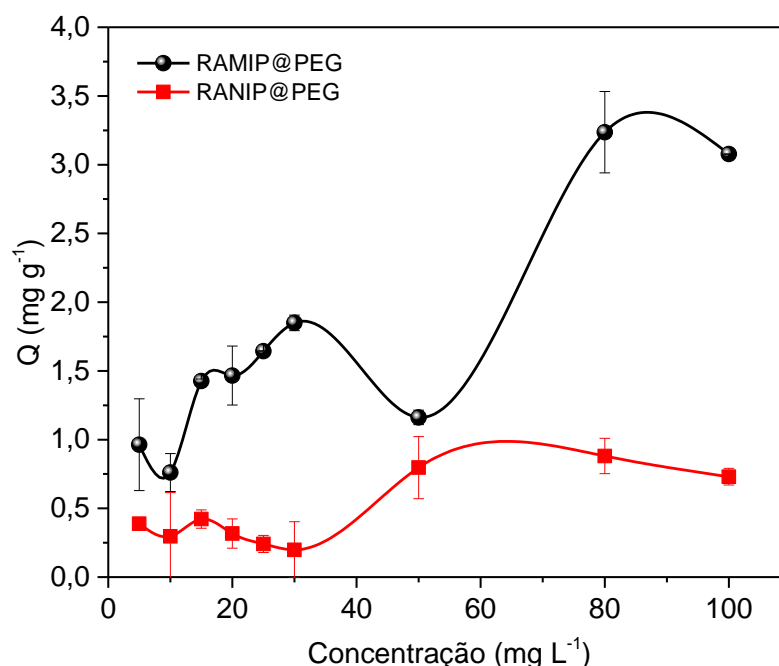


Figura 44 - Isoterma de adsorção para biotina (de 5,0 até 100,0 mg L⁻¹ em MeOH) em contato com os polímeros (10,0 mg) com tempo de interação de 90 minutos.

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 44 exibe a isoterma de adsorção obtida com todas as condições experimentais otimizadas. Embora o ponto de 50,0 mg L⁻¹ não apresentou o padrão de crescimento como ocorreu anteriormente com as outras concentrações no RAMIP@PEG, a isoterma apresenta-se com o perfil desejado: no polímero impresso há aumento da quantidade de biotina adsorvida com o aumento da concentração. Ao comparar com o polímero não-impresso (que apresenta menores valores de Q) é possível ver que a biotina está adsorvendo na cavidade seletiva, a qual continua disponível após a modificação com PEG.

É possível concluir que a concentração ideal para análise do RAMIP@PEG pela biotina é 30,0 mg L⁻¹, uma vez que no intervalo de concentrações é o que apresenta maior valor de Q e maior diferenciação entre os polímeros impresso e não-impresso.

4.2 MMIP semicovalente

4.2.1 Síntese e caracterização do complexo-analito monômero

O conceito da síntese do MIP semicovalente envolve, basicamente, realizar uma ligação covalente entre o analito e o monômero funcional, sendo que essa molécula gerada é o template para a síntese. Após o processo de síntese (com impressão molecular covalente) e remoção do template - por uma reação de clivagem química, como uma hidrólise, por exemplo - o polímero, ao ser submetido para os ensaios de ligação com analito, é colocado em condições onde o processo de reconhecimento entre os sítios funcionais do material e o analito é realizado por meio de uma ligação não covalente. Dessa junção da aplicação dos dois tipos de ligação química surgiu o MIP semicovalente, que une as vantagens de ambas as técnicas de ligação.

Assim, inicialmente foi realizada a síntese da biotina alil éster, obtida segundo procedimento detalhado no item 3.1.5.1.5 e segundo esquema da Figura 5, para a qual foi realizada uma reação de esterificação a biotina e o álcool alílico (monômero funcional).

A reação foi acompanhada avaliando o produto formado por RMN de ^1H (Figura 45 e Figura 46) e FTIR (Figura 47).

Comparando as estruturas da biotina e da biotina alil éster e analisando os espectros de RMN da biotina alil éster é possível observar que a maior parte dos sinais estão iguais à da biotina (Figura 46). A maior diferença está no surgimento dos sinais em 5,89 (d) e 5,44 ppm (d), 5,94-5,87 ppm (m), 5,3 ppm (d) e 5,2 ppm (d).

Em 5,2 e 5,3 ppm há os dubletos corresponde ao acoplamento entre os hidrogênios vinílicos terminais. No intervalo de 5,87 até 5,94 ppm é possível observar um multiplete relacionado ao hidrogênio metino do carbono alílico, cuja multiplicidade ocorre devido ao acoplamento com todos os hidrogênios vizinhos (tanto com os hidrogênios metilênicos quanto os hidrogênios vinílicos terminais), cuja sobreposição dos sinais gera o multiplete. Em 5,44 ppm e 5,89 ppm observa-se um dubleto altamente separado correspondente aos hidrogênios metilênicos. Essa separação ocorre porque porque esses hidrogênios do grupo CH_2 são diastereotópicos e possuem desblindagem ocasionada pelo efeito anisotrópico dos cones gerados tanto pela carbonila quanto pela ligação dupla terminal.

Ademais é possível observar que o sinal do hidrogênio correspondente ao ácido carboxílico da biotina (em 12,0 ppm na Figura 45) não é mais observado no espectro da biotina alil éster, indicando que a reação de esterificação ocorreu efetivamente.

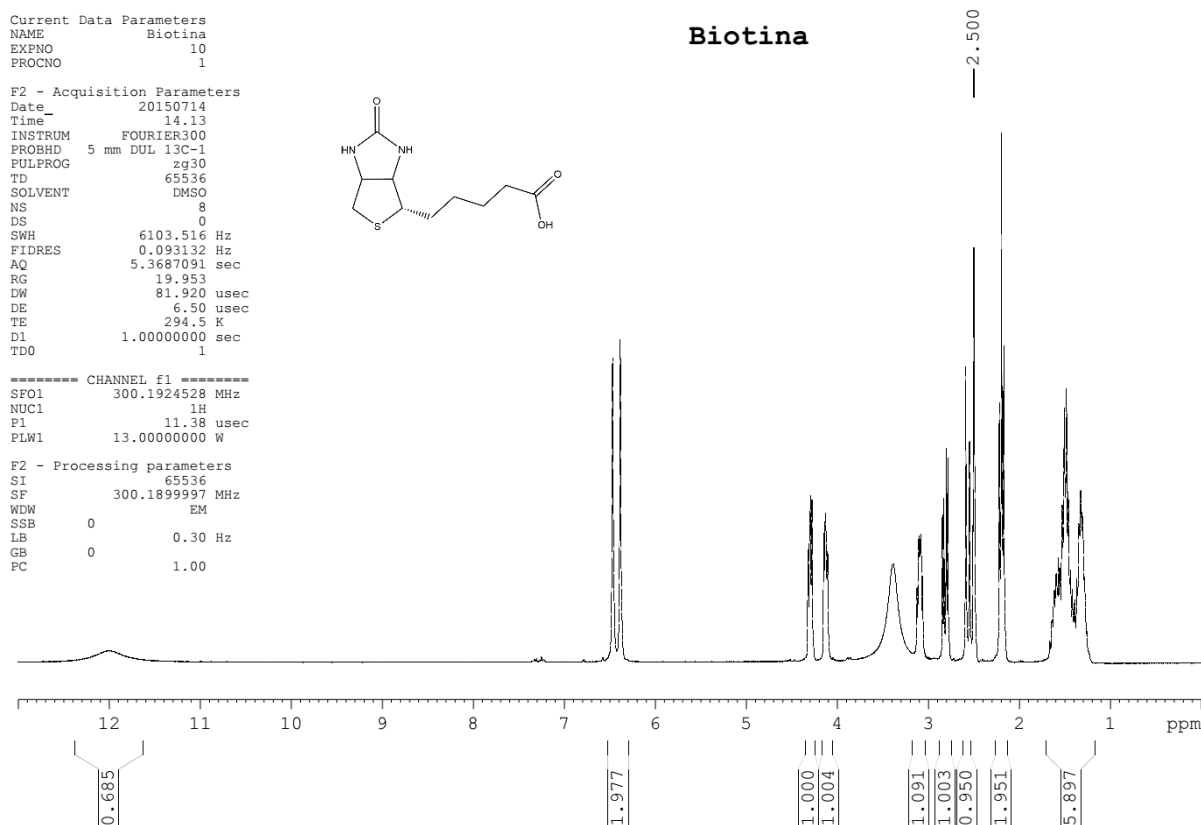


Figura 45 - Espectro de RMN ^1H para a biotina (DMSO- d_6 , 300 MHz).

Fonte: autor do trabalho.

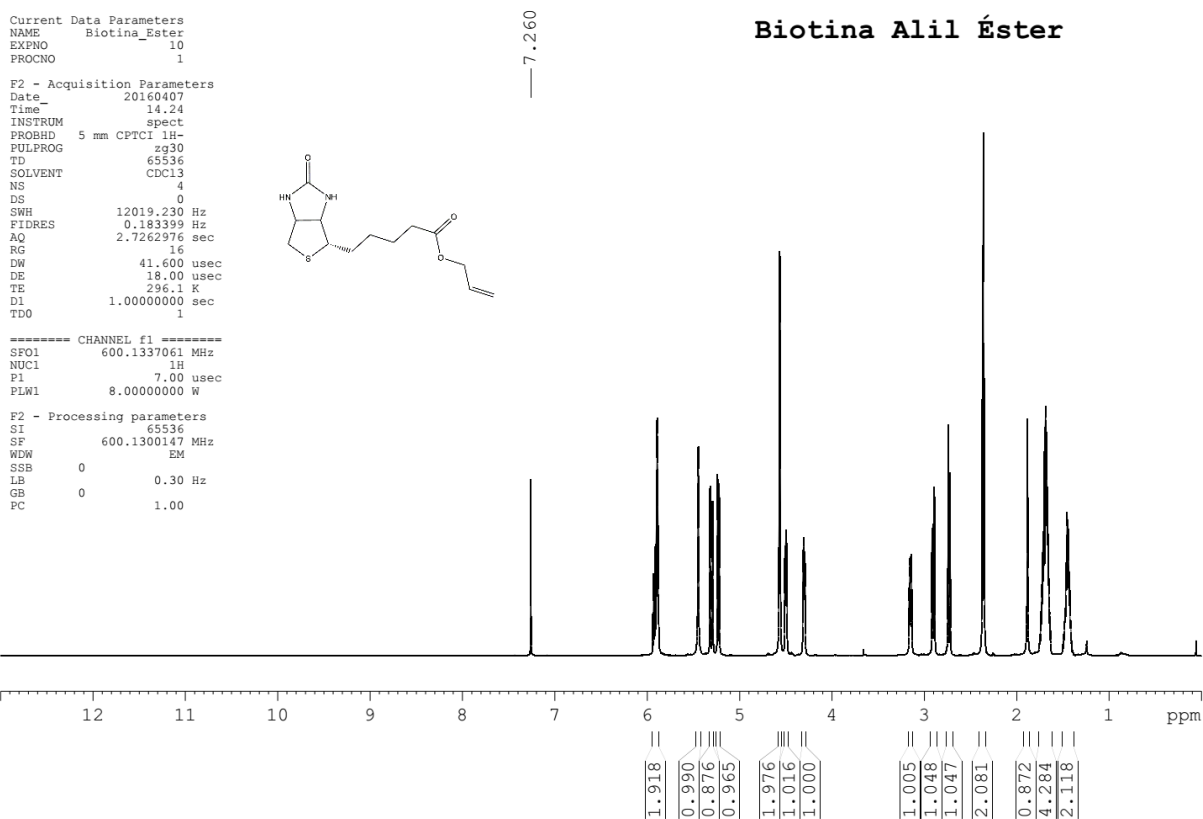


Figura 46 - Espectro de RMN ^1H para biotina alil éster ($\text{CHCl}_3\text{-d}$, 600 MHz).

Fonte: autor do trabalho.

Avaliando os espectros de IV (Figura 47) e pelas tabelas com atribuição das bandas (Tabela 14 e Tabela 15) também é possível caracterizar a síntese realizada.

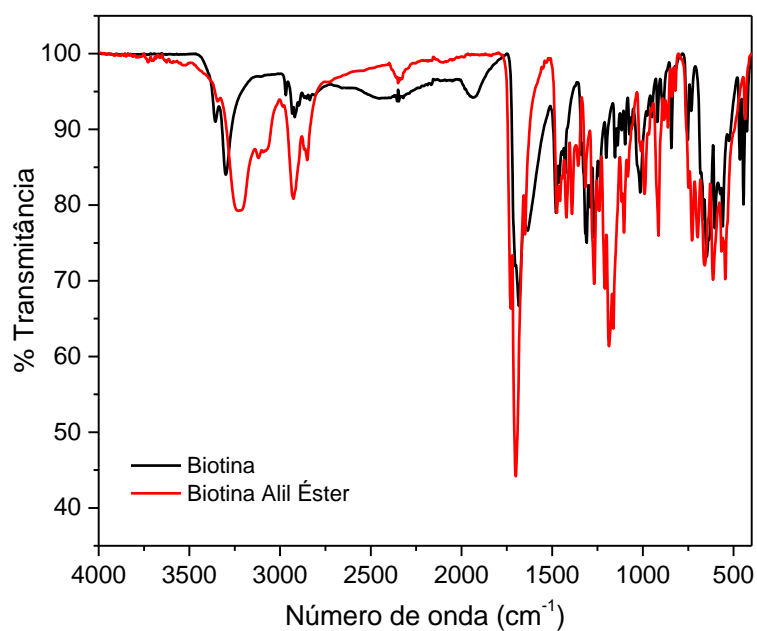


Figura 47 - Espectro na região do infravermelho para biotina e biotina alil éster.

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 14 - Atribuição das bandas com maior intensidade do espectro de IV da biotina

Principais bandas (cm⁻¹)	3360	3200	2980-2820	1680	1633	1460	1320-1250
Atribuições	v O-H livre	v N-H	v C-H sp ³	v C=O com sobreposição de δ N-H		δ CH ₂	v C-O

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 15 - Atribuição das bandas com maior intensidade do espectro de IV da biotina alil éster

Principais bandas (cm⁻¹)	3235	3115	2980-2820	1725	1690	1650	1633	1320-1250	985	920
Atribuições	v N-H	v C-H sp ²	v C-H sp ³	v C=O éster	v C=O amida	δ N-H	δ CH ₂	v C-O	δ vinil fora do plano	

Fonte: autor do trabalho.

Ao modificar a biotina, o estiramento OH correspondente ao ácido carboxílico (3360 cm⁻¹) não é mais observado, somente observa-se o estiramento NH do grupo amida. Em 3115 cm⁻¹ é observada uma banda de pequena intensidade, característica de estiramento de carbono sp²; o que indica a presença do grupo alílico inserido na terminação da molécula.

Com a modificação do grupo ácido carboxílico para éster, a região correspondente aos estiramentos de carbonila tornou-se mais definida e, em 985 e 920 cm⁻¹ há bandas de dobramento características do grupo vinila.

Portanto, após a síntese bem-sucedida do complexo analito-monômero, o MMIP semicovalente foi sintetizado, limpo (por uma reação de clivagem química em metanol e NaOH) e submetido aos ensaios para avaliar sua performance no reconhecimento da biotina.

