

RAFAEL ROVATTI PUPIN

Síntese e aplicação de polímeros com impressão molecular (MIP) e uso de aptâmeros na construção de dispositivos de análise rápida do tipo fluxo lateral para determinação de tetraciclina

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

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

Araraquara
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

P976s Pupin, Rafael Rovatti
Síntese e aplicação de polímeros com impressão molecular (MIP) e uso de aptâmeros na construção de dispositivos de análise rápida do tipo fluxo lateral para determinação de tetraciclina / Rafael Rovatti Pupin. – Araraquara : [s.n.], 2021
170 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria del Pilar Taboada Sotomayor

1. Tetraciclina. 2. Antibacterianos. 3. Materiais biomiméticos. 4. Materiais porosos. 5. DNA. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Síntese e aplicação de polímeros com impressão molecular (MIP) e uso de aptâmeros na construção de dispositivos de análise rápida do tipo fluxo lateral para determinação de tetraciclina

AUTOR: RAFAEL ROVATTI PUPIN

ORIENTADORA: MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



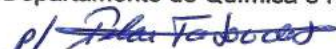
Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



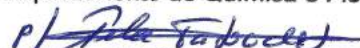
Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. CAROLINA VENTURINI ULIANA (Participação Virtual)
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química São Carlos- USP - São Carlos



Prof. Dr. ÉDER TADEU GOMES CAVALHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos



Prof. Dr. BRUNO CAMPOS JANEGITZ (Participação Virtual)
Ciências da natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAr - Araras

Araraquara, 22 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Rafael Rovatti Pupin

Nome em citações bibliográficas: PUPIN, R. R.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado em Química

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

Período: agosto 2017 - junho 2021.

Título da tese: Síntese e aplicação de polímeros molecularmente impressos (MIP) na construção de dispositivos de análise rápida do tipo fluxo lateral para detecção de contaminantes ambientais.

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

Bolsa: FAPESP (Proc. nº 2017/20789-9).

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 BIBLIOGRÁFICA

Artigos publicados

1. MARFÀ, J.; PUPIN, R. R.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; PIVIDORI, M. I. Magnetic-molecularly imprinted polymers in electrochemical sensors and biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. DOI: 10.1007/s00216-021-03461-x. 2021.
2. PUPIN, R. R.; FOGUEL, M. V.; GONÇALVES, L. M.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Magnetic molecularly imprinted polymers obtained by photopolymerization for selective recognition of penicillin G. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, p. 1-10, 2020.
3. BERGAMIN, B.; PUPIN, R. R.; WONG, A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. A New Electrochemical Platform Based on a Polyurethane Composite Electrode Modified with Magnetic Nanoparticles Coated with Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of Estradiol Valerate in Different Matrices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p.2344-2354, 2019.
4. 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, 2017.

Capítulos de livro

1. MORTARI, B.; ZEB, S.; PUPIN, R. R.; KHAN, S.; WONG, A.; SOTOMAYOR, M. D.P.T. **Molecularly imprinted polymer composites as sensors**. In: *Molecularly Imprinted Polymer Composites: Synthesis, Characterization and Applications*. 1 ed. Elsevier, p. 227-265, 2021.
2. 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 apresentados em congressos científicos

1. RAFAEL R. PUPIN, MARIA DEL PILAR T. SOTOMAYOR. Tetracycline Molecularly Imprinted Polymers (MIP): synthesis, characterization and comparison between conventional MIP, MIP@SiO₂ and hollow porous MIP. In: Spring 2019 ACS National Meeting, Orlando/Florida, 2019.
2. BERGAMIN, B.; WONG, A.; PUPIN, R. R.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Development of a new electrochemical platform based on graphite polyurethane composite electrode modified with magnetic-MIP for determination of estradiol valerate in different matrices In: **XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE)**, Ribeirão Preto/SP, 2019.
3. MARFA, J.; PUPIN, R. R.; BEN AISSA, A.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; PIVIDORI, M.I. Nucleic Acid Lateral Flow assays based on molecularly imprinted polymer for the detection of communicable and non-communicable diseases. In: 28th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors), Miami/Florida, 2018.
4. IERICK, I. F.; PUPIN, R. R.; MONTEIRO, G. C.; BOLZANI, V. S.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Síntese e caracterização de polímeros fluorescentes com núcleo de sílica para aplicação em cromatografia em camada delgada In: **41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, Foz do Iguaçu/PR, 2018.
5. BERGAMIN, B.; PUPIN, R. R.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Síntese e otimização de polímeros molecularmente impressos para substâncias estrogênicas In: **19^o Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, Caldas Novas/GO, 2018.
6. 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 biomolecule. In: **5th International Conference on Bio-Sensing Technology**, Riva Del Garda/Italy, 2017.

7. 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**, São Paulo/SP, 2017.

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

Congressos mais recentes

1. American Chemical Society - Spring 2019 National Meeting & Exposition, 2019, Orlando/Florida.
2. 46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo.

Curso de curta duração ministrado

Colaborador do minicurso “Contribuições da eletroanalítica nas áreas de energia, saúde e meio ambiente” na **1^a Escola de Verão em Química** do IQ-UNESP/Araraquara, fevereiro de 2018.

Simpósios e Workshops

1. Apresentação de trabalho intitulado “Desenvolvimento de dispositivos de análise rápida do tipo fluxo lateral para determinação de tetraciclina utilizando MIP como fase de reconhecimento seletivo” no **III Workshop INCT-DATREM**, março de 2020.
2. Participação no Workshop “**University of Queensland (Australia) e IPBEN (Unesp, Brasil)**”, UNESP-Rio Claro, dezembro de 2018.

3. Participação no **II International Symposium of Medicinal Chemistry and Regenerative Medicine**, Universidade de Araraquara (UNIARA), novembro de 2017.

PRÊMIOS E TÍTULOS

1. Melhor trabalho da área de sensores no III Workshop INCT-DATREM.
2. Prêmio Lavoisier do CRQ - 4ª Região.
3. Certificado de honra ao mérito - Melhor aluno da turma (Instituto de Química/UNESP – Araraquara).

ATIVIDADES ACADÊMICAS COMPLEMENTARES

Coorientação científica

Coorientação da aluna de iniciação científica Isabela Fernandes Ierick. Projeto: “Síntese e aplicação de polímeros biomiméticos em cromatografia em camada delgada para identificação e separação de compostos orgânicos com ênfase na análise de pesticidas”. Período: 2017-2019.

Estágio de docência

Estágio docência na disciplina prática e teórica de Análise Instrumental para o terceiro ano da licenciatura em química, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor. Instituto de Química-Araraquara, UNESP, 2018.

