

RESSALVA

**Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo deste
documento será
disponibilizado somente a
partir de 19/07/2027.**

PAULA MANTOVANI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS DE ANÁLISE RÁPIDA PARA
MONITORAMENTO DE PSA, EMPREGANDO POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS
(RADES MIP-PSA) VISANDO CONTRIBUIR COM O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER
DE PRÓSTATA**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara.

Supervisor(a): Profa. Dra. Maria Del Pilar
Taboada Sotomayor

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) -
150256/2024-8

Araraquara
2025

RESUMO

O projeto visa desenvolver polímeros molecularmente impressos (MIPs) seletivos para o antígeno prostático específico (PSA/KLK3), com potencial aplicação em métodos de diagnóstico de câncer de próstata. A estratégia adotada envolve o uso de ferramentas in silico para a seleção racional de monômeros funcionais e agentes de reticulação, com base em sua afinidade para interação com aminoácidos presentes na estrutura do PSA. Resultados computacionais indicaram o ácido metacrílico e o ácido itacônico como os monômeros mais promissores, além do divinilbenzeno como o reticulador ideal para garantir a estabilidade estrutural do polímero. Os MIPs foram sintetizados e avaliados quanto à sua capacidade de reconhecimento seletivo em comparação aos polímeros não impressos (NIPs), demonstrando desempenho superior em diferentes concentrações e massas de sorvente. Os testes indicam forte seletividade e eficiência na adsorção do PSA, validando a abordagem racional empregada em sua construção. A aplicação em matrizes sintéticas, como urina, soro e esperma, bem como em extratos de linhagens celulares de próstata normais (PNT-2) e tumorais (LNCaP, PC-3, DU145), está em andamento para avaliar sua robustez analítica em condições complexas. Perspectivas futuras incluem a integração dos MIPs desenvolvidos em dispositivos de fluxo lateral (LFDs), visando o desenvolvimento de plataformas de ponto de atendimento (POCT) rápidas, seletivas e de baixo custo para triagem de PSA e monitoramento clínico.

Palavras chaves: câncer de próstata; sensor óptico; polímero molecularmente impresso; point of care; sistemas de fluxo lateral.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é uma das principais causas de morte entre homens de 55 a 80 anos, representando 29,2% dos tumores masculinos e cerca de 10% das mortes por câncer. É o sexto tipo mais letal no mundo, com previsão de 71,7 mil novos casos no Brasil entre 2023 e 2025. A maioria dos casos ocorre em homens com 65 anos ou mais. Inicialmente assintomático, o câncer costuma ser diagnosticado tardiamente, quando já está em estágio avançado e metastático. Fatores de risco incluem idade, histórico familiar e predisposição genética. O diagnóstico precoce é fundamental para aumentar as chances de sucesso no tratamento [1–4]. A fosfatase ácida prostática (PAP) é uma enzima produzida principalmente pela próstata e foi um dos primeiros biomarcadores usados no diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata. No entanto, sua aplicação enfrentava dificuldades na quantificação precisa da isoenzima específica da próstata, o que motivou a busca por métodos diagnósticos mais confiáveis [4]. Nesse contexto, em 1979, Wang e colaboradores isolaram e purificaram uma glicoproteína de 33 kD distinta da PAP, mas altamente específica para células prostáticas, denominada antígeno prostático específico (PSA). Posteriormente, identificou-se que o PSA é uma enzima do tipo peptidase, conhecida como kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) [2,4,5]. O PSA é uma proteína produzida pelas células do ducto e do epitélio acinar da próstata, sendo secretada no lúmen. Sua principal função é clivar as semenogelinas I e II no coágulo seminal, contribuindo para a liquefação do fluido seminal e facilitando a mobilidade dos espermatozoides [6,7]. Com o aumento da incidência do câncer de próstata (CaP) nos últimos anos, houve um considerável aumento no uso do PSA como biomarcador [8]. A estrutura secundária do KLK3 ou PSA é apresentada na Figura 1.