4.2.2 Ensaios de otimização do MMIP semicovalente: avaliação do solvente, dosagem de massa e tempo de interação

Foram realizadas sínteses com diferentes proporções (em mmol) de analito (mantida constante) e monômero estrutural: 1-10, 1-20 e 1-40. A síntese contendo a proporção 1analito:10monômero não foi formada, tanto para MMIP quanto MNIP. Assim, as sínteses 1-20 e 1-40 foram submetidas aos ensaios de otimização.

Com o intuito de maximizar a retenção da biotina ao MMIP semicovalente foram otimizadas diferentes condições de reação; como tempo de interação para atingir o equilíbrio, solvente de ligação e massa de adsorvente. Em todas as etapas as quantificações foram realizadas por HPLC.

O primeiro estudo realizado foi o tipo de solução (solvente) no qual a biotina deve ser solubilizada para interagir com o polímero, sendo que o meio no qual o analito está solvatado interfere diretamente na ligação do mesmo com o polímero. A biotina foi solubilizada em metanol, etanol, água e diferentes proporções entre esses solventes. Dos diversos tipos de solução avaliadas MeOH foi quem apresentou melhores resultados na ligação (todos os resultados neste ensaio para ambos polímeros avaliados não serão exibidos), sendo o solvente adotado para os posteriores estudos.

O segundo procedimento estudado foi a dosagem da massa de polímero para reconhecimento da biotina, com variação de massa de 2 até 30,0 mg; cujos resultados são apresentados na Figura 48.

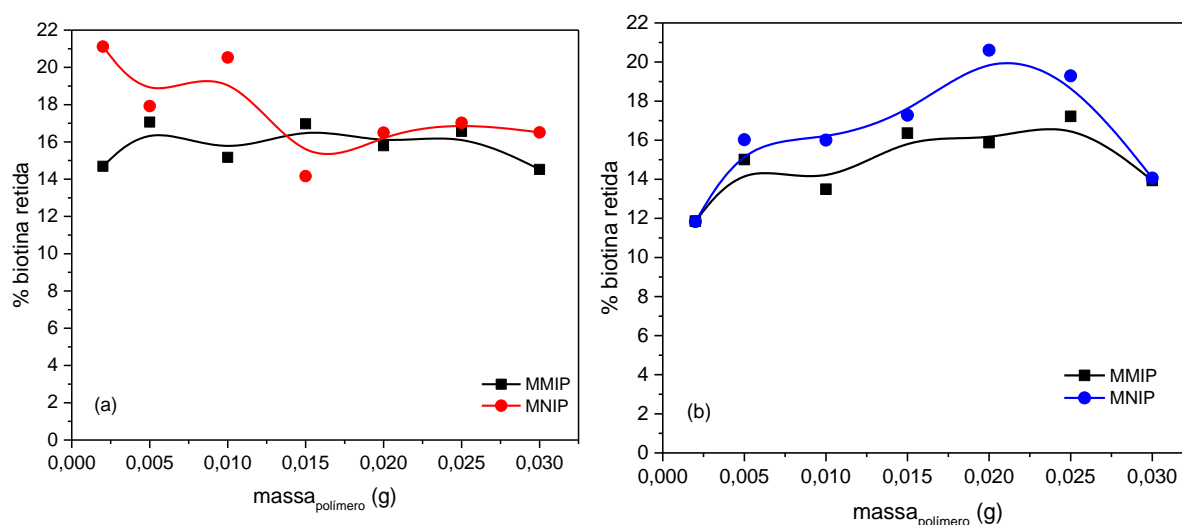


Figura 48 - Resultados para otimização da dosagem de massa de MMIP (intervalo de 2,0 até 30,0 mg) após interação por 2 horas com biotina ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$) preparada em metanol para as duas sínteses avaliadas: (a) proporção 1:20 (analito:monômero) e (b) proporção 1:40 (analito:monômero).
Fonte: autor do trabalho.

Pelo ensaio de massas observou-se que, independente da síntese realizada, os polímeros não apresentaram diferença na porcentagem de retenção pela biotina com o aumento da massa. Uma possibilidade foi a dos sítios já estarem saturados para a concentração de biotina trabalhada ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$). Assim, o estudo de massas

foi repetido utilizando-se outras concentrações de biotina e, não entanto, os resultados (não exibidos) não foram diferentes dos exibidos pela Figura 48 acima.

Então, o ensaio de massas foi novamente repetido variando-se o tempo de interação e até mesmo com outros solventes (resultados não exibidos). No caso da síntese com proporção 1 analito :40 monômero, os resultados apresentados foram inferiores ao obtido inicialmente. Assim, os ensaios com essa proporção foram interrompidos e, para questões práticas de verificação da eficiência do método, os ensaios foram continuados apenas com a síntese 1 analito : 20 monômero.

Assim, o ensaio seguinte realizado foi a otimização do tempo de interação entre polímero e analito. Para isso, fixou-se uma massa de MMIP de 15,0 mg, baseada no estudo anterior (onde houve uma ligeira diferença entre MIP e NIP) e variou-se o tempo de interação; como mostra a Figura 49.

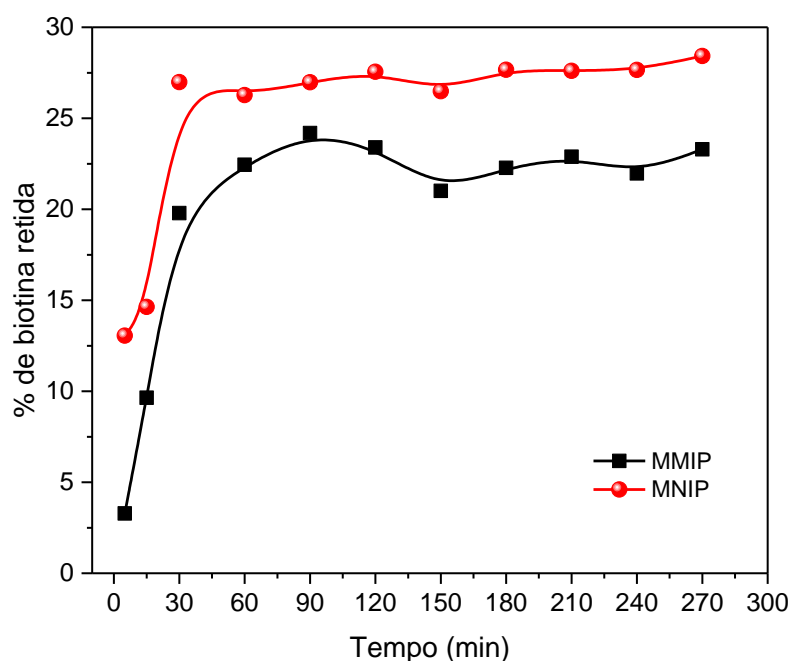


Figura 49 - Resultados para otimização do tempo de interação (intervalo analisado de 5 até 270 minutos) entre o MMIP (15,0 mg) com biotina (20,0 mg L⁻¹) preparada em metanol para a síntese proporção 1:20 (analito:monômero).

Fonte: autor do trabalho.

Pelo experimento de avaliação do tempo de interação é possível concluir que no MMIP semicovalente ocorre uma saturação na quantidade de biotina retida a partir de 60 min. Já o MNIP satura a partir de 30 minutos e com uma porcentagem de retenção ligeiramente maior, o que indica que estão prevalecendo as interações não específicas para o material. Essas interações ocorrem tão rapidamente que em 5

minutos o MNIP já possui 13% de biotina retida e em 30 minutos está saturado com 27%.

Assim, para o próximo ensaio (construção da isoterma de adsorção) foi padronizado o tempo de interação para 60 minutos.

4.2.3 Isotherma de adsorção e cálculo da constante de afinidade (K_a)

A isoterma de adsorção foi construída utilizando os parâmetros anteriormente otimizados para o MMIP semicovalente e, como comparação, construiu-se a isoterma para o MMIP não covalente. A Figura 50 mostra as diferenças obtidas na adsorção da biotina para os materiais avaliados.

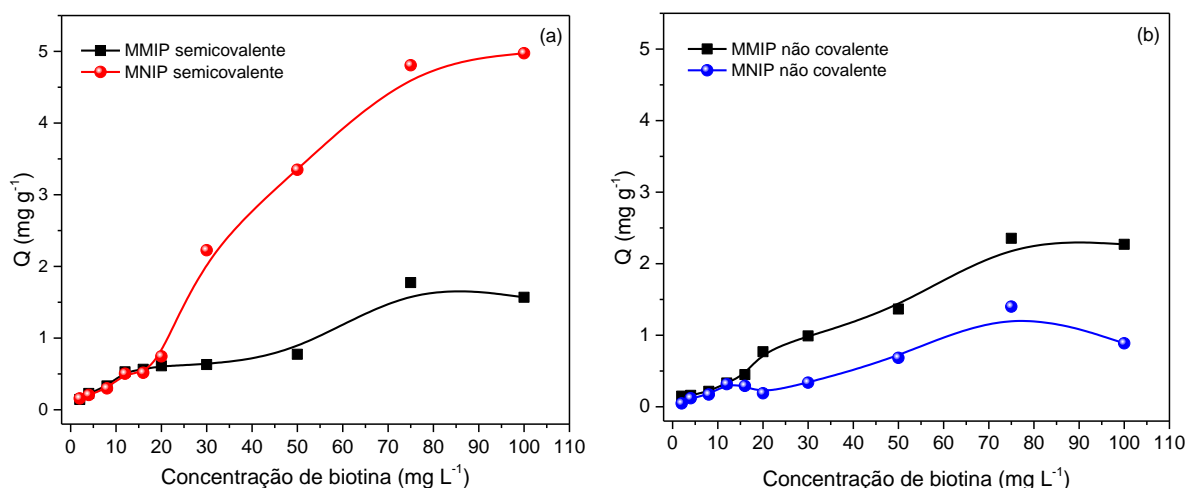


Figura 50 - Isotherma de adsorção da biotina (em intervalo de concentração de 2,0 até 100,0 mg L⁻¹) para (a) MMIP semicovalente - 15,0 mg dos polímeros com interação por 60 min e no (b) MMIP não covalente - 10,0 mg dos polímeros com interação por 120 min.

Fonte: autor do trabalho.

O perfil de adsorção para os polímeros impressos foi muito semelhante, apresentando um máximo de 1,5 mg de biotina por grama de MMIP para a impressão semi-covalente e 2,0 mg de biotina por grama de MMIP para a não covalente. Além disso, apresentaram o perfil desejado para uma isoterma: aumento da adsorção do analito com aumento da concentração até atingir a saturação, indicando que todos os sítios foram ocupados.

Ao avaliar o MNIP é possível observar que em concentrações no intervalo de 5,0 até 20,0 mg L⁻¹ não houve diferenciação entre MMIP e MNIP para ambos os métodos de impressão molecular. Com o aumento da concentração os polímeros impressos

não covalentemente começaram a apresentar diferença de retenção pelo analito, sendo a biotina adsorvida preferencialmente na cavidade seletiva do MMIP. Já para a impressão semicovalente o MNIP apresentou uma grande quantidade de ligações não específicas com o aumento da concentração de biotina (um salto no valor de Q de $0,75 \text{ mg g}^{-1}$ para $2,1 \text{ mg g}^{-1}$ com o aumento de apenas 1,5 vezes a concentração de um ponto para a seguinte); até atingir uma saturação em Q próximo de 5 mg g^{-1} .

Esses resultados mostram que a impressão semi-covalente do polímero para biotina não foi tão eficiente quanto o que é proposto pela literatura no que diz respeito à diminuição das ligações não-específicas. No entanto, ainda são necessários mais estudos avaliando diferentes condições (tipo de complexo analito-monômero sintetizado, proporção dos reagentes da síntese, etc) e outros estudos como avaliação da seletividade para conclusões definitivas.

Por fim, foi calculada a constante de afinidade (K_a) dos polímeros semicovalente e não covalente com o intuito de verificar se o método de impressão e formação das cavidades influencia na preferência de reconhecimento (afinidade) pelo analito e, conseqüentemente, na seletividade.

Para o cálculo foi utilizado o modelo de adsorção de Langmuir. A isoterma de Langmuir leva em consideração que adsorção ocorre em uma monocamada e que o número de sítios para adsorção é bem definido e que todos eles são homogêneos e; além de considerar que não ocorre interação entre as moléculas adsorvidas. (113)

O ajuste de Langmuir é dado pela seguinte relação:

$$Q = \frac{Q_{\text{máx}} K_L C_e}{1 + K_L C_e},$$

na qual $Q_{\text{máx}}$ é a máxima capacidade de adsorção na monocamada (mg g^{-1}), K_L é constante de Langmuir (L mg^{-1}) e C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg L^{-1}).

No ajuste de Langmuir K_L é o parâmetro de afinidade e, portanto, equivalente à K_a . No caso da constante de afinidade da biotina pela avidina, como K_a expresso em L mol^{-1} , os dados foram transformados na unidade desejada (Figura 51) e realizados os cálculos para ambos os polímeros.

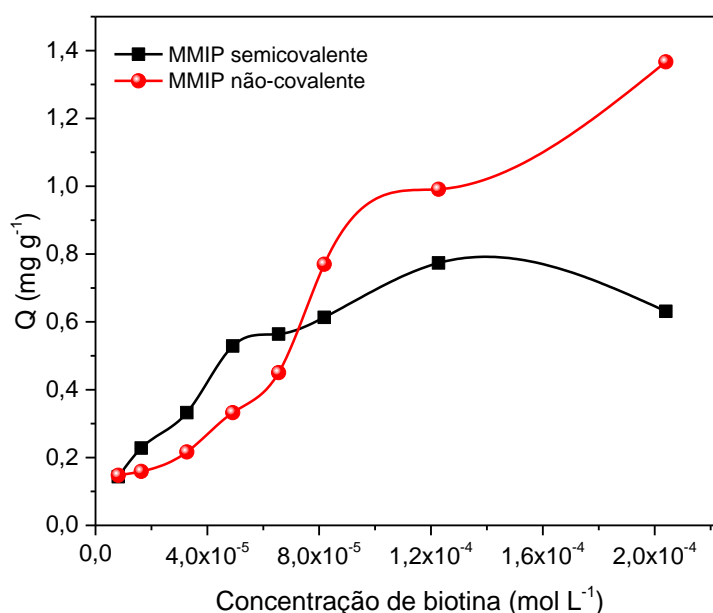


Figura 51 - Isoterma de ligação da biotina no MMIP semicovalente (15,0 mg de polímero com interação por 60 min) e no MMIP não covalente (10,0 mg de polímero com interação por 120 min) na faixa de concentração de $8,2 \times 10^{-6}$ até $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de biotina.

Fonte: autor do trabalho

A impressão semicovalente apresentou um coeficiente de correlação (R^2) igual à 0,995 e a impressão não covalente obteve $R^2 = 0,998$; demonstrando que o modelo de Langmuir apresentou um bom ajuste aos dados experimentais dos dois materiais.

Obteve-se que a constante de afinidade para o MMIP semicovalente é $K_a = 5,9 \times 10^4$ L mol⁻¹ e para o MMIP não covalente $K_a = 2,4 \times 10^3$ L mol⁻¹. Como esperado e reportado na literatura, a constante de afinidade da impressão semicovalente é maior, uma vez que os sítios de reconhecimento são gerados com tamanho e conformação exata do analito.

Quando as constantes para os dois MIP são comparadas com a constante de afinidade da avidina/estreptavidina pela biotina ($1,0 \times 10^{15}$ L mol⁻¹), é possível ver que embora os materiais apresentem um desempenho inferior ao das proteínas, o MMIP não covalente para biotina apresentou ótima eficiência no reconhecimento da biotina no desenvolvimento da pesquisa realizada com esse polímero. (97,104)

Já o MMIP semicovalente ainda exige maiores estudos para tentar otimizar sua eficiência.