Participação em conselho

Representante discente suplente do Programa de Pós-Graduação em Química na Congregação. Período: 2017-2018.

Cursos de aperfeiçoamento

2017 - Treinamento na base de dados SciFinder.

2017- Treinamento nas bases de dados Scopus e Reaxys e no gerenciador de referências Mendeley.

2017- *Introduction to drug delivery*.

Aos meus pais e às minhas irmãs
dedico este trabalho com amor por
todo apoio que me foi proporcionado.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, ajuda e sabedoria que me foram concedidas.

Aos meus pais, José e Ana, por todo amor, cuidado e suporte dados na minha jornada pessoal e profissional. Obrigado pelos valiosos conselhos e assistência em todas as situações.

Às minhas irmãs Josiana e Heloisa e ao meu sobrinho Heitor, pelo amor, união, risadas e pelos cafés. Obrigado por compartilharmos os melhores momentos juntos.

À Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar T. Sotomayor pela orientação e ensinamentos no desenvolvimento desde trabalho. Também agradeço muito por todas as oportunidades e incentivos que me foram fornecidos na construção do meu aprendizado nesses nove anos de trabalho em conjunto.

À Dr.^a Carolina V. Uliana e Prof.^a Dr.^a Fabíola M. V. Pereira pela avaliação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

À Ma. Rafaela Lamarca e Prof. Dr. Paulo Clairmont pela colaboração em uma das etapas deste trabalho.

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

A todos os colegas e amigos do GEAr. Em especial aos Drs. Alysson, Carol Uliana e Javier por todas as conversas científicas e não científicas, ajuda com experimentos, momentos de descontração e bons cafés.

À Mariana B. da Silva, minha grande amiga, pelo apoio, pelas risadas e palavras de sabedoria. Agradeço a companhia, os “papos cabeça” e por deixar meus dias mais leves.

Ao Dr. Marcos V. Foguel, que começou como meu coorientador de iniciação científica e se tornou um grande amigo. Agradeço muito por todas as contribuições no decorrer da minha jornada científica.

À Dr.^a Mariele M. Pedroso e Dr.^a Juliana F. de Brito agradeço a companhia, as risadas, momentos de descontração e por todos os almoços e cafés. A amizade de vocês é um dos ganhos da pós-graduação.

À Dr.^a Carolina G. Rocha agradeço pelo carinho e amizade, pela companhia, pelas ótimas conversas (tanto as sérias quanto as divertidas) e caronas.

Ao Dr. Gustavo C. Monteiro pela parceria, colaborações, discussões científicas e por toda ajuda nesses anos.

Aos técnicos pelas análises realizadas e discussões dos resultados, bem como aos funcionários e servidores do Instituto de Química. Também ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo nº 2017/20789-9).

“Pois onde está o vosso tesouro, aí também estará o vosso coração”.

(Mateus 6,21)

RESUMO

Os contaminantes emergentes são uma das classes de compostos liberados no meio ambiente que ocasionam poluição no ambiente terrestre, aquático e atmosférico; além de também estarem presentes nos alimentos e águas para consumo humano. Os fármacos, principalmente os antibióticos, estão entre os mais encontrados no meio ambiente. A tetraciclina pertence a uma classe de antibióticos abundantemente aplicados em uso humano e veterinário devido seu amplo espectro de ação e, por conseguinte, resíduos desse medicamento são facilmente detectados no ambiente. Como a exposição contínua a medicamentos pode ser prejudicial à saúde humana, métodos rápidos e seletivos para detectá-los são essenciais. Testes rápidos do tipo fluxo lateral foram desenvolvidos para determinação de tetraciclina: em um dos testes foi utilizado polímeros molecularmente impressos (MIP) e no outro aptâmeros, ambos os componentes como fase de reconhecimento seletivo. Inicialmente foram sintetizados três tipos diferentes de MIP: tradicional, *core-shell* e oco (de alta porosidade). Os materiais foram caracterizados por técnicas como microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho. Após otimizadas as melhores condições de análise, o MIP oco apresentou resultados superiores para identificação da tetraciclina: capacidade máxima de ligação de $5,6 \text{ mg g}^{-1}$ e constante de afinidade de $0,2 \text{ L mg}^{-1}$. O MIP de alta porosidade também apresentou resultados satisfatórios nos ensaios de seletividade, com retenção sempre superior para tetraciclina frente a outros fármacos. Foram avaliados diferentes tipos de amostras fortificadas com tetraciclina, e nelas o MIP apresentou recuperação na faixa de 74 – 96%; com faixa linear de trabalho de $4,5 - 155 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de 4 e $13 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Devido aos bons resultados, o MIP de alta porosidade foi aplicado como fase de reconhecimento em um dos sistemas de fluxo lateral. Nesse sistema a resposta visual indicativa da presença do analito, após ligado ao MIP, baseou-se em uma reação de complexação entre a tetraciclina e o cátion Fe^{3+} , formando um composto de coordenação de coloração amarelo escuro. Esse sistema também foi quantificado por meio do tratamento de imagens obtidas das tiras de fluxo lateral usando um smartphone. Depois de otimizados todos os parâmetros, a identificação qualitativa foi obtida em 10 minutos de corrida do teste. A eficiência dos testes foi avaliada na aplicação de amostras fortificadas com o analito e por meio dos ensaios quantitativos obteve-se valores de recuperação na faixa de 73 – 104%; com faixa linear de trabalho de $45 - 180 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação na ordem de 17 e $45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Outro teste rápido para identificação de tetraciclina foi construído utilizando aptâmeros como biomoléculas de reconhecimento seletivo. A resposta colorimétrica desse sistema baseou-se na aplicação de nanopartículas de ouro modificadas com os aptâmeros. A modificação das nanopartículas com o aptâmero de ligação à tetraciclina foi realizada com sucesso por meio da interação entre ouro e aptâmero marcado com grupo tiol. Os ensaios preliminares para construção da linha de teste (nanopartículas de SiO_2 modificadas com tetraciclina) e linha de controle (fita de aptâmero complementar ao de ligação) mostraram que o sistema é viável, necessitando de mais ensaios de otimização. Portanto, os MIPs e os sistemas de fluxo lateral desenvolvidos se mostraram bem-sucedidos na identificação e quantificação da tetraciclina.

Palavras-chave: Tetraciclina. Polímeros Molecularmente Impressos. Fluxo Lateral. Aptâmeros.