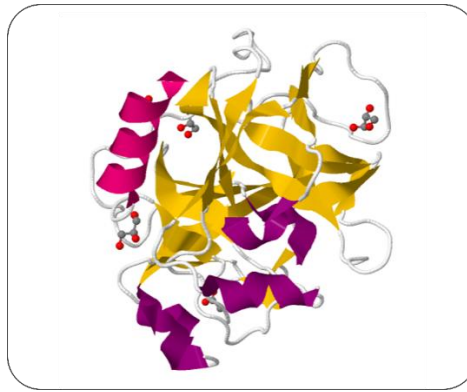


Figura 1. Estrutura secundária da *kallikrein-related peptidase 3*, disponível em: <https://www.rcsb.org/3d-view/jsmol/1gvz/>

O exame de PSA é um teste de sangue amplamente utilizado no diagnóstico e monitoramento de doenças da próstata. Para garantir resultados precisos, recomenda-se seguir orientações prévias, como evitar atividades físicas intensas, ejaculações recentes, uso de certos medicamentos e procedimentos que envolvam a próstata. Após a coleta, o sangue é analisado em laboratório utilizando diferentes metodologias, que variam em sensibilidade, especificidade e custo. Entre as principais técnicas estão o ELISA, mais acessível, porém menos sensível, e métodos modernos como a eletroquimioluminescência (ECLIA) e a imunoquimioluminescência, que oferecem maior precisão. O exame pode medir o PSA Total (ligado e livre) e o PSA Livre (não ligado), sendo este último útil para distinguir entre alterações benignas e malignas. A escolha da técnica depende dos recursos disponíveis e da necessidade clínica [9]. Dado que o antígeno específico da próstata (PSA) mostrou ter menor sensibilidade e especificidade na distinção entre doença benigna e maligna, resultando em falsos negativos e/ou falsos positivos [7,10], a busca por novos biomarcadores tem sido intensificada para aprimorar o diagnóstico do câncer de próstata (CaP).

Dispositivos de fluxo lateral (LF), amplamente utilizados em testes rápidos como os de gravidez, oferecem diversas vantagens em relação a métodos laboratoriais tradicionais de detecção de PSA, como ELISA, ECLIA e imunoquimioluminescência. Entre os principais benefícios estão a rapidez nos resultados, portabilidade, baixo custo, facilidade de uso e independência de equipamentos especializados, tornando-os ideais para triagens e uso domiciliar. No entanto, esses dispositivos apresentam menor sensibilidade e precisão, além

de desafios como o alto custo de anticorpos, manuseio delicado, variações no tempo de incubação e baixa estabilidade. Para superar essas limitações, pesquisas vêm explorando o uso de materiais biomiméticos como alternativa promissora. Entre os materiais alternativos, os polímeros molecularmente impressos (MIPs) têm se destacado por sua alta seletividade e potencial para substituir materiais biológicos, oferecendo vantagens em custo e durabilidade. Os MIPs são produzidos na presença de uma molécula-alvo, que atua como molde durante a polimerização. Após a remoção dessa molécula, o polímero resultante apresenta cavidades específicas que reconhecem e se ligam seletivamente ao analito de interesse. Por essa capacidade de imitar o reconhecimento biológico, os MIPs são considerados materiais biomiméticos, funcionando de forma semelhante ao sistema antígeno/anticorpo [12,13]. O processo de moldagem molecular, representado na Figura 2, consiste na síntese de MIPs por polimerização radicalar, geralmente realizada em meio homogêneo sob atmosfera de nitrogênio, livre de oxigênio, e ativada por aquecimento ou radiação UV. Inicialmente, o analito interage com os monômeros funcionais, formando um complexo analito-monômero. Em seguida, a adição de um monômero estrutural responsável pelas ligações cruzadas gera uma matriz polimérica rígida. Após a polimerização, o analito é removido, deixando cavidades seletivas que correspondem à sua estrutura, prontas para reconhecimento específico do alvo [13].