4.3 Aplicação em sistemas de ELISA e fluxo lateral (LF)

A aplicação final dos polímeros impressos para biotina (MIP e MMIP) foi avaliada em sistemas que usualmente utilizam anticorpos como moléculas de reconhecimento: as técnicas *ELISA* e LF, sendo a discussão dos resultados para cada técnica dividida em subtópicos separados.

4.3.1 *Magneto ELISA*

Os ensaios ELISA com atuação magnética foram realizados em condições otimizadas anteriormente pelo grupo de pesquisa da Prof.^a Isabel Pividori utilizando o MIP para biotina desenvolvido anteriormente.(104)

Em ensaios separados, os polímeros magnéticos interagiram com biotina-HRP e os amplicons marcados (*E. coli* e *Salmonella*) em diferentes concentrações. Após as reações, o substrato (H₂O₂/TMB) foi adicionado e a atividade enzimática foi quantificada.

4.3.1.1 *Avaliação da capacidade de ligação do MMIP pela biotina-HRP*

Os ensaios foram realizados avaliando diferentes intervalos de concentração de biotina-HRP, de 5,0 até 800,0 ng mL⁻¹, com diferentes quantidades do MMIP, conforme exibido pela Figura 52.

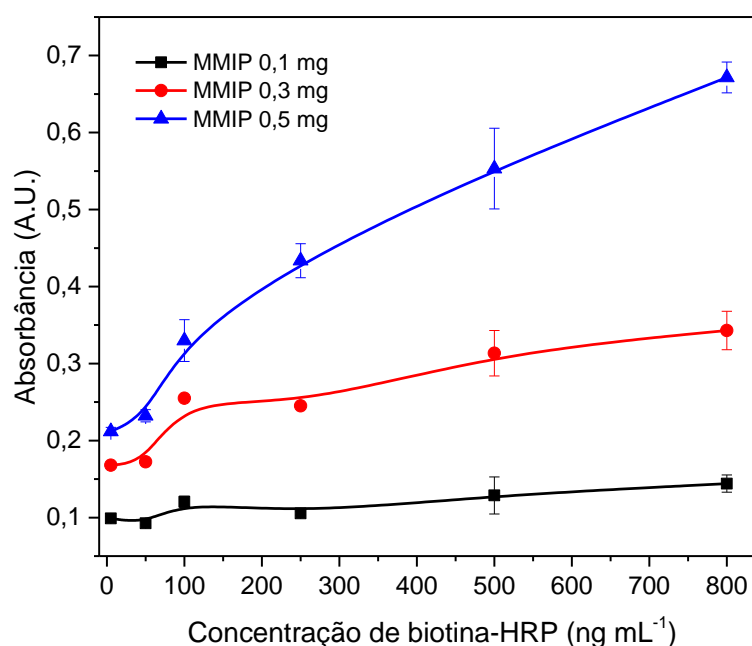


Figura 52 - Ligação de biotina-HRP no MIP magnético por magneto ELISA; com intervalo de concentração de 5,0 até 800,0 ng mL⁻¹ de biotina-HRP e 0,1; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹ de MMIP. As barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas realizadas (n=3).

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 52 exibe os resultados obtidos avaliando a capacidade de ligação de diferentes quantidades de MIP magnético pela biotina-HRP. No caso, 0,5 mg de MMIP mostraram, após a otimização, os melhores resultados. A isoterma de adsorção mostra que o MMIP tem boa capacidade para diferenciar todo intervalo de biotina-HRP avaliado, uma vez que o sinal de absorbância aumentou proporcionalmente.

Para menores quantidades de MMIP (0,1 e 0,3 mg), o polímero apresentou uma saturação na concentração de 100,0 ng mL⁻¹ de biotina-HRP, uma vez que não há diferença significativa no sinal de absorbância (não há aumento no sinal).

Analisando esses resultados, possivelmente grandes quantidades de MIP apresentariam um sinal de absorbância maior, permitindo que se trabalhasse com maiores concentrações de biotina-HRP. No entanto, por razões experimentais, não foi possível adicionar mais MIP nos poços das placas; uma vez que maiores quantidades de MIP não tiveram uma separação magnética eficiente.

Outro problema que ocorreu foi a ausência de diferenciação efetiva entre MMIP e MNIP pela biotina-HRP (Figura 53).

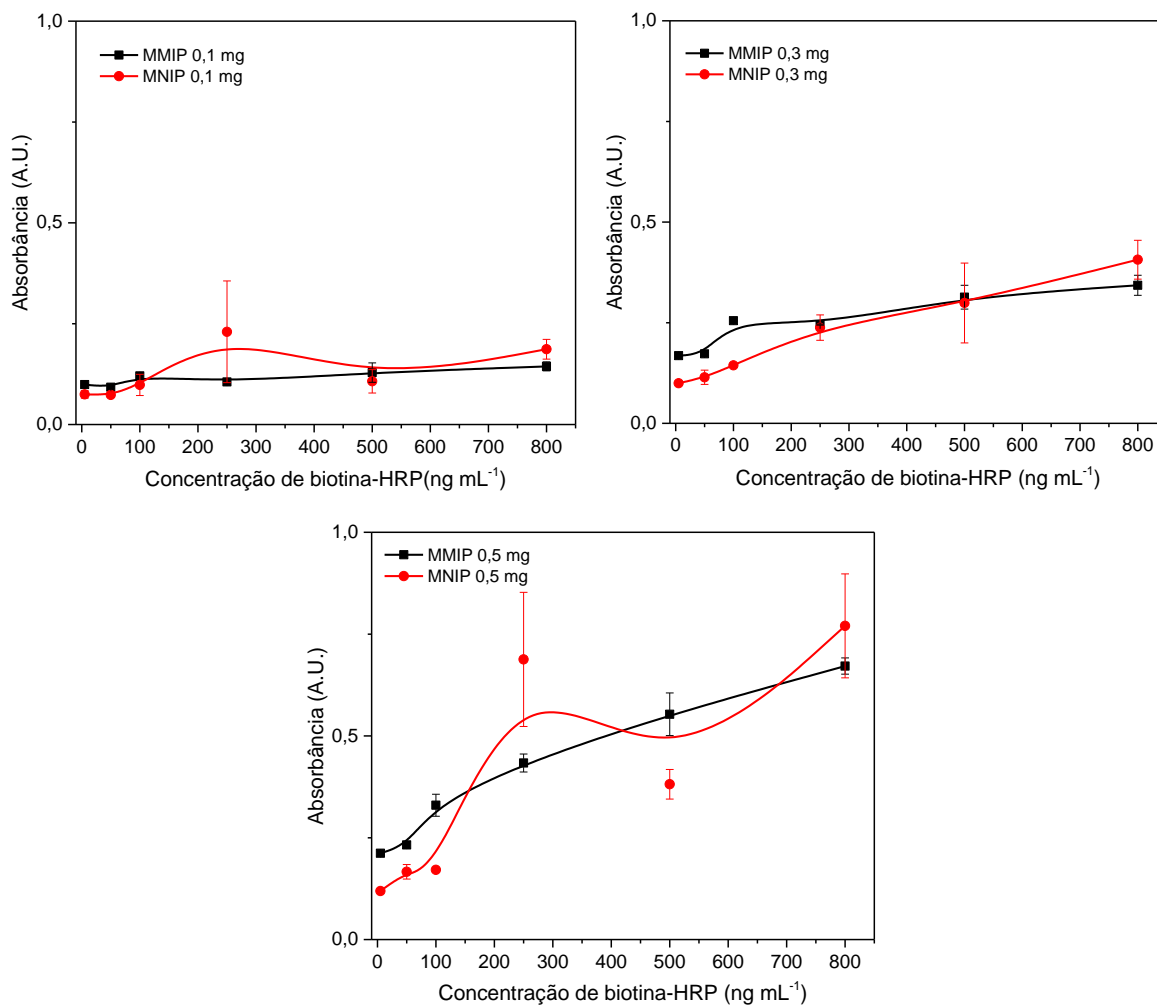


Figura 53 - Comparação da capacidade de ligação da biotina-HRP no magneto MIP magneto NIP por magneto-ELISA, em intervalo de concentração de 5,0 até 800,0 ng mL⁻¹ de biotina-HRP e 0,1; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹ de MMIP e MNIP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas realizadas (n=3).

Fonte: autor do trabalho.

Como mostra a Figura 53, não houve diferença significativa para as massas avaliadas, exceto em alguns pontos de menor concentração de biotina-HRP para 0,5 mg. Possivelmente, os grupos funcionais do NIP interagiram fortemente por ligação não específica com a biotina-HRP. Este experimento foi repetido várias vezes, mas os resultados obtidos não foram melhores do que os exibidos abaixo.

4.3.1.2 Cálculo da constante de afinidade

A partir dos resultados obtidos anteriormente, para 0,50 mg de polímero obteve-se a melhor performance do MMIP para reconhecimento da biotina-HRP; o que permite o cálculo da constante de afinidade do MMIP pela biotina.

Para o cálculo da constante de afinidade, utilizou-se o ajuste de ligação de um sítio por receptor, (104) seguindo a equação:

$$y = \frac{B_{m\acute{a}x} C}{K_d + C}$$

Na qual $B_{m\acute{a}x}$ é a absorbância na capacidade máxima de ligação e K_d a metade da concentração do analito necessária para atingir a concentração máxima de ligação (seguindo o mesmo princípio de Michaelis Menten).

Como é um experimento de saturação de ligação os dados foram transformados em concentração molar (Figura 54 abaixo) e ajustados seguindo a equação acima ($R^2 = 0,976$). Como $K_{afinidade}$ é o inverso de K_d , obteve-se que a constante de afinidade do MMIP é de $K_a = 2,4 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1}$; um valor elevado ao ser comparado com a constante de afinidade da avidina/estreptavidina ($1,0 \times 10^{15} \text{ L mol}^{-1}$).

Portanto, é possível afirmar que o MMIP possui uma alta afinidade pela biotina-HRP, o que mostra o potencial de aplicação desses materiais em ensaios ELISA.

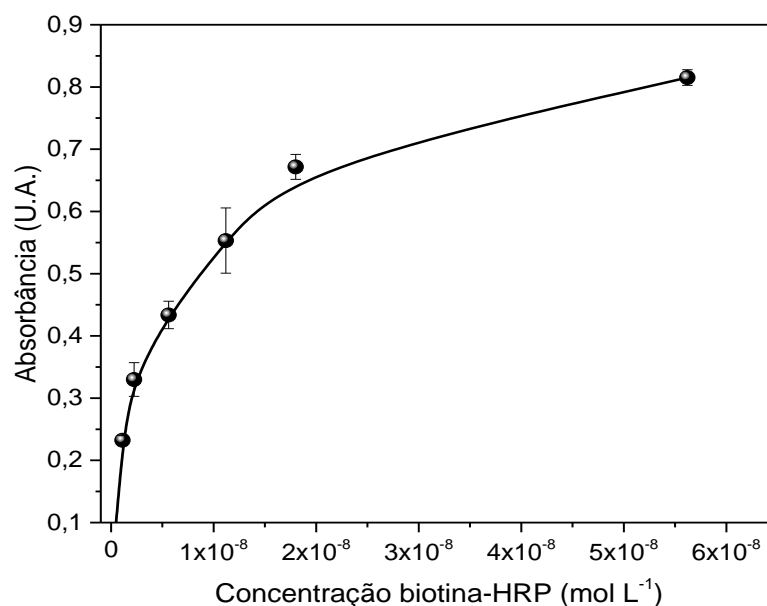


Figura 54 - Ligação da biotina-HRP no MMIP por magneto-ELISA, na faixa de concentração de $1,12 \times 10^{-10}$ até $5,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de biotina-HRP e uma quantidade fixa de 0,50 mg de MMIP. As barras de erro mostram o desvio padrão para as medidas ($n = 3$).

Fonte: autor do trabalho.

4.3.1.3 Avaliação da ligação entre os amplicons de DNA marcados e o MMIP

Os imunoenaios com os amplicons de *E. coli* e *Salmonella* obtidos por PCR foram realizados utilizando ELISA magnético, como exemplificado esquematicamente na Figura 7 (procedimento experimental 3.2.3.3.2).

Durante a PCR, o DNA foi amplificado e marcado duas vezes: uma extremidade terminal com biotina para ligação com o MMIP (para ambas bactérias); e na outra extremidade terminal digoxigenina e fluoresceína para realizar a leitura óptica utilizando antiDIG-HRP e antiFLU-HRP, para *E. coli* e *Salmonella*, respectivamente.

O imunoensaio magnético foi realizado em um passo de incubação e os resultados são comparados para o MMIP e MNIP na Figura 55 para *E. coli* e Figura 56 para *Salmonella*. O MIP magnético é capaz de ligar uma concentração maior de amplicon da *E. coli* em comparação com o NIP magnético, com boa diferença no sinal de absorvância para as concentrações. Para *Salmonella*, também houve diferenciação entre os polímeros impresso e controle; no entanto, o sinal de absorvância para o intervalo de concentração avaliado (de 0,75 até 295 ng mL⁻¹) foi quase o mesmo, o que torna difícil quantificar este amplicon.

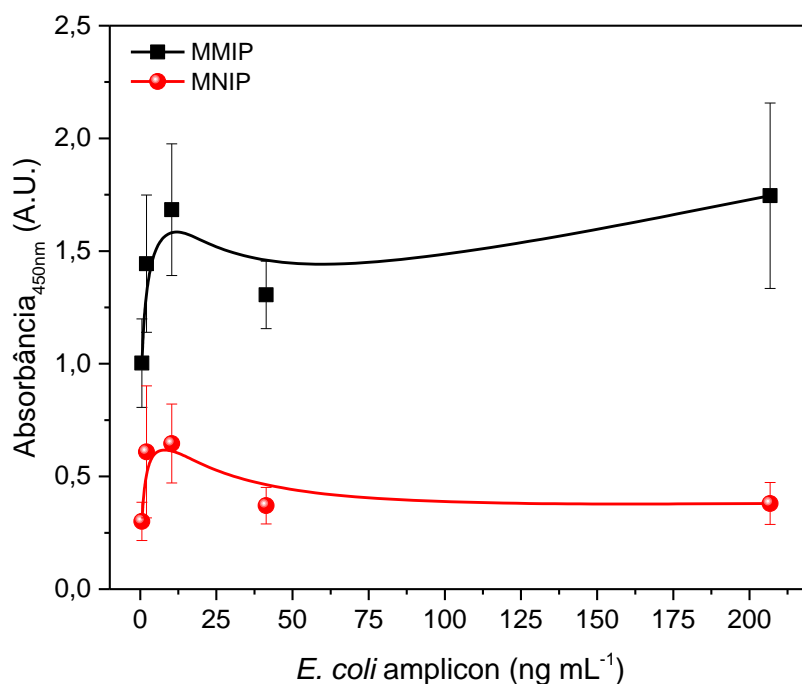


Figura 55 - Ensaio de ligação do DNA amplificado de *E. coli* com dupla marcação nos polímeros magnéticos (0,55 mg de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração do amplicon de 0,52 até 207 ng mL⁻¹, e 1,35 µg de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3).

Fonte: autor do trabalho.