ABSTRACT

Emerging pollutants are a class of compounds released into the environment that cause pollution in terrestrial, aquatic and atmospheric environment; also, they can be found in food and water for human consumption. Drugs, especially antibiotics, are among the most found in the environment. Tetracycline belongs to a class of antibiotics widely applied in human and veterinary use due to its broad spectrum of action and, therefore, residues of this antibiotic are easily found in soil, water and food. Since continued exposure to drugs can be harmful to human health, rapid and selective methods to detect them are essential. Lateral flow tests were developed to determine tetracycline: in one of the tests molecularly imprinted polymers (MIP) were used and in the other system were applied aptamers, both components as a selective recognition phase. Initially, three different types of MIP were synthesized: traditional, core-shell and hollow (with high porosity). All materials were characterized by techniques such as scanning electron microscopy and infrared spectroscopy. After optimizing the analysis conditions, hollow MIP presented superior results for the identification of tetracycline: maximum binding capacity of 5.6 mg g^{-1} and 0.2 L mg^{-1} affinity constant. Hollow MIP also showed good results in selectivity tests, with higher retention for tetracycline compared to other drugs. Different types of samples fortified with tetracycline were evaluated and MIP showed recovery in the range of 74 - 96%, with linear range of $4.5 - 155 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and the limits of detection and quantification of $4 \text{ e } 13 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Due to the good results, the hollow MIP was applied as a recognition phase in one of the lateral flow systems. In this system, visual response indicating the presence of the analyte, after being recognized by the MIP, was based on a complexation reaction between tetracycline and Fe^{3+} cation, forming a coordinating compound with a dark yellow colour. This system was also quantified through the treatment of lateral flow strips images obtained using a smartphone. After optimizing all the necessary parameters, qualitative identification was obtained in 10 minutes of running. The efficiency of the tests was evaluated in the application of samples fortified with the analyte and through the quantitative results was obtained recovery values in the range of 73 - 104%; with linear range of $45 - 180 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and the limits of detection and quantification of $17 \text{ e } 45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Another rapid test for tetracycline identification was structured using aptamers as selective recognition biomolecules. The colorimetric response of this system was based on the application of gold nanoparticles modified with aptamers. Nanoparticles modifications with the tetracycline-binding aptamer was successfully accomplished through the interaction between gold and aptamer thiol labelled aptamer. Preliminary tests for the construction of the test line (SiO_2 nanoparticles modified with tetracycline) and control line (complementary aptamer strand) showed that the elution and colorimetric response were viable, requiring further optimization tests. Therefore, MIPs and lateral flow tests were successful in the identification and quantification of tetracycline.

Keywords: Tetracycline. Molecularly Imprinted Polymers. Lateral Flow Assay. Aptamers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural das tetraciclinas mais utilizadas.....	28
Figura 2 – Esquema de moldagem molecular na formação do MIP resumindo as etapas de reação e componentes da síntese.....	32
Figura 3 – (a) Levantamento anual do número de publicações utilizando o conceito <i>Lateral Flow Immunoassay</i> no intervalo de 1997 até 2020. (b) Distribuição das publicações em função do tipo de documento; na qual a categoria “outros” engloba “estudo de avaliação, estudo de comparação, ensaios clínicos, estudos de validação, <i>letters</i> , avaliação de caso, estudo de observação, errata, comentários e revisão sistemática”. Levantamentos utilizando a base de dados <i>SciFinder</i> [®]	36
Figura 4 – Representação esquemática da tira de ensaio do tipo fluxo lateral com visão geral dos seus componentes e sentido do fluxo de solvente.	37
Figura 5 – Representação esquemática de funcionamento do imunoenaios não-competitivo de fluxo lateral com resposta positiva e dos componentes do teste. (a) Adição da amostra. (b) Eluição pelo sistema. (c) Resposta colorimétrica nas linhas de teste e controle.	38
Figura 6 – Resposta visual do teste de fluxo lateral de acordo com a presença do analito (teste positivo), ausência do analito (teste negativo) ou erros durante a resposta visual (teste inválido).	39
Figura 7 – Esquemas de (a) síntese das nanopartículas de SiO ₂ modificadas com grupo vinil e (b) reagentes e condições para obtenção do MIP do tipo core-shell - MIP@SiO ₂ - e posterior remoção do núcleo de sílica para obtenção do MIP de alta porosidade.	50
Figura 8 – Espectros de absorção no UV-Vis da primeira (limpeza 1) e última (limpeza 7) solução de lavagem dos polímeros convencionais MIP e NIP. <i>Inset</i> : espectro de absorção no UV-Vis de solução padrão de tetraciclina 10,0 mg L ⁻¹	54
Figura 9 – Soluções padrão para verificação da dissolução das NP: solução inicial de 100,0 mg de SiO ₂ NP dispersas em NaOH 2,0 mol L ⁻¹ e solução final após banho ultrassônico e agitação.	56
Figura 10 – Imagens de MEV-FEG das nanopartículas de SiO ₂	57
Figura 11 – Imagens de MEV-FEG par os diferentes MIPs sintetizados e seus respectivos controles.	58

Figura 12 – Espectros de EDS para verificação e comparação dos elementos químicos presentes em todos os materiais sintetizados.....	59
Figura 13 – Espectros na região do IV com designação das principais bandas para comparação entre as nanopartículas de sílica (SiO_2) e modificadas com grupo vinil ($\text{SiO}_2\text{-CH=CH}_2$). <i>Inset</i> : ampliação da região selecionada com atribuição das bandas das $\text{SiO}_2\text{-CH=CH}_2$ NP.	60
Figura 14 – Espectros na região do IV com designação das principais bandas para comparação entre as nanopartículas de sílica (SiO_2) e os diferentes polímeros impressos.	62
Figura 15 – (a) Avaliação da eluição de tetraciclina ($100,0 \text{ mg L}^{-1}$) em diferentes proporções (v/v) de fase móvel composta por H_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: ACN; (b) curva analítica obtida após método otimizado para análise de solução padrão de tetraciclina $2,0 - 70,0 \text{ mg L}^{-1}$ solubilizada em acetonitrila.....	63
Figura 16 – Avaliação concomitante da dosagem de massa dos polímeros (5,0 até $30,0 \text{ mg}$) e do tipo de solvente para análise da tetraciclina ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$).	65
Figura 17 – Avaliação concomitante da dosagem de massa dos polímeros (5,0 até $30,0 \text{ mg}$) e do solvente acetonitrila (pura e em misturas com água ultrapura) para análise da tetraciclina ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$).	66
Figura 18 – Dosagem de massa de MIP e NIP no intervalo de 5,0 até $30,0 \text{ mg}$ em contato com tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$ solubilizada em acetonitrila).	67
Figura 19 – Estudo de adsorção em função do tempo de equilíbrio entre os diferentes polímeros (massa de $5,0 \text{ mg}$). e tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$ em acetonitrila); com intervalo de tempo de 10 min até 240 min.	68
Figura 20 – Cinética de adsorção do MIP de alta porosidade pela tetraciclina segundo os modelos de (a) Weber-Morris e (b) Boyd.....	71
Figura 21 – Estudo cinético do tempo de equilíbrio entre os diferentes polímeros e seus respectivos controles (massa de $5,0 \text{ mg}$). e tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$ em acetonitrila); com intervalo de tempo de 10 min até 240 min.....	73
Figura 22 – Avaliação concomitante da dosagem de massa dos polímeros (5,0 até $25,0 \text{ mg}$) e dos solventes (metanol, etanol e acetonitrila) para análise da tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$).	75
Figura 23 – Isotherma de adsorção para tetraciclina (de $1,0$ até $90,0 \text{ mg L}^{-1}$ em acetonitrila) em contato com os polímeros ($5,0 \text{ mg}$) com tempo de interação de 90 minutos.	77