Como material controle, também é produzido o polímero não impresso (NIP, do inglês, Non-Imprinted Polymer), o qual é sintetizado na ausência da molécula molde, resultando em um polímero sem as cavidades seletivas. Atualmente, os MIPs têm sido sintetizados para diferentes tipos de moléculas [14,15] e com aplicação nas mais variadas áreas: cromatografia [16], extração em fase sólida (SPE) [17,18], sensores [19,20], catálise [21], e liberação controlada de fármacos [22]. Os MIPs, quando aplicados em conjunto com técnicas clássicas, têm mostrado alta eficiência no reconhecimento seletivo. Contudo, limitações como alto custo, longos tempos de análise em cromatografia e baixa versatilidade em SPE impulsionam a busca por métodos mais simples e rápidos. A incorporação de MIPs em dispositivos de fluxo lateral representa um avanço importante, tornando esses testes mais robustos e eficazes para aplicações diagnósticas, como a detecção de PSA. Essa integração pode

aumentar a precisão em triagens iniciais, oferecendo uma alternativa acessível, estável e confiável, especialmente útil em locais remotos ou com recursos limitados. Assim, os MIPs se destacam como uma inovação promissora para expandir o acesso ao diagnóstico e fortalecer a saúde pública.

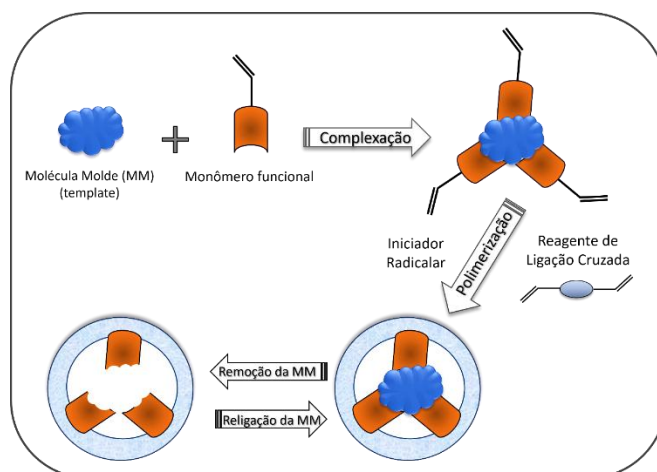


Figura 2. Representação esquemática da formação de um MIP por polimerização radicalar. Fonte: Autoria própria.

Os sistemas de fluxo lateral são análises baseadas nos testes do tipo Point of Care Tests (POCT), projetados para uso em qualquer local, sem a necessidade de laboratórios especializados. A relevância econômica desses dispositivos foi destacada em relatório da empresa Zion Market Research™ [23]. Segundo o relatório citado, em 2016 o mercado global de POCT atingiu 23,5 bilhões de dólares, com previsão de crescer para 40,5 bilhões até 2022. Os maiores consumidores são os Estados Unidos, seguidos pela Alemanha, França e Reino Unido na Europa; na Ásia, destacam-se China, Japão e Índia, enquanto o Brasil figura como principal usuário na América do Sul. Os ensaios de fluxo lateral têm se popularizado em áreas clínicas, alimentares e diagnósticas devido à rapidez, alta seletividade e estabilidade, baixo custo e facilidade de uso [24]. O dispositivo de LF, conforme ilustrado na Figura 3a, é composto por um cartão que suporta todos os seus componentes: o compartimento para inserção da amostra (tira de amostra), o compartimento conjugado à tira de amostra (tira conjugada), onde estão as moléculas marcadoras responsáveis pelo bioreconhecimento e ligação ao analito, a membrana de nitrocelulose, por onde a amostra flui, e a tira adsorvente, que absorve a amostra e demais reagentes. A membrana de nitrocelulose (Figura 3b) possui duas linhas distintas: a linha

teste, com anticorpos específicos para o analito, e a linha controle, contendo moléculas bioativas que reagem com as moléculas marcadoras. Após a passagem da amostra, a reação resulta em mudanças de coloração nessas linhas, indicando a presença do analito [25].