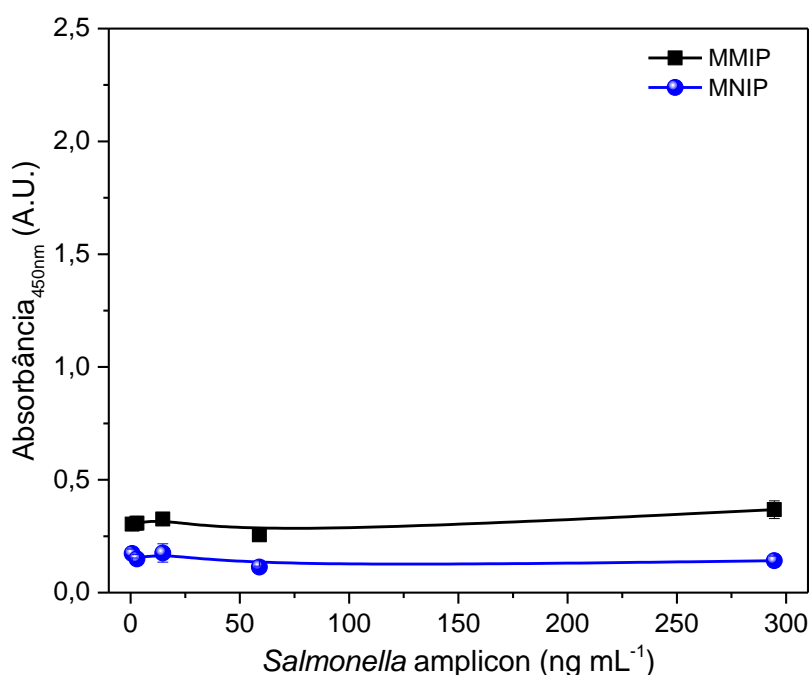


Figura 56 - Ensaio de ligação do DNA amplificado de *Salmonella* com dupla marcação nos polímeros magnéticos (0,55 mg de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração do amplicon de 0,75 até 295 ng mL⁻¹, e 1,35 µg de antiFLU-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3).

Fonte: autor do trabalho.

Para melhorar a resposta do sistema para ambos amplicons avaliou-se a concentração dos anticorpos empregados no ensaio, a qual é um parâmetro crítico nos resultados. Para a otimização do sistema para *E. coli* (Figura 57), uma maior quantidade de antiDIG-HRP (2,70 µg) apresentou aumento no sinal de absorbância com melhor diferenciação entre MMIP e MNIP (aproximadamente 0,35 unidades de absorbância) no intervalo de concentrações avaliadas (Figura 57 c).

No entanto, mesmo para diferentes quantidades de anticorpos, o controle negativo mostrou alto sinal, indicando ligações não específicas (Figura 57 b e d). O branco contém todos os reagentes utilizados para realizar a PCR (primers, marcadores, etc.), exceto as cadeias de DNA, o que permite monitorar interações não específicas. A solução do branco foi preparada na mesma concentração que a concentração mais alta para o amplicon (207 ng mL⁻¹). No caso, para 2,70 µg de anticorpo, o MIP magnético mostra menos interações não específicas - menor sinal de absorbância para o branco; além de um aumento na diferenciação entre MIP e NIP.

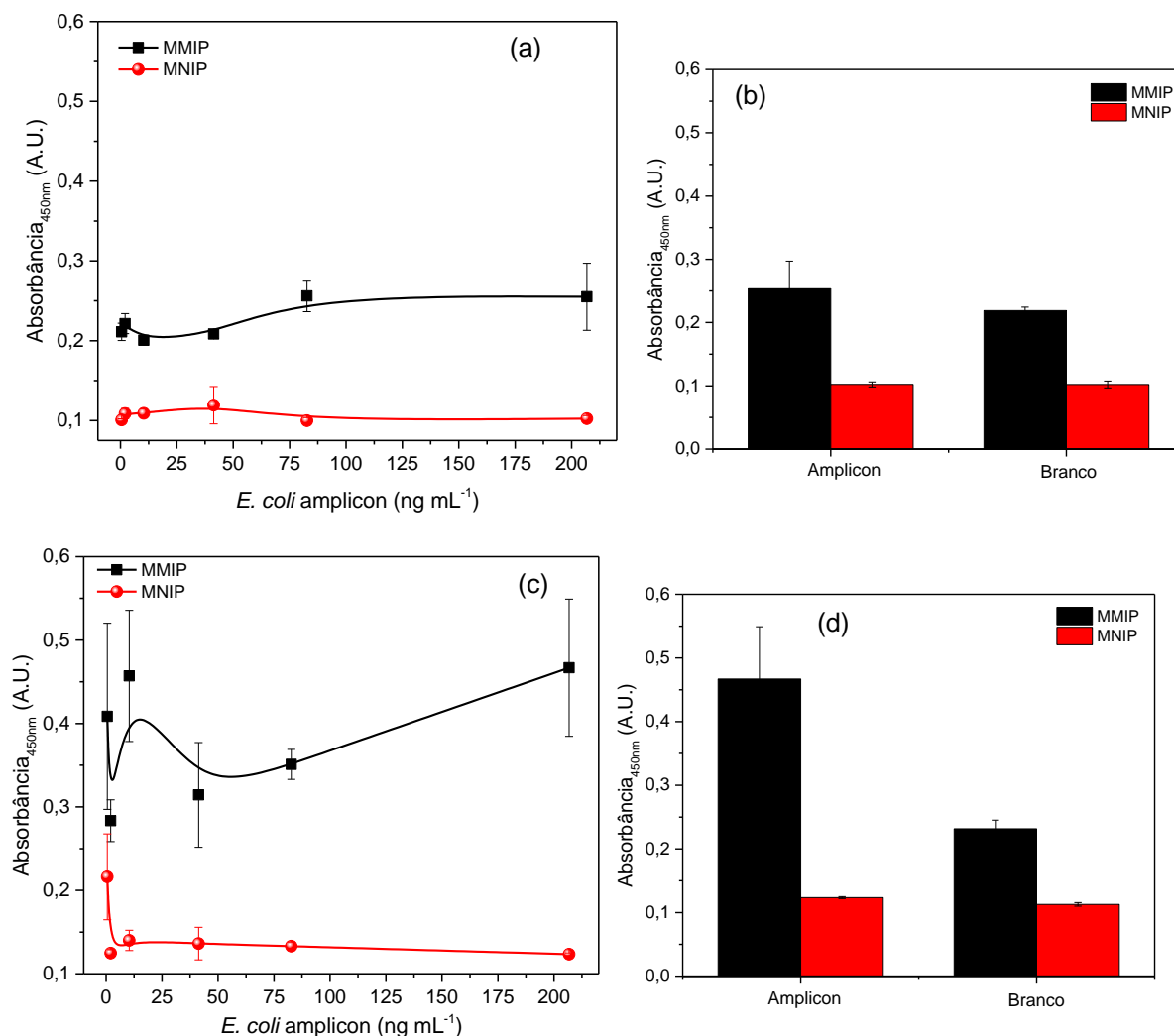


Figura 57 - Efeito da concentração de anticorpo no sinal de absorbância no imunoensaio magnético: 1,35 µg antiDIG-HRP na ligação do (a) amplicon marcado da *E. coli* em diferentes concentrações e (b) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 207 ng mL⁻¹; 2,70 µg antiDIG-HRP na ligação do (c) amplicon marcado da *E. coli* em diferentes concentrações e (d) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 207 ng mL⁻¹.

Fonte: autor do trabalho.

Para *Salmonella*, apesar de variar a quantidade de antiFLU-HRP, na faixa de concentração estudada não se observou uma variação significativa na intensidade da absorbância (Figura 58 a e c) – para todas as concentrações a intensidade da absorbância não varia mais do que 0,05 unidades. Assim, o MMIP consegue detectar a *Salmonella*, mas não quantificar este amplicon.

No caso do controle negativo, para ambas concentrações de anticorpo, o sinal do branco foi alto e aproximadamente igual ao do amplicon (tanto branco quando amplicon na mesma concentração), indicando a ocorrência de ligações não específicas (Figura 58 b e d).

Provavelmente, a diferença obtida nos resultados comparando-se a *E. coli* e a *Salmonella* é devida às diferenças na estrutura química, tamanho, composição e tipo de marcação do amplicon.

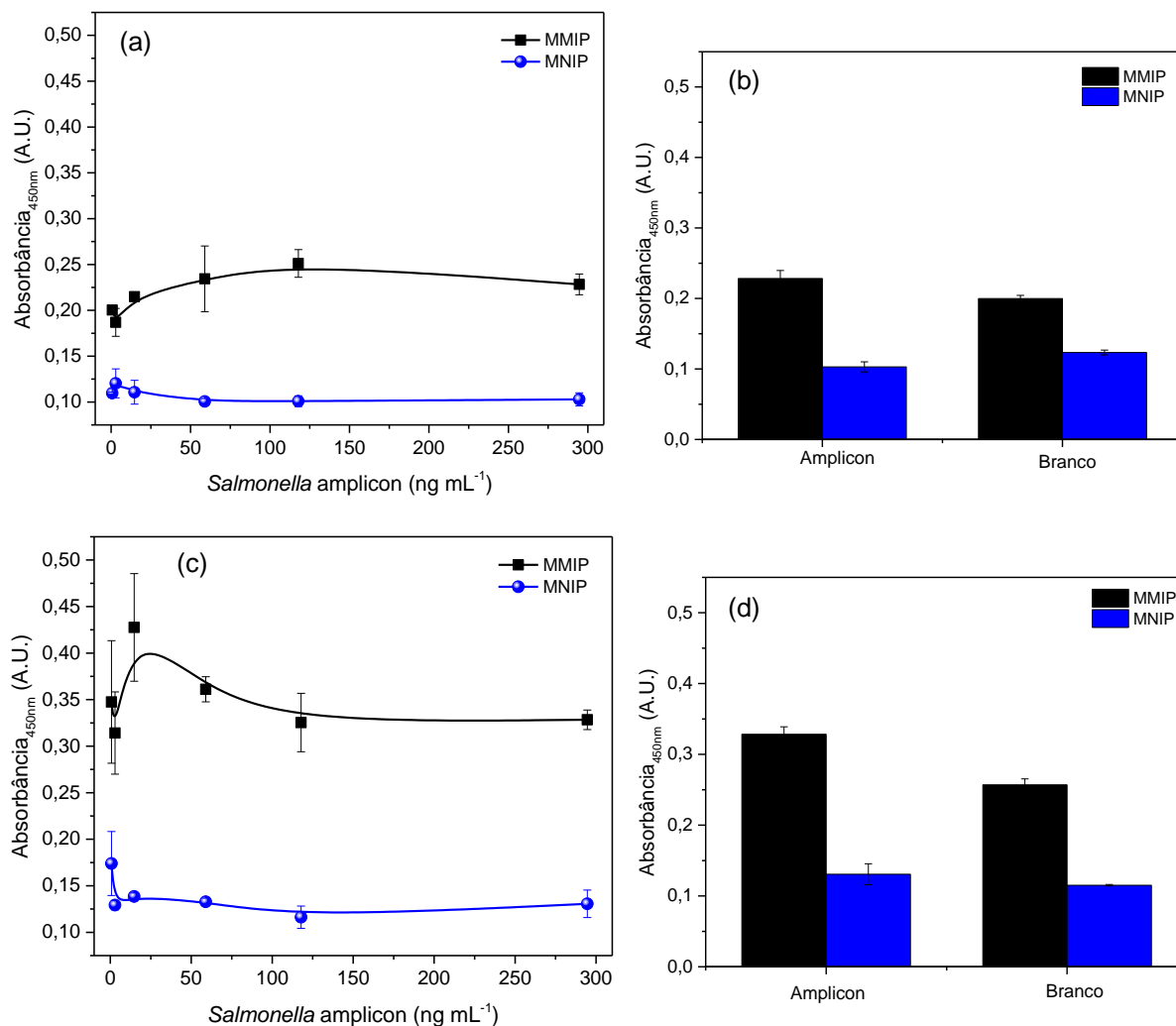


Figura 58 - Efeito da concentração de anticorpo no sinal de absorbância no imunoenensaio magnético: 1,35 µg antiFLU-HRP na ligação do (a) amplicon marcado da *Salmonella* em diferentes concentrações e (b) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 295 ng mL⁻¹; 2,70 µg antiFLU-HRP na ligação do (c) amplicon marcado da *Salmonella* em diferentes concentrações e (d) amplicon e controle negativo (branco) ambos na concentração de 295 ng mL⁻¹.

Fonte: autor do trabalho.

4.3.2 Fluxo lateral e fluxo vertical

4.3.2.1 Imobilização e fluxo utilizando MIP magnético

O primeiro experimento realizado foi verificar a capacidade de imobilização das partículas poliméricas na membrana de nitrocelulose. Para isso, foram utilizados diferentes solventes para preparar soluções de MMIP (solvente orgânico polar,

orgânico não polar e aquoso) e a interação do sistema nitrocelulose/solvente/polímero foi avaliada verificando o fluxo de solução tampão após as partículas estarem secas.

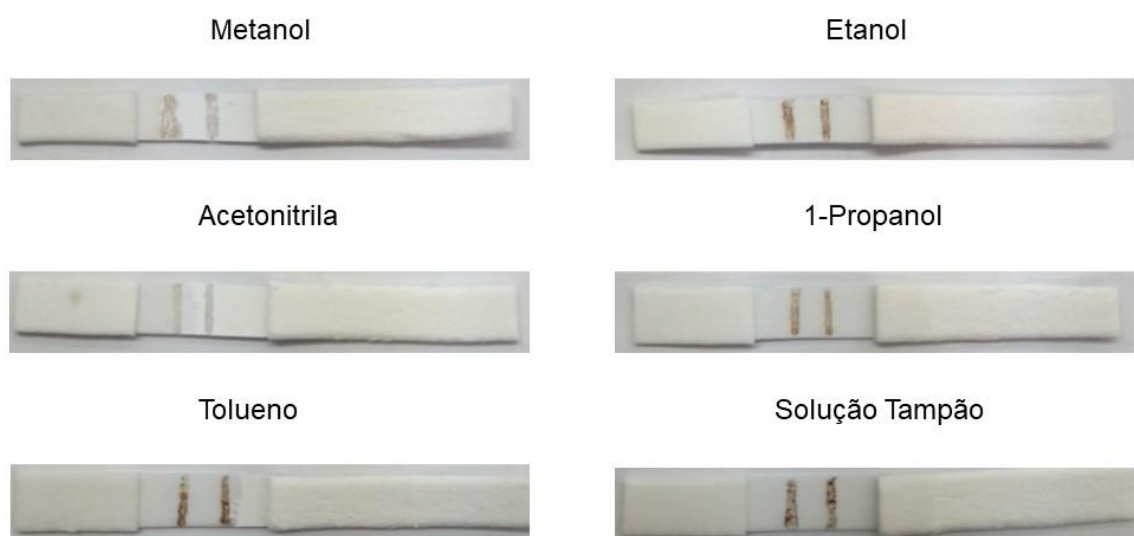


Figura 59 - Tiras de fluxo lateral contendo a imobilização de duas linhas de polímeros (0,055 mg) preparados em diferentes solventes para avaliar o efeito dos mesmos na deposição do polímero.

Fonte: autor do trabalho

Conforme exibido na Figura 59, foram obtidos resultados diferentes para cada tipo de solvente aplicado.

O metanol e a acetonitrila destruíram a membrana de nitrocelulose - provavelmente por reagir os com grupos nitro que estão livres na membrana de nitrocelulose, quebrou as ligações entre as moléculas de celulose e degradando o material.

A imobilização com 1-propanol mostrou, no primeiro momento, uma boa deposição; uma vez que a solução de tampão de corrida fluía no sistema e as partículas de polímero não se moviam. No entanto, após uma leve fricção mecânica na membrana de nitrocelulose, as partículas foram removidas da superfície.