Figura 24 – Fórmula estrutural das moléculas utilizadas no ensaio de seletividade e interferência.	79
Figura 25 – Ensaio de seletividade para o MIP convencional e MIP de alta porosidade. Em separado, soluções de cada analito (5,0 mg L ⁻¹ preparadas em ACN) foram colocadas em contato por 90 min com 5,0 mg dos polímeros.	80
Figura 26 – Ensaio competitivo (interferência) para o MIP convencional e MIP de alta porosidade. Soluções contendo tetraciclina mais interferente (ambos na concentração final de 5,0 mg L ⁻¹ preparadas em ACN) foram colocadas em contato por 90 min com 5,0 mg dos polímeros.	82
Figura 27 – Procedimento experimental no sistema de fluxo lateral utilizando reação de complexação entre tetraciclina e FeCl ₃ . (a) Inicialmente MIP e solução de FeCl ₃ são depositados na tira de fluxo lateral. (b) Posteriormente adiciona-se solução de tetraciclina, a qual elui pela tira e que, (c) em contato com o metal forma o composto de coordenação colorido que fica retido na linha teste de MIP.	96
Figura 28 – Sistema de quantificação das tiras de fluxo lateral, cuja parte superior comporta o smartphone e os LEDs para iluminação alimentados por fonte de tensão de 12 V e parte inferior para suporte da tira de fluxo lateral. A imagem é obtida utilizando o aplicativo <i>OpenCamera</i> e, por meio do software <i>ImageJ</i> a imagem é tratada selecionando a cor de maior intensidade do canal RGB, cuja intensidade de área colorida é convertida no sinal analítico de absorbância.	99
Figura 29 – Representação esquemática dos componentes do ensaio no formato competitivo. O conjugado Au-APT NP foi depositado na tira conjugada. A linha de teste foi composta por nanopartículas de sílica contendo tetraciclina imobilizada em sua superfície. A linha de controle foi composta pelo aptâmero complementar ao aptâmero imobilizado nas Au NPs da tira conjugada.	106
Figura 30 – Imagens de microscopia confocal exibindo a ligação da tetraciclina nos polímeros depositados na membrana de nitrocelulose. Condições de análise: eluição de tetraciclina 25,0 mg L ⁻¹ com solução tampão HEPES 0,05 mol L ⁻¹ a pH 7,4. para as membranas com os polímeros impresso e não-impresso. Branco: eluição somente da solução tampão.	108
Figura 31 – Imagens de microscopia confocal de tiras de fluxo lateral após eluição de concentrações de tetraciclina (a) 10 mg L ⁻¹ ; (b) 25 mg L ⁻¹ e (c) 90 mg L ⁻¹ para linha de teste contendo MIP de alta porosidade.	109

Figura 32 – Ensaio qualitativo exibindo a formação do complexo entre tetraciclina e Fe^{3+} . Mantendo-se o volume de tetraciclina ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) constante, gotas de FeCl_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionadas. Da esquerda para a direita, ausência de reação (sem mudança), complexo formado (coloração amarela) e excesso de reagentes (alta intensidade de precipitação).	110
Figura 33 – Absorbância do complexo formado em função de diferentes proporções de tetraciclina e Fe^{3+} (representadas como fração molar da tetraciclina) para determinação da estequiometria da reação.	111
Figura 34 – Representação esquemática da reação de complexação, com destaque na fórmula estrutural da tetraciclina para os sítios mais prováveis de interação com o Fe^{3+}	112
Figura 35 – Estudo cinético (de 15 s até 20 min) da reação de complexação entre tetraciclina e Fe^{3+} . Mistura preparada em água ultrapura na proporção 1 tetraciclina : 1 Fe^{3+} (v/v).	113
Figura 36 – Eluição de tetraciclina ($0,22 \text{ mol L}^{-1}$ em água) utilizando solução tampão de corrida na tira de fluxo lateral contendo MIP e NIP de alta porosidade depositados e posterior reação colorimétrica com FeCl_3 ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em água). O branco consiste em MIP depositado na membrana após a eluição de todos os reagentes exceto o analito.	114
Figura 37 – Intensidade do sinal colorimétrico em função da intensidade de iluminação (8 – 14 V) e do tempo de obtenção da imagem após o início da reação (10 – 120 min). Eluição de FeCl_3 0,6% (m/v) e tetraciclina $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	115
Figura 38 – Avaliação da seletividade da reação colorimétrica frente à um MIP para tetraciclina e para outro analito (MIP para biotina) - 0,05 mg de MIP depositado - e comparação simultânea entre os diferentes tipos de tetraciclina. Condições: eluição de tetraciclina ($5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e reação colorimétrica com FeCl_3 0,6% (m/v).	117
Figura 39 – Avaliação do efeito da composição da solução de corrida no sinal colorimétrico comparando água ou diferentes soluções tampão. (a) Identificação qualitativa e (b) Quantificação das respostas colorimétricas. Todas as soluções tampão na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4. Eluição de tetraciclina ($5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e FeCl_3 0,6 % (m/v).	118