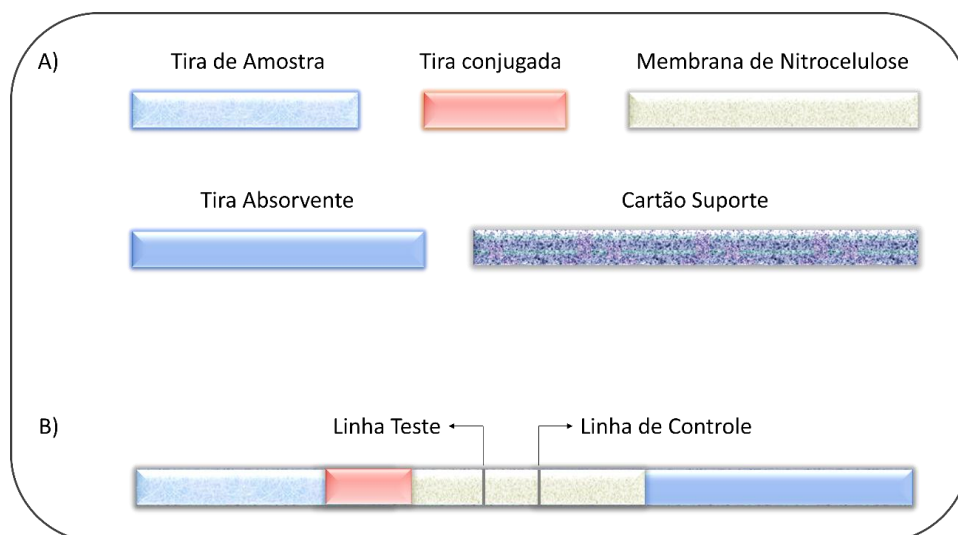


Figura 3. (a) Componentes da tira de Fluxo Lateral (LF) e (b) visão geral de um sistema de Fluxo Lateral montada e contendo as linhas de teste e controle. Fonte: Autoria Própria

Para otimizar o desempenho do dispositivo proposto, a seletividade dos MIPs pode ser aprimorada por meio de análises baseadas no método ELISA, amplamente utilizado na detecção de bactérias, vírus e fungos, que se fundamenta no sistema de reconhecimento antígeno-anticorpo. Devido à sua flexibilidade para diferentes tipos de ensaios, como os diretos e em formato sanduíche, essa técnica tem sido extensivamente aplicada nos últimos anos [26,27]. Ao longo das décadas, o método foi aprimorado, demonstrando resultados excepcionais. Graças à sua alta sensibilidade e seletividade, o ELISA continua sendo uma ferramenta essencial em diversas áreas até hoje. Além disso, a técnica foi constantemente refinada, sendo aplicada em diversas áreas, como monitoramento ambiental [28], determinação de estresse proteico [29], quantificação de hormônios [30] e diagnósticos de doenças como HIV, Ebola e Influenza [31,32]. O ensaio ELISA geralmente utiliza anticorpos imobilizados em uma placa de poliestireno com poços de diferentes quantidades. O procedimento pode ser dividido em oito etapas principais: (i) ativação do poço, (ii) lavagem da placa, (iii) imobilização dos anticorpos, (iv) lavagem para eliminar o excesso de

anticorpos, (v) incubação com antígeno/analito, (vi) incubação com anticorpo marcado com molécula reportadora (para quantificação), (vii) lavagem e, finalmente, (viii) adição do substrato cromogênico e leitura óptica [33]. Devido à eficácia e versatilidade dos imunoenaios, que envolvem interações altamente específicas entre anticorpos e antígenos, eles foram integrados a sistemas de fluxo lateral e sensores. No entanto, como ocorre com os imunossensores, a produção de anticorpos enfrenta desafios, incluindo o tempo e os custos elevados, além de questões éticas relacionadas ao uso de animais [6], especialmente em dispositivos descartáveis. Nesse contexto, os MIPs surgem como uma alternativa mais econômica e versátil para ensaios desse tipo.