O etanol mostrou bons resultados, uma vez que o MIP foi depositado e a solução tampão de corrida flui adequadamente pela membrana. O tolueno, após a imobilização, bloqueou o fluxo de solução tampão de corrida. Finalmente, a solução tampão TRIS mostrou-se como o melhor solvente para a deposição do MMIP (e, devido à compatibilidade da solução tampão com a nitrocelulose, foi adotado como solvente para preparar e depositar soluções de MIP em ensaios futuros). No entanto, as partículas estavam muito aglomeradas (devido ao tamanho e composição do polímero).

No sistema de fluxo vertical foi realizado o mesmo procedimento; contudo, devido à aglomeração de partículas, foi impossível depositar o MIP na membrana de nitrocelulose. Após todos os testes, o MIP sempre saiu da superfície.

Para resolver a aglomeração de partículas de polímero, em princípio realiza colocar a solução de MMIP em um vórtex e em banho ultrassônico durante 1 hora; e, no entanto, não se obteve bons resultados na desaglomeração. Assim, como alternativa, a solução de polímero foi sonicada com um sonicador de ponta.

4.3.2.2 Experimentos de desaglomeração e método de deposição

Para desaglomerar o MMIP, diferentes condições experimentais foram avaliadas utilizando um ultrassom de ponta, como tempo (de 10 segundos até 1 minuto) e amplitude (10%, 30%, 50% e 70%) de ultrassom. Para verificar a integridade e capacidade de ligação do MMIP após a desaglomeração nestas condições, os polímeros foram avaliados realizando reação com biotina-HRP, como descrito no procedimento experimental 3.2.3.3.1.

Conforme mostrado na Figura 60, comparando a solução de MMIP com e sem aplicação no ultrassom, há uma grande diferença entre a capacidade de reconhecimento. Com MMIP, é possível observar que o analito se liga ao polímero especificamente - há diferença entre MMIP e MNIP e a quantidade de analito retido aumenta conforme a concentração de analito aumenta. Por outro lado, o MMIP após submetido ao ultrassom de ponta mostrou uma diminuição da capacidade de ligação com a biotina-HRP e não há diferença na quantidade de biotina-HRP ligada com o aumento da concentração da mesma.

Além disso, foi possível observar que o polímero foi removido da superfície das nanopartículas, uma vez que a solução ficou branca após o uso de ultrassom. E, mesmo tentando usar uma menor amplitude ou tempo (resultados não exibidos), o polímero sempre foi removido das nanopartículas.

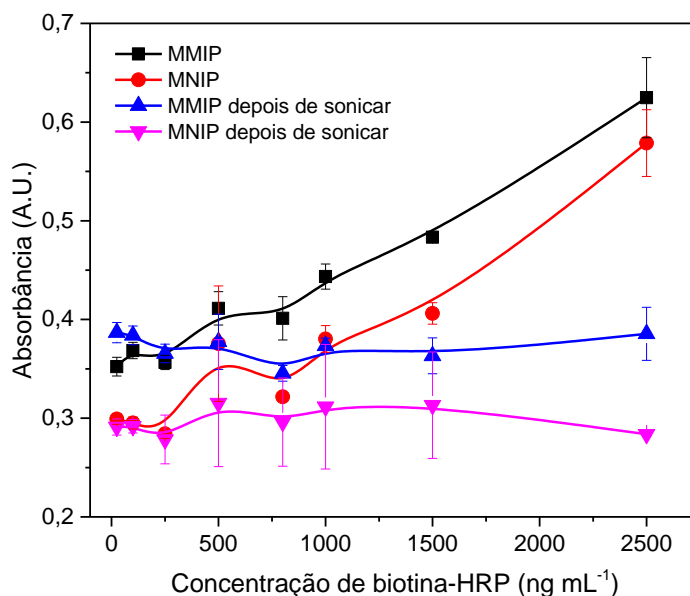


Figura 60 - Diferença entre a capacidade de ligação de MIP para biotina-HRP antes e depois do processo de sonicção; usando 0,55 mg de polímero durante 1 min com amplitude de 70%.

Fonte: autor do trabalho.

Com base nos resultados do MMIP, o MIP foi submetido a desaglomeração no ultrassom no modo de pulso ao invés de aplicar sonicção contínua. Além disso, após diversos testes com diminuição do tempo e amplitude, foi otimizado um tempo de 20 segundos de sonicção com amplitude de 10%. Visualmente se observou que as partículas de MIP foram dispersas formando uma solução homogênea.

Com o intuito de otimizar a deposição do MIP na membrana de nitrocelulose para fazer a linha de teste, a solução homogênea de polímero foi depositada em diferentes condições: utilizando uma ponteira para 5 μ L e uma para 10 μ L, fazendo a dispersão com uso de micropipeta ou manualmente e, finalmente, avaliando a quantidade de polímero (0,010; 0,025; 0,050 e 0,10 mg). As melhores linhas de teste foram desenhadas usando uma ponta de 5 μ L com 0,025 ou 0,050 mg de polímeros dispersos manualmente, como mostrado na Figura 61; sendo essas condições adotadas para os futuros ensaios.

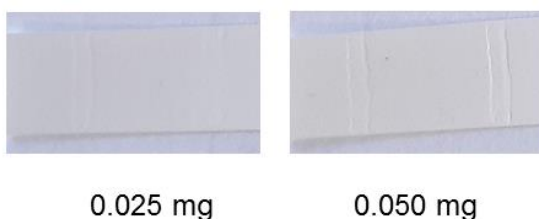


Figura 61 - Linhas contendo diferentes quantidade de MIP (0,025 e 0,050 mg) depositadas na membrana de nitrocelulose usando uma ponteira de 5 μ L com deposição manual.

Fonte: autor do trabalho.

4.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para verificar a morfologia do MIP sintetizado e da membrana de nitrocelulose, bem como a distribuição dos polímeros depositados, os materiais foram caracterizados por MEV, como mostra a Figura 62 a seguir.

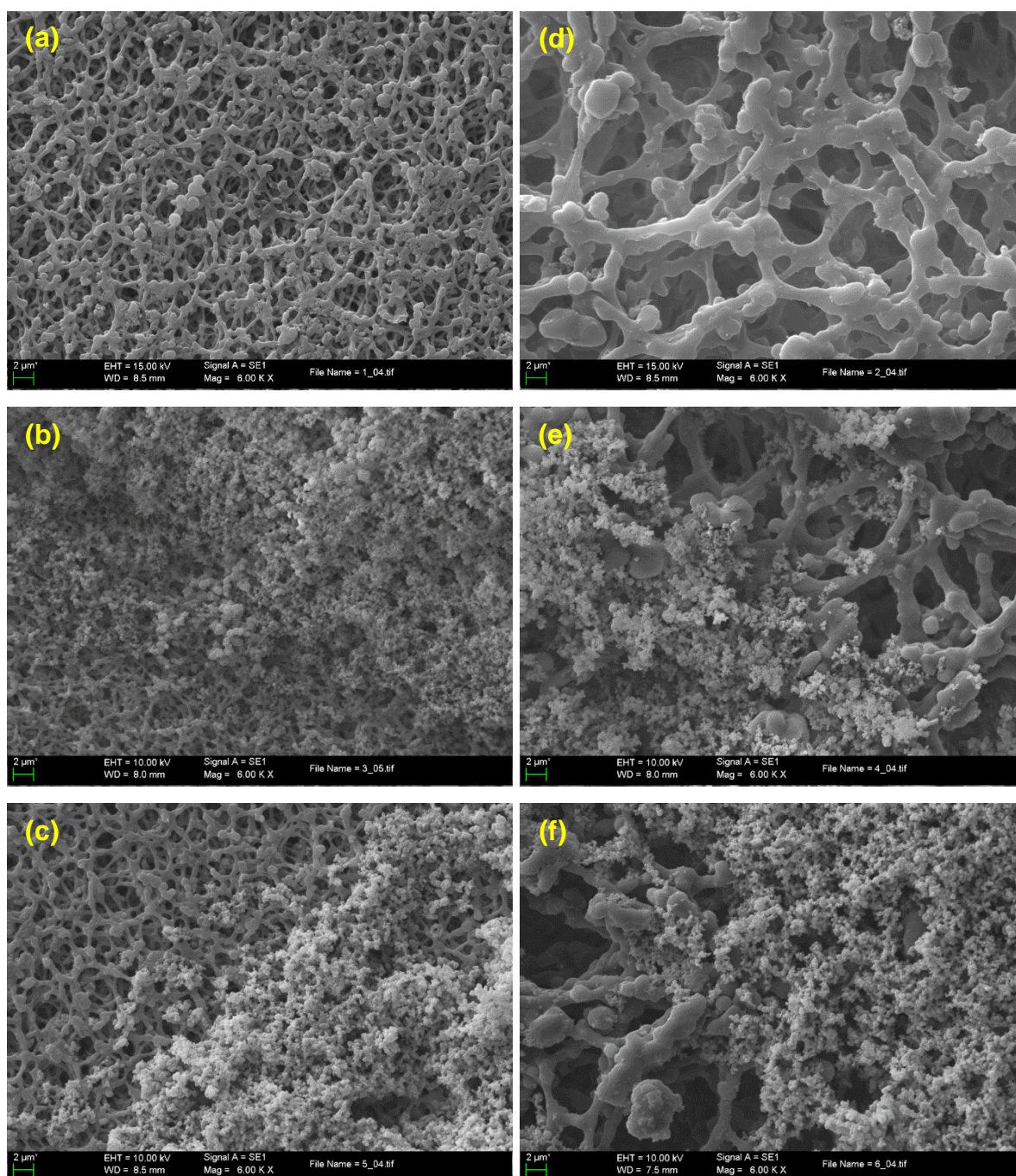


Figura 62 - Imagens de MEV com ampliação de 6.00 K X da: (a) membrana de nitrocelulose do fluxo vertical, (b) MIP depositado com etanol na membrana de VF, (c) MIP depositado com tampão TRIS na membrana de VF, (d) membrana de nitrocelulose do LF, (e) MIP depositado com etanol na membrana de fluxo lateral e (f) MIP depositado com solução tampão TRIS na membrana de LF.

Fonte: autor do trabalho.

De acordo com a Figura 62, é possível ver a diferença entre a porosidade das membranas utilizadas nos ensaios de fluxo lateral e vertical (letras a e d, respectivamente). A membrana de LF possui poros maiores do que a de VF, o que permitiu a deposição mais fácil de partículas MIP. No entanto, após a sonicação, o tamanho do poro não foi um problema para a deposição.

Para ambos os sistemas é possível ver que o uso de solvente orgânico como etanol (Figura 62 letras b e e) não destruiu ou prejudicou a nitrocelulose de qualquer maneira (ao contrário do metanol, por exemplo, que destruiu o papel - sendo possível ver a olho nu).

A solução tampão TRIS (Figura 62 letras c e f) mostrou-se boa para depositar os polímeros em ambos os sistemas. Não houve reação com a nitrocelulose e as partículas MIP foram bem depositadas, sendo possível observar a interface entre a nitrocelulose e a linha MIP depositada, bem como as pequenas partículas presas na superfície.

Assim, como a deposição com solução tampão TRIS apresentou bons resultados e, ademais, uma vez que todas as moléculas biotinizadas precisam ser preparadas em soluções tampão, o TRIS foi escolhido como solvente para depositar MIP e, ao mesmo tempo, realizar todas as reações com os diferentes analitos biotinizados.

4.3.2.4 Reação com BSA biotinizada e nanopartículas de ouro modificadas com estreptavidina (streptAv-AuNP)

Após a deposição do MIP na membrana de nitrocelulose, para verificar a presença do polímero e sua capacidade de reconhecimento, realizaram-se diferentes reações colorimétricas utilizando várias moléculas biotinizadas.

Os primeiros ensaios foram realizados usando biotina-BSA como analito. O modo de reconhecimento da reação é representado detalhadamente na Figura 63: (a) uma amostra contendo BSA biotinizada é adicionada na tira de amostra; (b) quando a amostra flui até a tira conjugada, uma biotina da BSA marcada interage com estreptavidina e (c) outra biotina dessa mesma BSA interage com os elementos específicos para reconhecimento da biotina na linha de teste (MIP). Na linha de controle o dendrímero biotinado interage com a estreptavidina e o resultado positivo

da reação de reconhecimento apresenta coloração vermelha, proveniente das nanopartículas de ouro.

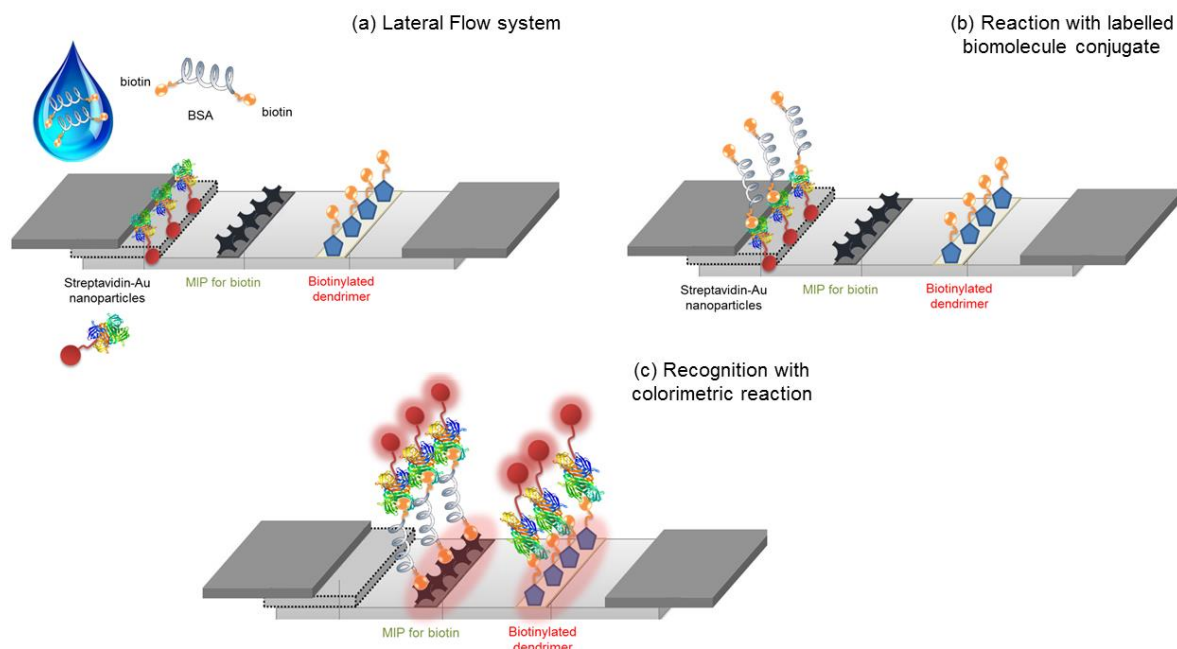


Figura 63 - Esquema da reação colorimétrica utilizada para demonstrar a presença e eficiência do MIP no dispositivo de fluxo lateral: (a) amostra contendo BSA multiplamente biotinilada é adicionada na tira de amostra e, uma das biotinas interage com (b) biomolécula conjugada (nanopartículas streptAv-Au) na tira conjugada e (c) outra molécula de biotina dessa BSA interage com o MIP para biotina presente na linha teste. Na linha de controle o dendrímero biotinilado interage com a estreptavidina. Em ambas linhas é exibida coloração vermelha (resultado positivo).