Figura 40 – Bloqueio da membrana de nitrocelulose utilizando diferentes proporções de BSA e PEG. Eluição com solução tampão de corrida HEPES, tetraciclina $5,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e FeCl ₃ 0,6 % (m/v).	119
Figura 41 – Avaliação do efeito da concentração e da quantidade de eluições de FeCl ₃ no sinal colorimétrico da reação de complexação. Eluição de tetraciclina 0,22 mol L ⁻¹ com solução tampão HEPES 0,1 mol L ⁻¹ a pH 7,4. O volume de FeCl ₃ para cada eluição de 10,0 µL.....	120
Figura 42 – Avaliação do efeito da concentração da solução tampão HEPES a pH 7,4 na intensidade do sinal colorimétrico nas membranas 120 HP e 170 HP. Tetraciclina $5,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e suspensão de polímeros depositados 5,0 mg mL ⁻¹	121
Figura 43 – Avaliação dos polímeros biomiméticos sintetizados: tradicional (MIP), core-shell contendo núcleo de sílica (MIP@Sílica) e de alta porosidade (MIP P); e os respectivos controles (NIP). 120 HP corresponde à membrana de fluxo mais rápido e 170 HP à membrana de fluxo mais lento. Condições de eluição: tetraciclina $5,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e FeCl ₃ 0,05% (m/v).	122
Figura 44 – Resposta colorimétrica para eluição de tetraciclina ($5,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹) nas tiras de fluxo lateral contendo diferentes concentrações (0,75 – 5,0 mg mL ⁻¹) de MIP de alta porosidade depositado. Eluente: solução tampão HEPES 0,05 mol L ⁻¹ a pH 7,4.	124
Figura 45 – (a) Avaliação do modo de deposição do ferrocianeto livre e na forma de complexo com o Fe ³⁺ , tanto na presença quanto na ausência de BSA. (b) Construção da linha de controle pela deposição do complexo azul da prússia+BSA, seguida pela limpeza para remover o excesso de reagentes e a eluição de Fe ³⁺ que exhibe o retorno da coloração azul da linha de controle.	125
Figura 46 – Avaliação do sistema de fluxo lateral contendo as linhas de teste (MIP de alta porosidade) e controle (ferrocianeto de potássio). Eluente: solução tampão HEPES 0,05 mol L ⁻¹ a pH 7,4 , FeCl ₃ 0,05 % (m/v) e no teste positivo adição de tetraciclina 20,0 mg L ⁻¹	126
Figura 47 – (a) Resposta visual das membranas de fluxo lateral contendo MIP após eluição de diferentes concentrações de tetraciclina. (b) Curva analítica com região linear de 20 – 80 mg L ⁻¹ para o sistema de fluxo lateral otimizado contendo MIP depositado. Medidas realizadas em triplicata.	127

Figura 48 – Região linear da curva analítica (30 – 60 mg L ⁻¹) para o sistema de fluxo lateral otimizado contendo NIP depositado. Medidas realizadas em triplicata.	128
Figura 49 – Ensaio de seletividade para o sistema de fluxo lateral contendo MIP e NIP de alta porosidade depositados. Condições de eluição: tetraciclina, minociclina e doxiciclina na concentração de 50,0 mg L ⁻¹ ; FeCl ₃ 0,5% (m/v) e solução tampão HEPES 0,05 mol L ⁻¹ a pH 7,4. Medidas em triplicata.	129
Figura 50 – Ensaio de interferência no fluxo lateral contendo MIP e NIP de alta porosidade depositados. Todas as quantificações para os interferentes correspondem ao sinal gerado pela tetraciclina na mistura. Todos os analitos na concentração de 50,0 mg L ⁻¹ ; FeCl ₃ 0,05% (m/v) e solução tampão HEPES 0,05 mol L ⁻¹ a pH 7,4 como eluente. Medidas em triplicata.	130
Figura 51 – Representação esquemática dos formatos de teste tipo sanduíche (não-competitivo) e competitivo nos testes de fluxo lateral contendo aptâmeros como fase de reconhecimento, além das tabelas de correlação do sinal colorimétrico (X: sem resposta colorimétrica, ✓: resposta colorimétrica) em função da presença ou ausência do analito na amostra. Au NP: nanopartícula de ouro; APT 1 ^o : aptâmero de ligação primário; APT 2 ^o : aptâmero de ligação secundário; c-APT: aptâmero complementar.	133
Figura 52 – Espectro de absorção no UV-Vis para as Au NP ressuspensas em água.	135
Figura 53 – Imagens de (a) MEV-FEG e (b) MET para as Au-NP sintetizadas.	136
Figura 54 – Aplicação de diferentes proporções de mercaptosilano como linha de controle para o sistema de marcação utilizando Au NP, em (a) deposições mais diluídas e (b) deposições concentradas.	137
Figura 55 – Espectros de absorção na região do visível para as três sínteses de Au NP em diferentes tamanhos.	138
Figura 56 – Avaliação da eluição de Au NP em dois tamanhos diferentes em tiras de fluxo lateral contendo ou mercaptosilano (20% v/v) ou ácido tioglicólico (40% v/v) imobilizados. Todas as soluções tampão corrida avaliadas como eluentes foram compostas por 0,1 mol L ⁻¹ do respectivo sal, a pH 7,4 e contendo 0,05% (v/v) de Tween 20.	139
Figura 57 – Construção da linha de teste (1 deposição de 1,0 µL) contendo tetraciclina ou tetraciclina hidrocloreto (60 mg mL ⁻¹) preparada em diferentes solventes (água	

ultrapura e solução tampão TRIS e HEPES; ambas 0,01 mol L ⁻¹ a pH 7,4). Sinal colorimétrico obtido pela eluição de 10,0 µL de FeCl ₃ 0,05 % (m/v).....	140
Figura 58 – Verificação do funcionamento das linhas de (a) controle: mercaptosilano (20% v/v), (b) teste: tetraciclina 15 mg mL ⁻¹ e (c) linhas teste e controle em simultâneo.	141
Figura 59 – Eluição de Au-APT-STA NP sendo a (a) teste: tetraciclina 15 mg mL ⁻¹ e (b) controle: biotina-HRP 2,5 mg mL ⁻¹ . (c) Eluição de Au-STA NP em linha de controle biotina-HRP 2,5 mg mL ⁻¹	142
Figura 60 – Verificação da atividade seletiva dos aptâmeros (APT) quando colocados em contato com tetraciclina (TET), com monitoramento indireto por meio da banda de absorção na região do UV-Vis em 500 nm do corante laranja de tiazol (LT). Nas misturas foram variadas as concentrações de TET (1,30 e 90 µg mL ⁻¹); mantendo-se constante as concentrações de LT e APT em 4,0 µmol L ⁻¹ e 0,10 µmol L ⁻¹ , respectivamente.....	143
Figura 61 – Espectros de absorção na região do UV-Vis para as nanopartículas sem modificação (Au NP), modificadas com APT por adsorção (Au-APT NP) e modificadas com APT por interação química (Au-SH-APT NP).	144
Figura 62 – Voltamogramas cíclicos obtidos para nanopartículas de ouro (Au NP) e nanopartículas modificadas com APT por interação com grupo tiol (Au-SH-APT NP) depositadas em eletrodo de carbono vítreo (GCE). Eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência: Ag AgCl KCl _(sat) ; medidas realizadas em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1×10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; v: 100 mV s ⁻¹	145
Figura 63 – Eluição das nanopartículas sem modificação (Au NP), modificadas com APT por adsorção (Au-APT NP) e modificadas com APT por interação química (Au-SH-APT NP). Na membrana de nitrocelulose linha de controle mercaptosilano 20% (v/v) e solução tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ a pH 7,4 contendo 0,05% de Tween como eluente.	146
Figura 64 – Espectros na região do IV com designação das principais bandas para comparação entre as nanopartículas de sílica (SiO ₂) e modificadas com grupo amina (NH ₂ -SiO ₂), com tetraciclina adsorvida (NH ₂ -SiO ₂ -tet _{ads}) e tetraciclina ligada (NH ₂ -SiO ₂ -tet _{ligada}). <i>Inset</i> : ampliação da região acima de 1400 cm ⁻¹ com atribuição das principais bandas.	147
Figura 65 – Verificação colorimétrica da imobilização da tetraciclina na superfície das nanopartículas de sílica modificadas com grupo amino (NH ₂ -SiO ₂) e NP contendo	