Embora existam poucos estudos que abordem a substituição de anticorpos por MIPs em ensaios do tipo ELISA [34–36], até o momento não há registros de seu uso em sistemas de fluxo lateral. Como destacado, a criação de sensores e dispositivos de fluxo lateral que utilizam MIPs como elementos de reconhecimento seletivos se apresenta como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de dispositivos portáteis, versáteis e de baixo custo para a detecção precoce de câncer de próstata. O biomarcador abordado nesta pesquisa é a calicreína KLK3. Ao revisar as bases de dados da literatura científica, observa-se que há escassez de estudos que empreguem polímeros molecularmente impressos para a detecção de câncer de próstata (CaP). Isso ressalta a singularidade e o considerável potencial inovador deste projeto. Ao mesmo tempo, é evidente que a temática está despertando crescente interesse dentro da comunidade científica. Assim, o propósito desta pesquisa é desenvolver testes de diagnóstico para câncer de próstata que sejam mais rápidos, seletivos e economicamente acessíveis em comparação com os testes utilizando anticorpos. Considerando a presença de múltiplos biomarcadores para o câncer de próstata, justifica-se a investigação baseada na aplicação da tecnologia de impressão molecular, utilizando MIPs como fases de reconhecimento seletivo nos dispositivos propostos.

Embora haja estudos na literatura sobre detecção de PSA no câncer de próstata, as sínteses e aplicações desses materiais diferem do proposto neste projeto. Por exemplo, Matsumoto et al. desenvolveram um material seletivo por impressão molecular para PSA, aplicado em superfícies de ouro funcionalizadas para análise por SPR, mas sem testes em amostras reais. Além disso, a

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] INCA Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-decancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 17 de abril de 2024.
- [2] C. Dejous, U.M. Krishnan, Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen, *Biosensors and Bioelectronics* 173 (2021) 112790. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112790>.
- [3] S.M. Traynor, R. Pandey, R. Maclachlan, A. Hosseini, T.F. Didar, F. Li, L. Soleymani, Review—Recent Advances in Electrochemical Detection of Prostate Specific Antigen (PSA) in Clinically-Relevant Samples, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020) 037551. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ab69fd>.
- [4] X. Wang, X. He, Z. He, L. Hou, C. Ge, L. Wang, S. Li, Y. Xu, Detection of prostate specific antigen in whole blood by microfluidic chip integrated with dielectrophoretic separation and electrochemical sensing, *Biosensors and Bioelectronics* 204 (2022) 114057. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114057>.
- [5] M.C. Wang, L.A. Valenzuela, G.P. Murphy, T.M. Chu, Purification of a Human Prostate Specific Antigen, *Journal of Urology* 197 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.10.100>.
- [6] S.P. Balk, Y.-J. Ko, G.J. Bubley, Biology of Prostate-Specific Antigen, *JCO* 21 (2003) 383–391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.083>.
- [7] G. Ertürk, M. Hedström, M.A. Tümer, A. Denizli, B. Mattiasson, Real-time prostate-specific antigen detection with prostate-specific antigen imprinted capacitive biosensors, *Analytica Chimica Acta* 891 (2015) 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.055>.
- [8] X.-H. Pham, E. Hahm, K.-H. Huynh, B.S. Son, H.-M. Kim, B.-H. Jun, Sensitive Colorimetric Detection of Prostate Specific Antigen Using a Peroxidase-Mimicking Anti-PSA Antibody Coated Au Nanoparticle, *BioChip J* 14 (2020) 158–168. <https://doi.org/10.1007/s13206-019-4204-5>.
- [9] Total prostate-specific antigen ELISA (PSA ELISA) for the quantitative determination of PSA in human serum., *ALPO DIAGNOSTICS* (n.d.). <https://www.alpco.com/pdfs/25/25-PSAHU-E01.pdf> (accessed abril 17, 2024).
- [10] Z. Yazdani, H. Yadegari, H. Heli, A molecularly imprinted electrochemical nanobiosensor for prostate specific antigen determination, *Analytical Biochemistry* 566 (2019) 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.11.020>.