Fonte: adaptado de Ben-Aissa et al. (101)

A Figura 64 mostra os resultados obtidos com a reação anteriormente descrita, com MMIP e MIP depositados sem sonicação. Como esperado, não foi possível ver a reação, devido à irregularidade do MIP depositado. Além disso, MIP magnético não é um bom candidato para ser imobilizado na membrana de nitrocelulose, uma vez que não é possível visualizar a cor da reação devido à coloração marrom escura característica do polímero.



Figura 64 - Reação colorimétrica para verificar a presença de polímeros imobilizados na membrana de nitrocelulose por diferentes métodos (MMIP à esquerda e MIP à direita, sendo 0,025 mg preparados em solução tampão TRIS) em reação com BSA biotina (3% m/v) e nanopartículas de streptAv-Au.

Fonte: autor do trabalho.

Assim, uma vez com MMIP não é possível ver a cor das reações ou fluir pela membrana, os ensaios de fluxo lateral usando este polímero foram interrompidos.

O MIP convencional (sem nanopartículas) para biotina o polímero foi facilmente depositado na membrana. No entanto, devido à aglomeração de partículas, não foi possível visualizar claramente a cor da reação.

Portant, após a sonicação do MIP, a reação foi realizada novamente avaliando-se muitos parâmetros como quantidade de polímero depositado, concentração de biotina-BSA e volume de solução tampão de corrida, por exemplo. No entanto, os ensaios não foram reprodutíveis.

Independentemente do teste realizado e do parâmetro avaliado, não foi possível obter reprodutibilidade nesta reação. Às vezes, a cor vermelha (das nanopartículas de streptAv-AuNP) foi observada no MIP e NIP, em algumas reações apenas no MIP e em outras em nenhum dos polímeros.

No início, um ensaio de controle (branco) foi realizado, fluindo pela membrana apenas nanopartículas de streptAv-AuNP, para verificar a possibilidade de interações não específicas entre os polímeros e as nanopartículas de ouro. O ensaio foi realizado diversas vezes e não foi observada coloração (resultados não mostrados); o que exclui a possibilidade de falsos resultados positivos.

A Figura 65 exemplifica a influência da massa de MIP na reação com BSA biotinilada. No caso, 0,025 mg de polímero apresentaram melhores resultados, com cor vermelha (de intensidade muito leve) para MIP e sem cor para NIP. No entanto, quando este ensaio foi realizado, pelo menos 3 vezes novamente, para verificar a reprodutibilidade, não foi observada cor nos sistemas e, às vezes, o NIP apresentou coloração.

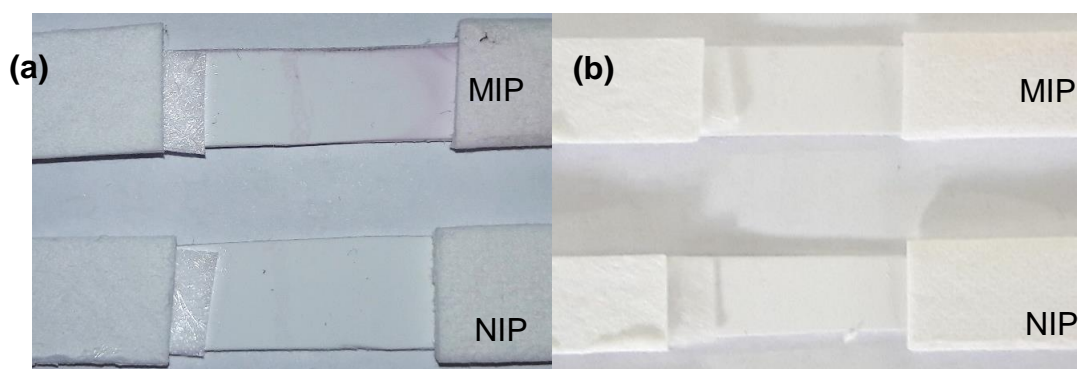


Figura 65 - Reação usando BSA-biotina 1% (m/v) e streptAV-AuNP (diluídas 8 vezes) em sistema LF contendo 0,025 mg (a) e 0,050 mg (b) de MIP e NIP.

Fonte: autor do trabalho.

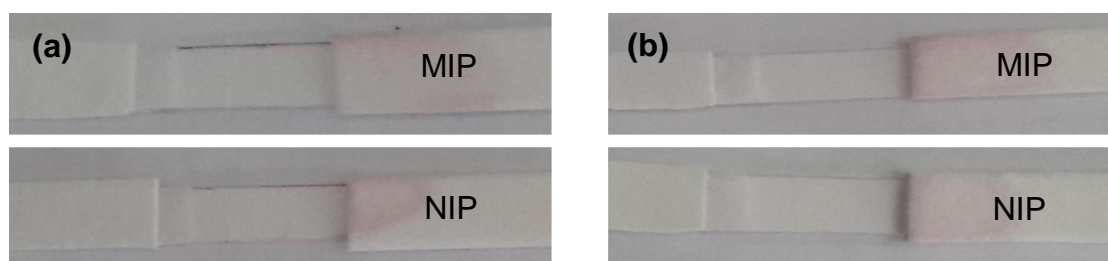


Figura 66 - Reação realizada em sistema de LF utilizando 0,025 mg de polímeros, streptAv-AuNP (diluídas 8 vezes) e (a) BSA-biotina 3% (m/v) e (b) BSA-biotina 5% (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

O mesmo problema foi observado quando foi variada a concentração de biotina-BSA (Figura 66); o sistema de LF não mostrou reprodutibilidade. Para o sistema de VF, ocorreu exatamente todos os mesmos problemas, então os resultados não serão exibidos. Portanto, o trabalho com essa reação foi interrompido e uma nova abordagem usando biotina-HRP foi desenvolvida.

4.3.2.5 Reação com biotina-HRP

A reação usando biotina-HRP foi realizada de acordo com o esquema da Figura 8. Uma vez que o uso de MIP em sistemas de fluxo lateral e vertical é inédito, além de usar biotina-HRP e TMB nesses sistemas, todo o procedimento experimental foi otimizado até que a melhor condição de análise foi alcançada, conforme descrito na 3.2.3.4.3.

Foi comparada a eficiência da reação verificando a diferença entre o fluxo dos reagentes ou adicionado-os diretamente sobre a superfície MIP, bem como o efeito da composição da solução tampão. Neste último caso, observou-se que a cor da reação para a leitura visual dos resultados foi afetada pela composição da solução tampão de corrida - observou-se uma cor azul muito leve ou ausência dela.

A presença de uma quantidade elevada de BSA na solução tampão de corrida pode inibir a reação entre TMB e HRP, uma vez que a proteína é muito grande e tem interações não específicas com MIP, bloqueando sua superfície.

Assim, verificando o fluxo do analito com a solução tampão TRIS ao invés da solução tampão de corrida, os resultados anteriores foram satisfatórios, como mostram as Figura 67 e Figura 68. É possível ver uma cor azul com intensidade mais escura no MIP do que no NIP. Além disso, pode-se visualizar que a concentração de

biotina-HRP está diretamente relacionada com a resposta do sinal, bem como a concentração de MIP na membrana. Neste caso, 500,0 ng mL⁻¹ de biotina-HRP e 0,050 mg de MIP apresentaram a melhor leitura visual.

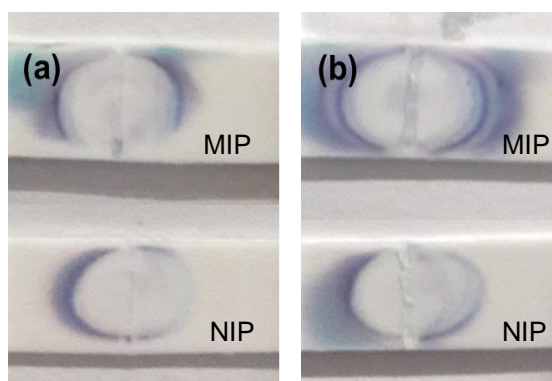


Figura 67 - Resultados obtidos para o sistema de fluxo lateral com solução tampão TRIS, biotina-HRP 250,0 ng mL⁻¹, e (a) 0,025 mg e (b) 0,050 mg de polímeros.

Fonte: autor do trabalho.

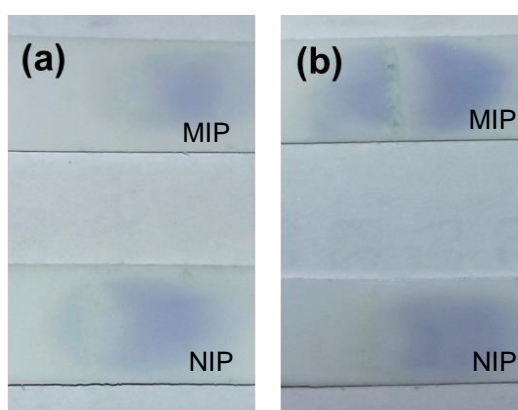


Figura 68 - Resultados obtidos para o sistema de fluxo lateral com solução tampão TRIS, biotina-HRP 500,0 ng mL⁻¹ e (a) 0,025 mg e (b) 0,050 mg de polímeros.

Fonte: autor do trabalho.

No VF os resultados não foram satisfatórios. Conforme exibido na Figura 69, no sistema com menor quantidade de MIP (em a), a biotina-HRP ficou muito impregnada na nitrocelulose, tornando impossível verificar se houve reação com o polímero ou não. Para uma maior quantidade de MIP (em b) o sistema de linhas não mostrou nenhuma cor, apenas um ligeiro sinal de biotina-HRP na membrana.

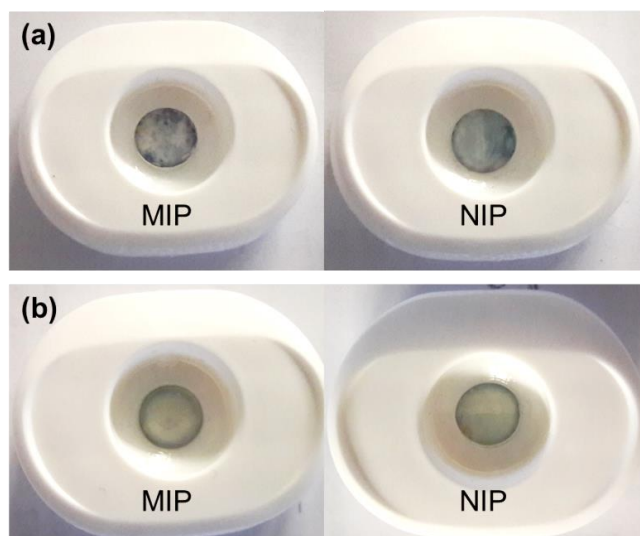


Figura 69 - Resultados obtidos para o sistema de fluxo vertical com solução tampão TRIS, biotina-HRP $500,0 \text{ ng mL}^{-1}$, e (a) $0,025 \text{ mg}$ e (b) $0,050 \text{ mg}$ de polímeros.

Fonte: autor do trabalho.

No entanto, para ambos os sistemas, elevada quantidade de biotina-HRP permaneceu na membrana de nitrocelulose, gerando um sinal de fundo (background); o que pode levar a resultados falsos positivos. Para evitar isso, diferentes reagentes inertes foram avaliados para verificar sua capacidade de prevenir ou gerar o mínimo possível de background.

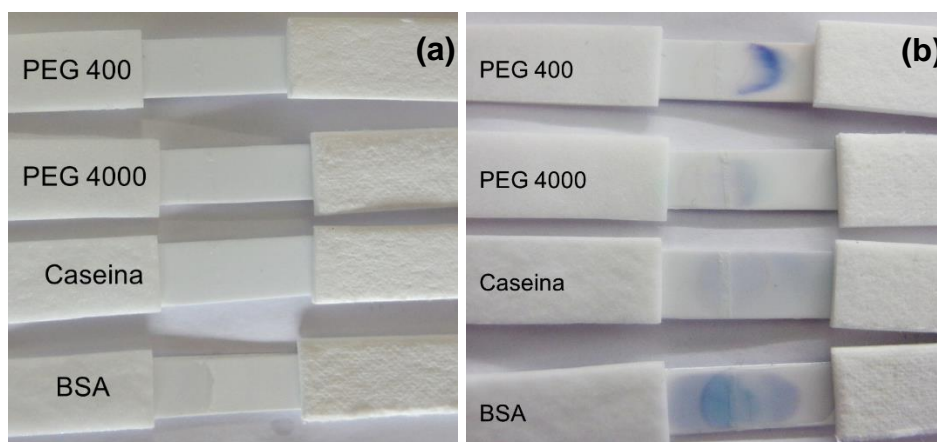


Figura 70 - Avaliação do bloqueio da membrana (a) antes da reação com biotina-HRP $250,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e (b) após a reação; utilizando como bloqueadores ($30 \mu\text{L}$ em cada tira de nitrocelulose) polietilenoglicol - PEG 400 1% (v/v), PEG 4000 1% (m/v), caseína 1% (m/v) e BSA 2% (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

Os bloqueadores foram adicionados em primeiro lugar, como mostrado pela Figura 70, sendo as membranas deixadas secando durante 3 horas. Após este tempo foi fluída solução tampão, para verificar a permeabilidade da membrana e, como é

possível ver, BSA bloqueou o fluxo de solvente (Figura 70 a) e apresentou o background mais alto (Figura 70 b). Avaliando outros bloqueadores, o PEG 4000 mostrou o menor background após a realização da reação com biotina-HRP, bem como uma cor clara no MIP, ao se comparar antes e depois da reação.

Para verificar se o PEG estava bloqueando o MIP, realizou-se um ensaio para verificar influência da ordem de adição de MIP e PEG na membrana. De acordo com a Figura 71, pode-se visualizar que a ordem é um fator crítico na análise, uma vez que o MIP depositado primeiramente na membrana (antes do bloqueio) mostrou uma coloração azul com boa intensidade após a reação com biotina-HRP.

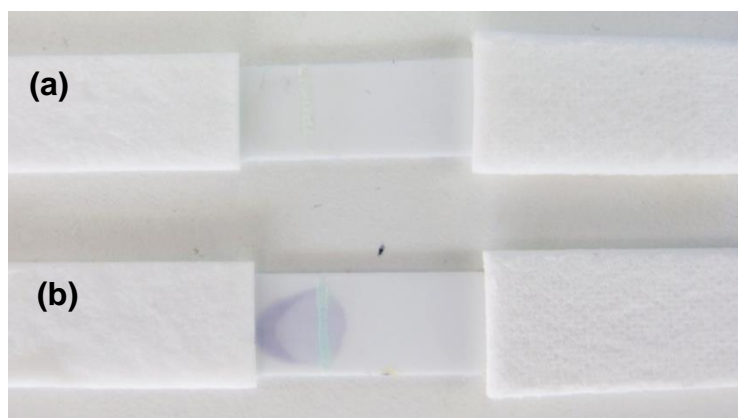


Figura 71 - Análise da ordem de adição dos componentes da reação: (a) primeiro a adição de 30 μ L de PEG 4000 1% (m/v) e depois deposição do MIP; (b) primeiro a deposição de MIP e depois adição de 30 μ L de PEG 4000 1% (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

Usando as condições otimizadas de bloqueio no na membrana de nitrocelulose no dispositivo de fluxo lateral, o mesmo experimento foi realizado no sistema de fluxo vertical (Figura 72). Com a membrana bloqueada, depois de realizar a reação com biotina-HRP, é possível observar uma linha azul clara no MIP e, ao comparar esse resultado com os mostrados pela Figura 69, o sistema melhorou a resposta.