tetraciclina adsorvida, utilizando Fe^{3+} como agente complexante. Volume de suspensão depositada: 2,0 μL ; volume de FeCl_3 0,5% (m/v) adicionado: 10,0 μL ; eluente: solução tampão HEPES 0,1 mol L^{-1} a pH 7,4.	148
Figura 66 – Eluição das Au-APT NP em membranas de nitrocelulose comparando o sinal gerado em linhas de teste composta pelas nanopartículas sem modificação ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$) e com tetraciclina adsorvida na superfície ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ NP). Branco: eluição de Au NP; volume de suspensão depositada: 2,0 μL ; eluente: solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7,4 contendo Tween 0,05% (v/v).....	149
Figura 67 – Sinal colorimétrico obtido no ensaio competitivo em tiras de fluxo lateral sem a adição do analito (negativo) e com adição de tetraciclina (positivo) para a linha de teste ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ NP). Volume de suspensão depositada: 2,0 μL ; eluente: solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7,4 contendo Tween 0,05% (v/v); volume solução de tetraciclina 50 mg L^{-1} adicionada: 40,0 μL	150
Figura 68 – Tiras de fluxo lateral contendo c-APT (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) como linha de controle antes da eluição (tira superior) e depois da eluição (tira inferior) das Au-APT NP imobilizadas na tira conjugada. Testes do tipo negativo e eluente solução tampão TRIS 50 mmol L^{-1} a pH 7,4 contendo MgCl_2 50 mmol L^{-1} e Tween 0,5 % (v/v).....	152
Figura 69 – (a) Avaliação da concentração de c-APT depositado como linha de controle, no intervalo de 25 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Sinal colorimétrico obtido no ensaio competitivo sem a adição do analito (negativo) e com adição de tetraciclina (positivo) para a linha de controle (c-APT 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eluente: solução tampão TRIS 50 mmol L^{-1} a pH 7,4 contendo MgCl_2 50 mmol L^{-1} e Tween 0,5 % (v/v). Volume solução de tetraciclina 50 mg L^{-1} adicionada: 40,0 μL	152
Figura 70 – Representação esquemática da cavidade seletiva do MIP, com exibição da interação mais provável entre tetraciclina e ácido acrílico. A região sombreada de laranja abrange os possíveis sítios de coordenação entre analito e Fe^{3+}	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos e respectivas funções desempenhadas por nanopartículas utilizadas como núcleo no desenvolvimento de MIP <i>core-shell</i>	44
Tabela 2 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 13 para as NP de SiO ₂	60
Tabela 3 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 13 para as NP de SiO ₂ -CH=CH ₂	61
Tabela 4 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 14 referentes aos polímeros impressos.	62
Tabela 5 – Parâmetros dos modelos cinéticos da ligação da tetraciclina nos MIPs avaliados.	69
Tabela 6 – Parâmetros das isotermas de adsorção dos MIPs para tetraciclina (ajuste até 60,0 mg L ⁻¹).	77
Tabela 7 – Parâmetros de seletividade dos diferentes polímeros (tradicional e de alta porosidade) para a tetraciclina em comparação com cada um dos interferentes avaliados.	84
Tabela 8 – Valores de recuperação relativa (n=3) da tetraciclina em diferentes tipos de amostra pelos polímeros (MIP e NIP) de alta porosidade.	86
Tabela 9 – Métodos de detecção para sistemas de fluxo lateral. Os métodos são categorizados de acordo com o modo de detecção, os quais podem atuar com diferentes tipos de marcadores e materiais de reconhecimento.	91
Tabela 10 – Descrição de cada componente e seu respectivo parâmetro analisado na construção das tiras de fluxo lateral; sendo descritas nas condições as composições, quantidades e concentrações.	98
Tabela 11 – Descrição de cada componente e seu respectivo parâmetro analisado na eluição das Au NP, sendo descritas nas condições as composições, quantidades e concentrações avaliadas.	103
Tabela 12 – Soluções tampão corrida avaliadas para hibridização entre as fitas de APT e c-APT.	107
Tabela 13 – Valores de recuperação relativa (n=3) da tetraciclina em diferentes tipos de amostra aplicadas nas tiras de fluxo lateral.	132
Tabela 14 – Tamanho e concentração das três sínteses realizadas para obtenção das Au NPs.	138

Tabela 15 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 64 para as nanopartículas de SiO ₂ e as respectivas modificações.....	148
Tabela 16 – Resumo das figuras de mérito obtidas para as duas aplicações dadas ao MIP de alta porosidade.	156

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: acetonitrila

APT: aptâmero

Au-APT NP: nanopartícula de ouro recoberta com aptâmero

Au-APT-STA NP: nanopartícula de ouro recoberta com estreptavidina e aptâmero

Au NP: nanopartículas de ouro

Au-STA NP: nanopartícula de ouro recoberta com estreptavidina

b-APT: aptâmero marcado com biotina

c-APT: fita de aptâmero complementar

BSA: albumina de soro bovino

DNA: ácido desoxirribonucleico

EGDMA: etilenoglicol dimetacrilato

FTIR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HRP: *Horseradish peroxidase*

LT: laranja de tiazol

MEV-FEG: microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MIP: polímeros molecularmente impressos

MIP@SiO₂: polímero molecularmente impresso com núcleo de sílica

NIP: polímeros não-impressos

NIP@SiO₂: polímero não-impresso com núcleo de sílica

NP: nanopartícula

SH-APT: aptâmero marcado com tiol

SiO₂ NP: nanopartícula de sílica

STA: estreptavidina

TEOS: tetraetil ortossilicato

TET: tetraciclina

TET-HCl: tetraciclina hidrocloreada

ν : estiramento (vibração)