- [11] R.J. Babaian, D.A. Johnston, W. Naccarato, A. Ayala, V.A. Bhadkamkar, H.A. Fritsche, THE INCIDENCE OF PROSTATE CANCER IN A SCREENING POPULATION WITH A SERUM PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN BETWEEN 2.5 AND 4.0 NG./ML.: RELATION TO BIOPSY STRATEGY, (n.d.).
- [12] C.R.T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, L.T. Kubota, Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação, Quím. Nova 28 (2005) 1076–1086. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600024>.
- [13] C.R.T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, L.T. Kubota, Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos, Quím. Nova 28 (2005) 1087–1101. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600025>.
- [14] M.V. Foguel, N.T.B. Pedro, A. Wong, S. Khan, M.V.B. Zanoni, M.D.P.T. Sotomayor, Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective adsorption and quantification of Acid Green 16 textile dye in water samples, Talanta 170 (2017) 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.013>.
- [15] L.D. Marestoni, A. Wong, G.T. Feliciano, M.R.R. Marchi, C.R.T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, Semi-Empirical Quantum Chemistry Method for Pre-Polymerization Rational Design of Ciprofloxacin Imprinted Polymer and Adsorption Studies, Journal of the Brazilian Chemical Society (2015). <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150256>.
- [16] Y. Wu, W. Zhang, Y. Chen, Z. Chen, Electroosmotic pump-supported molecularly imprinted monolithic column for capillary chromatographic separation of nitrophenol isomers, Electrophoresis 36 (2015) 2881–2887. <https://doi.org/10.1002/elps.201500085>.
- [17] S. Khan, T. Bhatia, P. Trivedi, G.N.V. Satyanarayana, K. Mandrah, P.N. Saxena, M.K.R. Mudiam, S.K. Roy, Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer as a sorbent for the analysis of fenarimol in food samples, Food Chemistry 199 (2016) 870–875. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.091>.
- [18] J.H. Franco, A.B. Aissa, G.G. Bessegato, L.M. Fajardo, M.V.B. Zanoni, M.I. Pividori, M. Del Pilar Taboada Sotomayor, Assessment of molecularly imprinted polymers (MIPs) in the preconcentration of disperse red 73 dye prior to photoelectrocatalytic treatment, Environ Sci Pollut Res 24 (2017) 4134–4143. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8116-9>.
- [19] A. Wong, M.V. Foguel, S. Khan, F.M. de Oliveira, C.R.T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL SENSOR

MODIFIED WITH MWCNT-COOH AND MIP FOR DETECTION OF DIURON,
Electrochimica Acta 182 (2015) 122–130.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.054>.

[20] M.V. Foguel, X.-A. Ton, M.V.B. Zanoni, M.D.P.T. Sotomayor, K. Haupt, B. Tse Sum Bui, A molecularly imprinted polymer-based evanescent wave fiber optic sensor for the detection of basic red 9 dye, *Sensors and Actuators B: Chemical* 218 (2015) 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.007>.

[21] Y. Gu, X. Yan, C. Li, B. Zheng, Y. Li, W. Liu, Z. Zhang, M. Yang, Biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymer with nitroreductase-like activity for metronidazole detection, *Biosensors and Bioelectronics* 77 (2016) 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.09.060>.

[22] H. Hashemi-Moghaddam, S. Kazemi-Bagsangani, M. Jamili, S. Zavareh, Evaluation of magnetic nanoparticles coated by 5-fluorouracil imprinted polymer for controlled drug delivery in mouse breast cancer model, *International Journal of Pharmaceutics* 497 (2016) 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.040>.