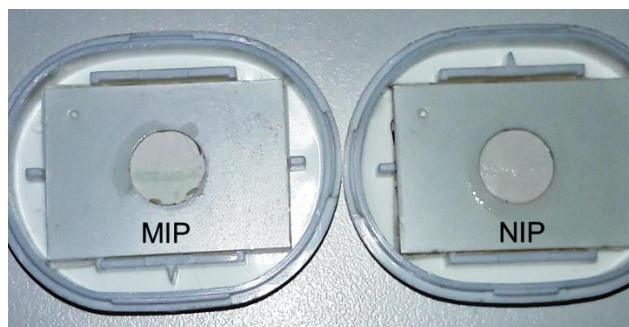


Figura 72 - Avaliação do bloqueio da membrana no sistema de fluxo vertical usando 15 μL de PEG 4000 1% (m/v) após a reação com biotina-HRP 250,0 ng mL^{-1} .

Fonte: autor do trabalho.

Assim a reação com biotina-HRP mostrou boa resposta em ambos os sistemas, de fluxo lateral e vertical, sendo necessários mais ensaios para otimizar os parâmetros de análise e melhorar a resposta do sistema.

4.3.2.6 Ensaio de seletividade

Um teste de seletividade foi feito para verificar a seletividade da reação usando biotina-HRP frente ao MIP para biotina e a possibilidade de interação inespecífica entre a enzima com a superfície do polímero.

Como exibido na Figura 73, MIP para os analitos biotina, valerato de estradiol (hormônio) e verde de metila (corante), foram depositados sobre nitrocelulose e a reação com biotina-HRP foi realizada como descrito anteriormente. É possível observar a cor azul apenas na linha do MIP para biotina, enquanto que para o valerato e o verde de metila não se observa coloração; mostrando a especificidade do MIP e a ausência de interações não específicas envolvendo a enzima peroxidase.

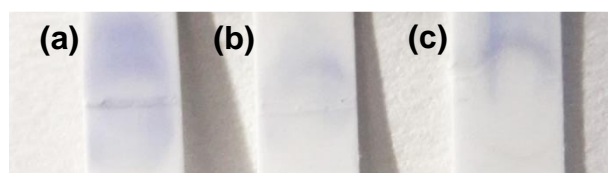


Figura 73 - Reação da biotina-HRP (500,0 ng mL^{-1}) usando solução tampão TRIS e membrana bloqueada com 30 μL de PEG 4000 1% (m/v) em direção a diferentes linhas de teste contendo (0,050 mg de polímeros para cada uma delas): (a) MIP para biotina, (b) MIP para valerato de estradiol e (c) MIP para verde de metila.

Fonte: autor do trabalho.

4.3.2.7 Detecção dos amplicons de *E. coli* e *Salmonella*

A análise do DNA amplificado e duplamente marcado foi realizada de acordo com condições experimentais otimizadas descritas anteriormente utilizando TMB como agente cromogênico. Foi realizado um ensaio em branco (controle negativo) para comparação dos resultados seguindo o mesmo procedimento para os amplicons. A solução do branco contém todos os reagentes utilizados para realizar a PCR (primers, marcadores, etc.), exceto as fitas de DNA, o que permite monitorar a ocorrência de interações não específicas.

A Figura 74 mostra o primeiro ensaio realizado. É possível ver uma cor azul bem clara na linha MIP para o amplicon e nenhuma cor para NIP e para o branco, o que indica que o reconhecimento de MIP pelo DNA de *E. coli* amplificado e marcado com biotina em uma das terminações ocorreu com sucesso. Apesar disso, é possível ver um elevado sinal de background, ocasionado pela alta quantidade de anticorpo.

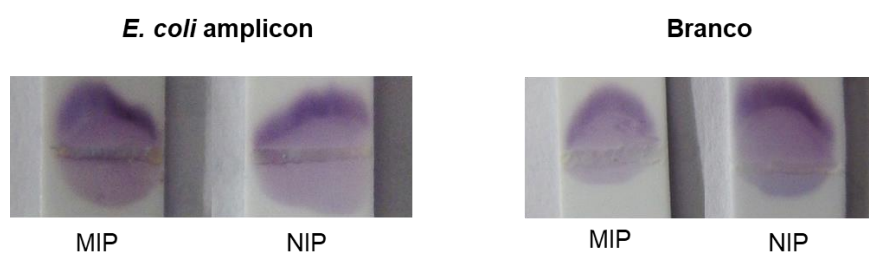


Figura 74 - Resultados obtidos para análise de fluxo lateral na detecção do amplicon de *E. coli* ($0,83 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando $27,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de antiDIG-HRP. Branco possui a mesma concentração que o amplicon.

Fonte: autor do trabalho.

Assim, o ensaio foi realizado novamente usando menor quantidade de antiDIG-HRP, como mostrado na Figura 75. Neste ensaio, a cor azul na linha MIP pode ser visualizada com maior intensidade e de modo mais claro do que o primeiro ensaio (e, inclusive, com menor background); o que confirma que a quantidade de anticorpo utilizado na análise é um parâmetro crítico na obtenção dos resultados.

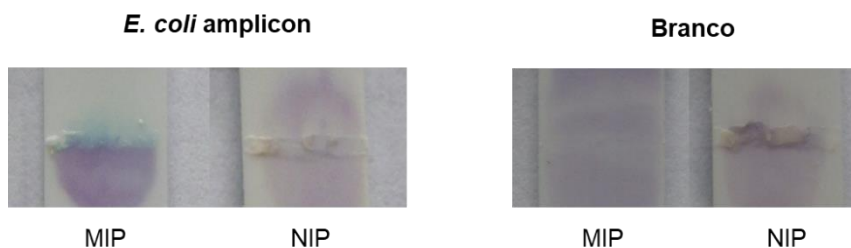


Figura 75 - Resultados obtidos para análise de fluxo lateral na detecção do amplicon de *E. coli* ($0,83 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando $13,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de antiDIG-HRP. Branco possui a mesma concentração que o amplicon.

Fonte: autor do trabalho.

Para *Salmonella* a reação também mostrou bons resultados, sem sinal de resposta nas análises de controle e aparecimento de cor escura para a linha do MIP (Figura 76). E, comparando com os resultados da *E. coli*, há menos background.

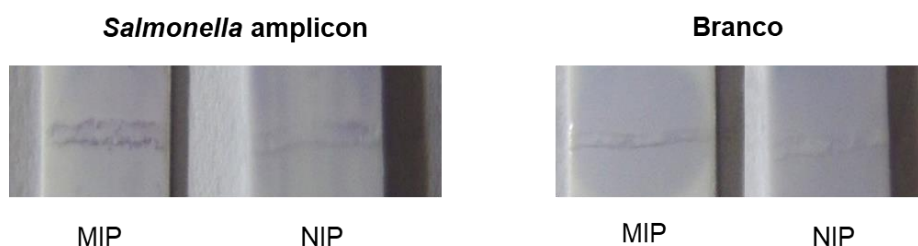


Figura 76 - Resultados obtidos para análise de fluxo lateral na detecção do amplicon de *Salmonella* ($1,2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando $13,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de antiFLU-HRP. Branco possui a mesma concentração que o amplicon.

Fonte: autor do trabalho.

Portanto, uma vez que o dispositivo de fluxo lateral apresentou bons resultados na detecção dos amplicons das bactérias, torna-se possível o desenvolvimento de sistemas para detectar esse tipo de agentes patogênicos; sendo necessário otimizar as condições de análise (avaliando concentração de DNA e anticorpo, fluxo de solução tampão, concentração de TMB, etc.).

4.3.2.8 Reação com moléculas fluorescentes: biotina 4-fluoresceína e Atto 655-biotina

As duas moléculas biotiniladas foram escolhidas pela sua capacidade de fluorescência; o que permite realizar os testes com maior sensibilidade, detectando quantidades de analito muito pequenas. A fluoresceína é uma molécula bem conhecida em ensaios de fluorescência, enquanto Atto é uma família de corantes

modificados para fluorescer com alto desempenho. A Figura 77 mostra a reação para ambas as moléculas biotiniladas.

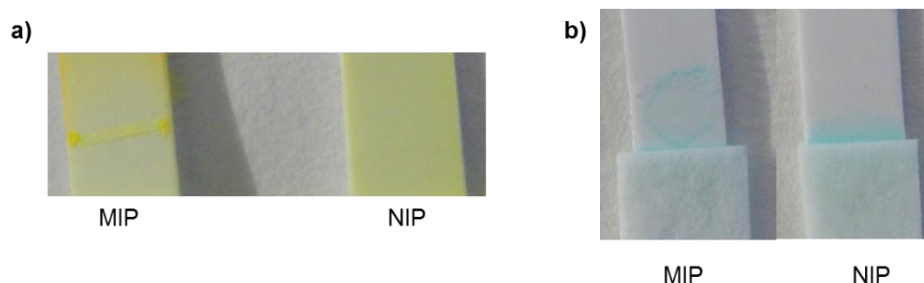


Figura 77 - Reação de seletividade realizada em fluxo lateral avaliando MIP e NIP frente à (a) biotina 4-fluoresceína $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (b) Atto 655-biotina $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ solubilizadas em solução tampão TRIS.

Fonte: autor do trabalho.

A biotina 4-fluoresceína (Figura 77 a) mostrou um bom resultado, uma vez que existe uma cor de alta intensidade na linha MIP e nada para NIP; embora a alta concentração de analito tenha gerado um sinal de background. Para Atto 655-biotin, a reação não ocorreu, uma vez que o analito não se moveu na da membrana de nitrocelulose; permanecendo no final da tira de amostra (Figura 77 b).

O fato da Atto 655-biotina não fluir pela membrana pode ser explicado pela sua estrutura (Figura 78 b).

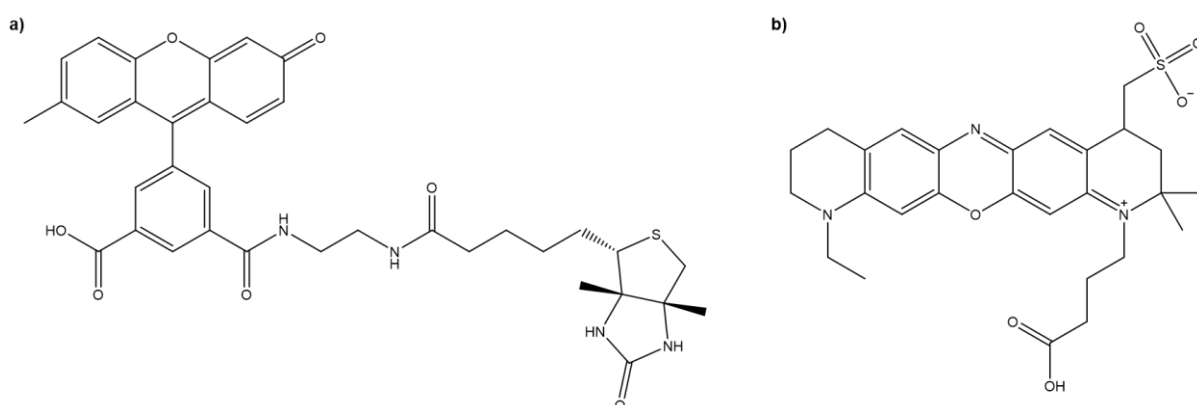


Figura 78 - Fórmula estrutural química da (a) biotina 4-fluoresceína e (b) corante Atto 655.

Fonte: autor do trabalho.

O corante tem em sua estrutura cargas - forma zwitterionica - as quais interagem com os grupos NO_2 reativos da nitrocelulose e, devido a esta forte interação eletrostática, a molécula de corante permanece retida. No caso de fluoresceína

acoplada à biotina (Figura 78 a), não há problemas no seu fluxo por meio da membrana, devido à ausência de cargas e alta solubilidade.

Portanto, em função dos resultados satisfatórios apresentados no desenvolvimento de dispositivos de fluxo lateral empregando MIP como fase reconhecedora, o sistema deverá ser otimizado e aplicado no reconhecimento de diferentes biomoléculas biotiniladas.

5 CONCLUSÕES

O magneto-MIP mostrou-se uma potente ferramenta mantendo suas propriedades magnéticas mesmo após as diferentes modificações realizadas em sua superfície. Todos os materiais foram amplamente caracterizados e, embora o recobrimento com BSA não tenha apresentado os resultados desejados, o polímero recoberto com PEG (RAMIP@PEG) mostrou-se um material que realiza a exclusão proteica e ao mesmo tempo com possui capacidade de adsorção seletiva pela biotina.

O MMIP semicovalente, embora tenha apresentado ligações não específicas, a constante de afinidade apresentada por ele foi maior do que para o MMIP não covalente. A síntese de diferentes complexos covalentes analito-monômero para o preparo do MMIP semicovalente (bem como a otimização e aplicação desse MIP) contemplam os planos futuros de trabalho da pesquisa.

O MMIP foi compatível e apresentou bons resultados nos procedimentos de magneto ELISA usando marcadores enzimáticos. Quando aplicados em um ensaio de magneto-ELISA para a detecção de DNA amplificado por PCR e marcado com biotina, o MIP foi capaz de adsorver pequenas quantidades dos amplicons (ng por mL) e com especificidade, uma vez que o NIP apresentou retenção muito baixa. O MMIP também mostrou alta capacidade de reconhecimento pela biotina-HRP na faixa de concentração analisada; sendo os MIP uma alternativa viável no desenvolvimento de ensaios biomiméticos do tipo ELISA.

Nos sistemas de fluxo lateral o MIP realizou um reconhecimento seletivo de diferentes moléculas biotiniladas e de modo rápido; em ensaios com duração máxima de 30 minutos. Portanto, com as otimizações apropriadas, o MIP possui amplo potencial no desenvolvimento de sistemas de fluxo lateral.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando a estrutura da pesquisa e as etapas realizadas até então, as perspectivas de desenvolvimento e continuidade da pesquisa abrangem os seguintes tópicos:

- Ensaio de seletividade e aplicação do RAMIP em amostras biológicas (por exemplo, sangue humano) e amostras alimentares (por exemplo, leite cru de vaca);
- Síntese do complexo analito-monômero, para síntese semicovalente, utilizando um espaçador de sacrifício ou diferentes grupos funcionais;
- Otimização da síntese semicovalente do MIP para biotina, variando a proporção dos reagentes (complexo analito-monômero e monômero estrutural);
- Avaliação da eficiência de outros polímeros impressos no desenvolvimento de ensaios biomiméticos.

REFERÊNCIAS

- 1 NELSON, D. L. COX, M. M. Protein function. In:_____. **Lehninger principles of Biochemistry**. 5th ed. São Paulo: Sarvier, 2010. Chap. 7, p. 159-188.
- 2 PAIXÃO, J. A.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos: uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96-105, 2004.
- 3 BAHGAVAN, N. E. Vitamin metabolism. In: BAHGAVAN, N. E.; HA, C. E. (Ed.). **Essentials of medical biochemistry with clinical cases**. Amsterdam: Elsevier, 2011. Chap. 36, p. 503-515.
- 4 BAKER, H. et al. A new assay method for biotin in blood, serum, urine, and tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 1962.
- 5 ZEMPLIENI, J.; MOCK, D. M. Biotin biochemistry and human requirements. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 3, p. 128-138, 1999.
- 6 CELEJ, M. S. et al. Conformational flexibility of avidin: the influence of biotin binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 3, p. 922-927, 2004.
- 7 BAYER, E. A.; WILCHEK, M. Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations. **Journal of Chromatography**, v. 510, p. 3-11, 1990.
- 8 WILCHEK, M.; BAYER, E. A. Introduction to avidin-biotin technology. **Methods in Enzymology**, v. 184, p. 5-13, 1990.
- 9 WU, J. et al. Two-dimensional gel electrophoretic detection of protein carbonyls derivatized with biotin-hydrazide. **Journal of Chromatography B**, v. 1019, p. 128-131, 2016.
- 10 ZHU, Q. et al. Ultrasensitive simultaneous detection of four biomarkers based on hybridization chain reaction and biotin-streptavidin signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 42-48, 2015.
- 11 ERDŐSSY, J. et al. Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 179-190, 2016.
- 12 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.
- 13 MAYES, A. G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 321-332, 1997.