δ : dobramento (vibração)

λ : comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Tetraciclinas	28
1.2 Polímeros molecularmente impressos	31
1.3 Testes de fluxo lateral.....	34
2 OBJETIVOS	42
3 CAPÍTULO I	43
3.1 Introdução	43
3.2 Objetivos	47
3.3 Materiais e métodos	47
3.3.1 Reagentes e soluções.....	47
3.3.2 Instrumentação	48
3.3.3 Síntese dos MIPs e das nanopartículas de sílica (SiO ₂ NP).....	49
3.3.4 Otimização das condições cromatográficas	50
3.3.5 Validação analítica	51
3.3.6 Estudos de otimização e avaliação da eficiência dos polímeros.....	51
3.3.7 Preparo das amostras	52
3.3.8 Aplicação em amostra.....	53
3.4 Resultados e discussão.....	53
3.4.1 Sínteses dos polímeros propostos	53
3.4.2 Caracterização dos polímeros.....	56
3.4.3 Otimização das condições cromatográficas	63
3.4.4 Avaliação da eficiência e otimização dos diferentes MIPs.....	64
3.4.5 Seletividade e interferência	79
3.4.6 Aplicação dos MIPs em amostras	85
3.5 Considerações finais	87
4 CAPÍTULO II	89

4.1 Introdução	89
4.2 Objetivos	92
4.3 Materiais e métodos	92
4.3.1 Reagentes e soluções.....	92
4.3.2 Instrumentação	93
4.3.3 Desenvolvimento dos sistemas de fluxo lateral contendo MIP como fase de reconhecimento seletivo	94
4.3.4 Desenvolvimento dos sistemas de fluxo lateral contendo aptâmeros como fase de reconhecimento seletivo	101
4.4 Resultados e discussão.....	107
4.4.1 Sistema contendo MIP como material de reconhecimento seletivo	107
4.4.2 Sistema contendo aptâmero como fase de reconhecimento seletivo	133
4.5 Considerações finais	153
5 DISCUSSÃO.....	155
6 CONCLUSÕES.....	159
REFERÊNCIAS.....	160

1 INTRODUÇÃO

A ação antropogênica é responsável pela liberação de compostos químicos de várias classes que causam contaminação dos ambientes aquáticos, terrestres e da atmosfera. Devido aos efeitos ecológicos adversos e problemas de toxicidade para os seres vivos esses compostos, denominados de contaminantes ambientais, têm sido amplamente estudados. (1)

Os contaminantes são classificados em dois principais grupos: tradicionais ou emergentes. Os contaminantes tradicionais possuem toxicidade e efeitos no ambiente conhecidos, além de serem detectados por diferentes métodos analíticos disponíveis. Como alguns compostos ainda são amplamente utilizados eles apresentam grande interesse de estudo. Nessa classe estão incluídos os pesticidas modernos, metais pesados e compostos orgânicos persistentes (dioxinas, bifenilas policloradas – BPC, entre outros). (1,2)

Os contaminantes emergentes vêm sendo estudados somente nos últimos vinte anos e, embora denominados de “emergentes”, já estão presentes no ambiente por muitos anos ou décadas, mas não foram identificados previamente devido à ausência de metodologias analíticas e instrumentos capazes de detectar seus baixos níveis de concentração com alta sensibilidade. (1,2)

Tanto os contaminantes tradicionais quanto emergentes são identificados e quantificados quase que em supremacia por técnicas hífenadas como cromatografia (tanto líquida quanto gasosa) e espectrometria de massas com diferentes configurações. (3,4)

De acordo com o periódico científico *Emerging Contaminants*, os contaminantes emergentes são “definidos como produtos químicos que atualmente não são regulamentados (ou foram apenas recentemente) e sobre os quais existem preocupações em relação ao seu impacto na saúde humana ou ecológica”. No entanto, não há uma definição uniforme e definitiva para contaminantes emergentes, cuja interpretação é flexível e depende da perspectiva e objetivos da avaliação. (5)

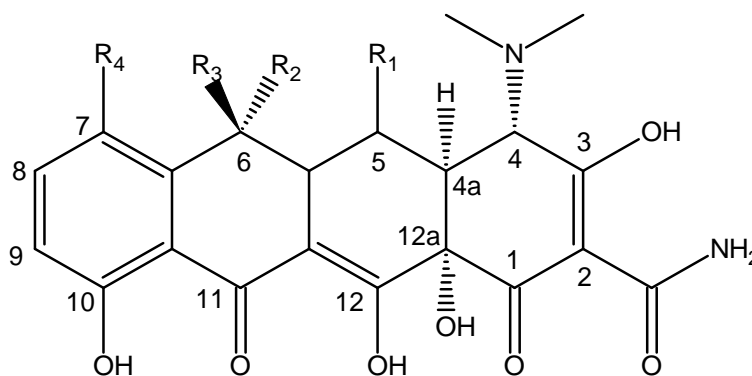
Na classe dos contaminantes emergentes são incluídos fármacos, hormônios, retardantes de chama, nanomateriais, compostos perfluorados, microplásticos, entre outros. Dentre esses, os fármacos são amplamente pesquisados devido à importância que apresentam na manutenção da saúde do ser humano e, ao mesmo tempo, os efeitos adversos causados pela sua presença no meio ambiente. Estão inclusos nesse

grupo os antibióticos, analgésicos, β -bloqueadores, entre outros tipos. (6) Os antibióticos e seus metabólitos estão entre os compostos mais encontrados no solo e água, tornando-se imprescindível seu monitoramento. (7)

1.1 Tetraciclinas

As tetraciclinas fazem parte de um grupo de antibióticos de amplo espectro, atuando contra bactérias gram-positivas e gram-negativas; por meio da inibição da síntese proteica ao se ligar na subunidade 30S dos ribossomos bacterianos. As tetraciclinas são utilizadas clinicamente no tratamento de infecções respiratórias, urogenitais e gastrointestinais. Além do uso em humanos, tetraciclinas são muito utilizadas na terapia animal para tratar e prevenir infecções e na pecuária como aditivo para promover o crescimento e ganho de peso do animal. (8,9)

A atividade antimicrobiana das tetraciclinas está relacionada com a sua estrutura básica, que possui um sistema linear naftaceno com grupos funcionais em comum e outros que variam em posições específicas; conforme exibido pela Figura 1.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tetraciclina	H	CH ₃	OH	H
Minociclina	H	H	H	N(CH ₃) ₂
Doxiciclina	OH	CH ₃	H	H
Clortetraciclina	H	CH ₃	OH	Cl
Oxitetraciclina	OH	CH ₃	H	H

Figura 1 – Fórmula estrutural das tetraciclinas mais utilizadas.