[23] Global Newswirw. At 10.00% CAGR, Global Point Of Care Diagnostics Market Will Reach \$40.50 Bn by 2022. Disponível em: <<https://globenewswire.com/newsrelease/2017/07/13/1043967/0/en/At-10-00-CAGR-Global-Point-Of-Care-Diagnostics-Market-WillReach-40-50-Bn-by-2022.html>>. Acesso em: 16 março de 2022.

[24] M. Sajid, A.-N. Kawde, M. Daud, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *Journal of Saudi Chemical Society* 19 (2015) 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.

[25] R. Pupin, M.I. Pividori, M.D.P.T. Sotomayor, Polímeros biomiméticos nanomagnéticos com acesso restrito (RAMIP magnéticos) obtidos por síntese semicovalente e não covalente visando aplicação em imunossensores e imunoensaios, Mestrado em Química, Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, n.d.

[26] A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip* 13 (2013) 2210. <https://doi.org/10.1039/c3lc50169h>.

[27] R.M. Lequin, Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* 51 (2005) 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>.

[28] J.-S. Rhee, B.-M. Kim, C.-B. Jeong, K.M.Y. Leung, G.S. Park, J.-S. Lee, 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* 93 (2013) 2458–2466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.077>.

[29] D. Weber, N. Kneschke, S. Grimm, I. Bergheim, N. Breusing, T. Grune, Rapid and sensitive determination of protein-nitrotyrosine by ELISA: Application to human plasma, *Free Radical Research* 46 (2012) 276–285. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.652627>.

[30] H.-T. Kuo, J.Z. Yeh, P.-H. Wu, C.-M. Jiang, M.-C. Wu, APPLICATION OF IMMUNOMAGNETIC PARTICLES TO ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR IMPROVEMENT OF DETECTION SENSITIVITY OF HCG, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 33 (2012) 377–387. <https://doi.org/10.1080/15321819.2012.655820>.

[31] Z. Rikhtegaran Tehrani, K. Azadmanesh, E. Mostafavi, S. Soori, M. Azizi, A. Khabiri, Development of an integrase-based ELISA for specific diagnosis of individuals infected with HIV, *Journal of Virological Methods* 215–216 (2015) 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.013>.

[32] F. Hadifar, J. Ignjatovic, S. Tarigan, R. Indriani, E. Ebrahimie, N.H. Hasan, A. McWhorter, S. Putland, A. Ownagh, F. Hemmatzadeh, Multimeric Recombinant M2e Protein-Based ELISA: A Significant Improvement in Differentiating Avian Influenza Infected Chickens from Vaccinated Ones, *PLoS ONE* 9 (2014) e108420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108420>.

[33] E.D.S. Gil, L.T. Kubota, Y.I. Yamamoto, Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica, *Quím. Nova* 22 (1999). <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000600015>.

[34] L. Li, Z. Lin, A. Peng, H. Zhong, X. Chen, Z. Huang, Biomimetic ELISA detection of malachite green based on magnetic molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B* 1035 (2016) 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.015>.

[35] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, MIP-based immunoassays: State of the Art, limitations and Perspectives, *Molecular Imprinting* 1 (2013). <https://doi.org/10.2478/molim-2013-0002>.

[36] Y. Tang, J. Gao, X. Liu, X. Gao, T. Ma, X. Lu, J. Li, Ultrasensitive detection of clenbuterol by a covalent imprinted polymer as a biomimetic antibody, *Food Chemistry* 228 (2017) 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.102>.

[37] H. Matsumoto, H. Sunayama, Y. Kitayama, E. Takano, T. Takeuchi, Site-specific post-imprinting modification of molecularly imprinted polymer nanocavities with a modifiable functional monomer for prostate cancer biomarker

recognition, *Science and Technology of Advanced Materials* 20 (2019) 305–312.
<https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1583495>.

[38] L.C.S. Neres, G.T. Feliciano, R.F. Dutra, M.D.P.T. Sotomayor, Development of a selective molecularly imprinted polymer for troponin T detection: a theoretical-experimental approach, *Materials Today Communications* 30 (2022) 102996.
<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102996>.