- 14 FOGUEL, M. V. **Detecção e quantificação de corantes de importância ambiental empregando sensores químicos baseados em fibras ópticas e polímeros molecularmente impressos**. 2014. 186 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- 15 MATSUI, J. et al. Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor. **Analytical Communications**, v. 34, n. 3, p. 85-87, 1997.
- 16 MASQUÉ, N. et al. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 384-394, 1998.
- 17 NAKA, Y. et al. Preparation of microspheres by radiation-induced polymerization. I. Mechanism for the formation of monodisperse poly(diethylene glycol dimethacrylate) microspheres. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1197-1202, 1991.
- 18 NAKA, Y.; YAMAMOTO, Y. Preparation of microspheres by radiation-induced polymerization. II. Mechanism of microsphere growth. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1287-1298, 1992.
- 19 DONG, X. et al. Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers-influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance. **Analyst**, v. 127, n. 11, p. 1427-1432, 2002.
- 20 WULFF, G.; POLL, H. G. Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 188, n. 4, p. 741-748, 1987.
- 21 WUFF, G. The covalent and other stoichiometric approaches. In: RAMSTRÖM, O.; YAN, M. (Ed.). **Molecularly imprinted materials: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2005. Chap. 4, p. 59-92.
- 22 RAMSTRÖM, O.; ANSELL, R. J. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. **Chirality**, v. 10, n. 3, p. 195-209, 1998.
- 23 KIRSCH, N.; WHITCOMBE, M. J. The semi-covalent approach. In: RAMSTRÖM, O.; YAN, M. (Ed.). **Molecularly imprinted materials: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2005. Chap. 5, p. 93-122.
- 24 SELLERGREN, B. The non-covalent approach to molecular imprinting. In:_____. **Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. Chap. 5, p. 113-184.
- 25 SELLERGREN, B.; ALLENDER, C. J. Molecularly imprinted polymers: a bridge to advanced drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1733-1741, 2005.

26 YILMAZ, E.; SCHMIDT, R. H.; MOSBACH, K. The noncovalent approach. In: RAMSTRÖM, O.; YAN, M. (Ed.). **Molecularly imprinted materials: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2005. Chap. 3, p. 25-58.

27 ZHANG, X. et al. Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 32, p. 3421-3426, 2010.

28 SHAHAR, T. et al. Molecularly imprinted polymer particles: formation, characterization and application. **Aspects**, v. 495, p. 11-19, 2016.

29 SANAGI, M. M. et al. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in fruit samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, p. 155-161, 2013.

30 SAINI, S.; KAUR, A. Molecularly imprinted polymers for the detection of food toxins: a minireview. **Advances in Nanoparticles**, v. 2, p. 60-65, 2013.

31 WU, Y. et al. Electroosmotic pump-supported molecularly imprinted monolithic column for capillary chromatographic separation of nitrophenol isomers. **Electrophoresis**, v. 36, n. 23, p. 2881-2887, 2015.

32 KHAN, S. et al. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer as a sorbent for the analysis of fenarimol in food samples. **Food Chemistry**, v. 199, p. 870-875, 2016.

33 YANG, G.; ZHAO, F. Electrochemical sensor for dimetridazole based on novel gold nanoparticles@molecularly imprinted polymer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 1017-1022, 2015.

34 FOGUEL, M. V. et al. A molecularly imprinted polymer-based evanescent wave fiber optic sensor for the detection of basic red 9 dye. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 218, p. 222-228, 2015.

35 GU, Y. et al. Biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymer with nitroreductase-like activity for metronidazole detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 393-399, 2016.

36 HASHEMI-MOGHADDAM, H. et al. Evaluation of magnetic nanoparticles coated by 5-fluorouracil imprinted polymer for controlled drug delivery in mouse breast cancer model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 497, n. 1, p. 228-238, 2016.

37 LI, L. et al. Temperature and magnetism bi-responsive molecularly imprinted polymers: preparation, adsorption mechanism and properties as drug delivery system for sustained release of 5-fluorouracil. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 158-168, 2016.

38 WACKERLIG, J.; SCHIRHAGL, R. Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: a review. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 250-261, 2016.

39 REYES-GALLARDO, E. M. et al. Polymer-nanoparticles composites in bioanalytical sample preparation. **Bioanalysis**, v. 7, n. 14, p. 1723-1730, 2015.

40 PUPIN, R. R. et al. Molecularly imprinted polymers (MIP): from the bulk synthesis to hybrid material to classic and new applications. In: QUINN, T. (Ed.). **Molecularly imprinted polymers (MIPs): challenges, uses and prospects**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2016. p. 46-118.

41 MA, W. et al. Core-shell molecularly imprinted polymers based on magnetic chitosan microspheres for chloramphenicol selective adsorption. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 146, n. 3, p. 465-474, 2015.

42 XIE, X. et al. Preparation of molecularly imprinted polymers based on magnetic nanoparticles for the selective extraction of protocatechuic acid from plant extracts. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 6, p. 1046-1052, 2015.

43 MA, J. et al. The study of core-shell molecularly imprinted polymers of 17 β -estradiol on the surface of silica nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2791-2795, 2011.

44 LU, F. et al. Flow injection chemiluminescence sensor using core-shell molecularly imprinted polymers as recognition element for determination of dapson. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 79-88, 2012.

45 CARTER, S. R.; RIMMER, S. Surface molecularly imprinted polymer core-shell particles. **Advanced Functional Materials**, v. 14, n. 6, p. 553-561, 2004.

46 BARAHONA, F. et al. Synthesis of core-shell molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization for the inline molecularly imprinted solid-phase extraction of thiabendazole from citrus fruits and orange juice samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 2, p. 217-224, 2011.

47 ZHANG, W. et al. Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2553-2558, 2011.

48 ZHOU, Y. et al. A novel composite of graphene quantum dots and molecularly imprinted polymer for fluorescent detection of parnitrophenol. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 52, p. 317-323, 2014.

49 XUE, J. Q. et al. Surface-imprinted core-shell Au nanoparticles for selective detection of bisphenol A based on surface-enhanced Raman scattering. **Analytica Chimica Acta**, v. 777, p. 57-62, 2013.

50 ZHU, Y. et al. Magnetic-nanoparticle-based immunoassays-on-chip: materials synthesis, surface functionalization, and cancer cell screening. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 22, p. 3953-3972, 2016.

51 GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

52 RASHAD, M. M. et al. Induction heating studies of magnetite nanospheres synthesized at room temperature for magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 23, p. 4019-4023, 2012.

53 TOGASHI, T. et al. One-pot hydrothermal synthesis of an assembly of magnetite nanoneedles on a scaffold of cyclic-diphenylalanine nanorods. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 9, p. 3991-3999, 2011.

54 ABBAS, M. et al. Facile sonochemical synthesis of high-moment magnetite (Fe_3O_4) nanocube. **Journal of Nanoparticle Research**, 2013.
doi:10.1007/s11051-012-1354-y.

55 SATHISH, S.; BALAKUMAR, S. Influence of physicochemical interactions of capping agent on magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 173, p. 364-371, 2016.

56 RAMIMOGHADAM, D. et al. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 368, p. 207-229, 2014.

57 TARTAJ, P. et al. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290/291, p. 28-34, 2005.

58 JIN, G. et al. Novel superparamagnetic core-shell molecular imprinting microspheres towards high selective sensing. **The Analyst**, v. 133, n. 10, p. 1367-1372, 2008.

59 WANG, X. et al. A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 327-332, 2009.

60 WACKERLIG, J.; LIEBERZEIT, P. A. Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing - synthesis, characterisation and application. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 207, p. 144-157, 2014.

61 POMA, A. et al. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 629-637, 2010.

- 62 KONG, X. et al. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe_3O_4 @MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 8-16, 2012.
- 63 LUO, X. et al. Removal of water-soluble acid dyes from water environment using a novel magnetic molecularly imprinted polymer. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1/3, p. 274-282, 2011.
- 64 XU, L. et al. Preparation of thermal-responsive magnetic molecularly imprinted polymers for selective removal of antibiotics from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233/234, p. 48-56, 2012.
- 65 QIAO, F. et al. Water-compatible magnetic imprinted microspheres for rapid separation and determination of triazine herbicides in environmental water. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 957, p. 84-89, 2014.
- 66 HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1/2, p. 3-54, 1999.
- 67 BOOS, K.-S.; FLEISCHER, C. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 1, p. 16-20, 2001.
- 68 BURES, P. et al. Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 72, n. 1/3, p. 25-33, 2001.
- 69 PARISI, O. I. et al. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. **Journal of Polymer Research**, v. 17, n. 3, p. 355-362, 2010.
- 70 SANBE, H.; HAGINAKA, J. Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of beta-blockers in biological fluids. **The Analyst**, v. 128, n. 6, p. 593-597, 2003.
- 71 PUOCI, F. et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 6, p. 1634-1640, 2009.
- 72 SANTOS, M. G. et al. Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties. **The Analyst**, v. 140, n. 22, p. 7768-7775, 2015.
- 73 YETISEN, A. K. et al. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2210-2251, 2013.

74 LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415-2418, 2005.

75 VOLLER, A. et al. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 507-520, 1978.

76 RHEE, J. S. et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for glutathione S-transferase (GST-S) protein in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its application for environmental monitoring. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2458-2466, 2013.

77 DONG, T. et al. Development of a sensitivity-improved immunoassay for the determination of carbaryl in food samples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 7, p. 1106-1112, 2010.

78 WEBER, D. et al. Rapid and sensitive determination of protein-nitrotyrosine by ELISA: application to human plasma. **Free Radical Research**, v. 46, n. 3, p. 276-285, 2012.

79 KUO, H.-T. et al. Application of immunomagnetic particles to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for improvement of detection sensitivity of hCG. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 33, n. 4, p. 377-387, 2012.

80 TEHRANI, Z. R. et al. Development of an integrase-based ELISA for specific diagnosis of individuals infected with HIV. **Journal of Virological Methods**, v. 215/216, p. 61-66, 2015.

81 HADIFAR, F. et al. Multimeric recombinant M2e protein-based ELISA: a significant improvement in differentiating avian influenza infected chickens from vaccinated ones. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0108420.

82 GIL, E. S.; KUBOTA, L. T. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 874-881, 1999.

83 SAJID, M. et al. Designs, formats and applications of lateral flow assay: a literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 689-705, 2015.

84 POSTHUMA-TRUMPIE, G. A. et al. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569-582, 2009.

85 BAUMERT, J. L.; TRAN, D. H. Lateral flow devices for detecting allergens in food. In: FLANAGAN, S. (Ed.). **Handbook of food allergen detection and control**. Cambridge: Woodhead Publishing, [2015]. Chap. 11, p. 219-228.

86 RAEISSADATI, M. J. et al. Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 235-246, 2016.

- 87 NAIK, L. et al. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. **Food Chemistry**, v. 219, p. 85-92, 2017.
- 88 LIU, F. et al. Highly sensitive and selective lateral flow immunoassay based on magnetic nanoparticles for quantitative detection of carcinoembryonic antigen. **Talanta**, v. 161, p. 205-210, 2016.
- 89 LEE, J. H. et al. Multiplex diagnosis of viral infectious diseases (AIDS, hepatitis C, and hepatitis A) based on point of care lateral flow assay using engineered proteinticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 213-225, 2015.
- 90 RODRIGUEZ, N. M. et al. Paper-based RNA extraction, in situ isothermal amplification, and lateral flow detection for low-cost, rapid diagnosis of influenza A (H1N1) from clinical specimens. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 15, p. 7872-7879, 2015.
- 91 WANG, D. B. et al. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on "Road Closure." **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 608-614, 2015.
- 92 ROSSER, A. et al. Isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) of *Schistosoma haematobium* DNA and oligochromatographic lateral flow detection. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, 2015. doi:10.1186/s13071-015-01055-3.
- 93 BAGGIANI, C. et al. MIP-based immunoassays: state of the art, limitations and perspectives. **Molecular Imprinting**, v. 1, p. 41-54, 2013.
- 94 TANG, Y. et al. Ultrasensitive detection of clenbuterol by a covalent imprinted polymer as a biomimetic antibody. **Food Chemistry**, v. 228, p. 62-69, 2017.
- 95 LI, L. et al. Biomimetic ELISA detection of malachite green based on magnetic molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography B**, v. 1035, p. 25-30, 2016.
- 96 GL SCIENCE. **Analysis of calcium pantothenate and biotin**. Disponível em: <www.glsciences.com/pdf/inertsearch_lc/LA884>. Acesso em: 26 jun. 2016.
- 97 UZURIAGA-SÁNCHEZ, R. J. et al. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. **Food Chemistry**, v. 190, p. 460-467, 2016.
- 98 MORAES, G. O. I. et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7687-7696, 2013.
- 99 HOSANGADI, B. D.; DAVE, R. H. An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 35, p. 6375-6378, 1996.

100 BUSCH, B. B. et al. Living polymerization of sulfur ylides. Synthesis of terminally functionalized and telechelic polymethylene. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8330-8337, 2002.

101 BEN-AISSA, A. et al. Comparing nucleic acid lateral flow and electrochemical genosensing for the simultaneous detection of foodborne pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 265-272, 2017.

102 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety**. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/#>. Acesso em: 15 abr. 2017.

103 LIÉBANA, S. et al. Electrochemical genosensing of *Salmonella*, *Listeria* and *Escherichia coli* on silica magnetic particles. **Analytica Chimica Acta**, v. 904, p. 1-9, 2016.

104 BEN-AISSA, A. et al. Magnetic molecularly imprinted polymer for the isolation and detection of biotin and biotinylated biomolecules. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 101-108, 2017.

105 SELLERGREN, B.; HALL, A. J. Fundamental aspects on the synthesis and characterization of imprinted network polymers. In: SELLERGREN, B. (Ed.). **Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. Chap. 2, p. 21-57.

106 SODIPO, B. K.; AZIZ, A. A. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 416, p. 275-291, 2016.

107 SAINI, S. et al. Magnetism: a primer and review. **American Journal of Roentgenology**, v. 150, n. 4, p. 735-743, 1988.

108 LANDOULSI, J. et al. Organic adlayer on inorganic materials: XPS analysis selectivity to cope with adventitious contamination. **Applied Surface Science**, v. 383, p. 71-83, 2016.

109 GONÇALVES, E. S. et al. Efeito do tratamento térmico na microestrutura, turbostraticidade e superfície de carbono vítreo reticulado analisado por XPS, espalhamento Raman e voltametria cíclica. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 158-164, 2009.

110 PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. Composition and physicochemical properties of two protein fractions of bovine blood serum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 964-972, 2008.

111 MAJOREK, K. A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3/4, p. 174-182, 2012.

112 PORPINO, K. K. P. et al. Fe (II) adsorption on *Ucides Cordatus* crab shells. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 928-932, 2011.

113 FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 1, p. 2-10, 2010.