Fonte: autor do trabalho.

Considerando diferentes partes da estrutura e mantendo o núcleo tetracíclico, a presença da amida em C2 e a configuração absoluta em C4, a influência dos

substituintes nas posições C5 a C9, a conservação do sistema cetona-enólica (posições C11, C12 e C12a) e a configuração a nas posições 4a e 12a são essenciais para a manutenção da atividade farmacológica das tetraciclinas. (8,10)

As estruturas das tetraciclinas contêm muitos sítios de ligação em seus grupos nucleofílicos ricos em elétrons e elas podem formar complexos com metais (com diferentes estequiometrias de metal e ligante) e em diferentes estados de protonação, ocorrendo estabilização da alta densidade de elétrons das tetraciclinas. Com isso, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das tetraciclinas podem sofrer mudanças significativas. (11,12)

A tetraciclina, minociclina e doxiciclina são as mais aplicadas no tratamento para infecções em humanos, (8) enquanto que tetraciclina, doxiciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina no tratamento de animais. (13)

Apenas uma pequena fração das tetraciclinas é metabolizada ou absorvida pelo corpo, enquanto 75% das tetraciclinas são excretadas pelo corpo em sua forma ativa. (14) Assim, elas são encontradas abundantemente em análises no solo e em águas residuárias, além das águas de rios ou para consumo humano; em concentrações nas ordens de mg L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. (7,15,16)

No Brasil, a legislação que estabelece os limites de resíduos máximos para presença da tetraciclina em diferentes tipos de alimentos é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. (17) Por outro lado, para o monitoramento da tetraciclina em águas para consumo e efluentes, tanto no Brasil quanto no mundo não há legislação vigente que estabeleça um limite máximo permitido. (18,19)

A exposição sem controle a tetraciclina pode causar efeitos danosos à saúde humana, como toxicidade aos órgãos e perda de cabelo. Além do mais, o uso sem controle do medicamento pode levar ao aumento da resistência bacteriana e, conseqüentemente, a diminuição da eficiência no tratamento de infecções. (20)

Por conseguinte, frente a necessidade de um monitoramento rigoroso desse medicamento, diferentes estratégias estão sendo exploradas para um monitoramento fácil, rápido, sensível e seletivo desse antibiótico.

Tasci e colaboradores (21) avaliaram a presença de tetraciclina e seus metabólitos, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas, em diferentes tipos de amostras de leite. A faixa de recuperação dos analitos variou entre 73,3% – 87,7%, com limite de detecção no

intervalo de 0,68 – 3,16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e limite de quantificação entre 2,24 – 10,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os pesquisadores encontraram em 6 amostras de leite cru de cabra e 6 amostras de leite cru de vaca a presença de tetraciclina acima dos limites residuais máximos permitidos pela legislação.

Um sensor eletroquímico para detecção de tetraciclina em amostras de água foi desenvolvido por Song e colaboradores. (22) O sensor foi construído baseado em material tipo *Metal-Organic Frameworks* (MOFs) de Fe depositado em nanofibras de carbono. Nessas nanofibras depositou-se nanopartículas de ouro recobertas com aptâmero de ligação à tetraciclina. Os MOFs aumentaram a resposta eletroquímica do sistema, além de incrementarem a estabilidade das nanofibras de carbono em meio ácido e básico. O sensor apresentou faixa linear de trabalho no intervalo de $1,0 \times 10^{-10}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e seletividade frente à antibióticos de outras classes (o sensor não foi avaliado para outros tipos de tetraciclina). Ao ser aplicado em amostras de água de torneira e de lago, a faixa de recuperação para o analito foi de 89,7 – 102,8%.

Yue e colaboradores (23) avaliaram os efeitos do biocarvão para remoção da tetraciclina do solo. Cinco tipos de biocarvão derivados de esterco de vaca e quatro tipos derivados de vegetais foram adicionados em solos contaminados com uma mistura de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina por 60 dias. Os resultados obtidos mostraram que os biocarvões, especialmente os derivados do esterco de vaca, podem remover os antibióticos do solo (a uma taxa aproximadamente 10% superior quando comparada com o controle). Ao avaliarem o mecanismo de ação, os pesquisadores concluíram que o aumento da taxa de remoção dos antibióticos após a adição de biocarvão foi devido ao aumento da acessibilidade para microorganismos degradantes por meio da elevação da condutividade elétrica. Mais ainda, as atividades microbianas foram estimuladas por meio do aumento da suplementação de C e N.

Ehtesabi e colaboradores (24) desenvolveram um material adsorvente para tetraciclina baseado em pontos quânticos de carbono recobertos com alginato de sódio. Quando adsorvida no material a tetraciclina suprimiu a fluorescência dos pontos de carbono, sendo a quantificação do analito realizada por meio de imagens da solução contendo a mistura do material e da tetraciclina obtidas com a câmera de um celular. O material foi caracterizado e o processo de adsorção que apresentou melhor ajuste (maior valor de R²) foi o modelo cinético de pseudo-segunda ordem. A faixa linear de trabalho foi compreendida entre 1 – 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Além das técnicas de detecção, as fases de reconhecimento também são exploradas para tornar a identificação dos analitos o mais seletiva possível. Ademais os materiais biológicos como anticorpos, enzimas e ácidos nucleicos, atualmente diferentes tipos de materiais poliméricos inteligentes (que são responsivos à estímulos específicos) e seletivos têm sido desenvolvidos para serem aplicados como fase de reconhecimento. (25)

1.2 Polímeros molecularmente impressos

Os polímeros molecularmente impressos (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers* – MIP) são uma das classes de polímeros com reconhecida aplicação na identificação e pré-concentração de diferentes tipos de moléculas com alta seletividade. (26) O desempenho seletivo dos MIPs é atribuído à sua estrutura tridimensional e composição química: eles realizam o reconhecimento específico por formarem cavidades que são química e fisicamente complementares em relação aos grupos funcionais, tamanho e forma do analito. (27)

Os MIPs também são denominados de polímeros biomiméticos por imitarem o sistema de reconhecimento biológico baseado em afinidade, como por exemplo o sistema antígeno/anticorpo. Entretanto, os polímeros apresentam vantagens se comparados com os materiais biológicos: baixo custo, fácil preparação, alta resistência mecânica e térmica e podem ser armazenados por anos sem perda de eficiência. (26–28)

O processo de moldagem molecular, desde a interação entre o analito e monômero funcional até a formação da cavidade seletiva, está esquematizado na Figura 2.

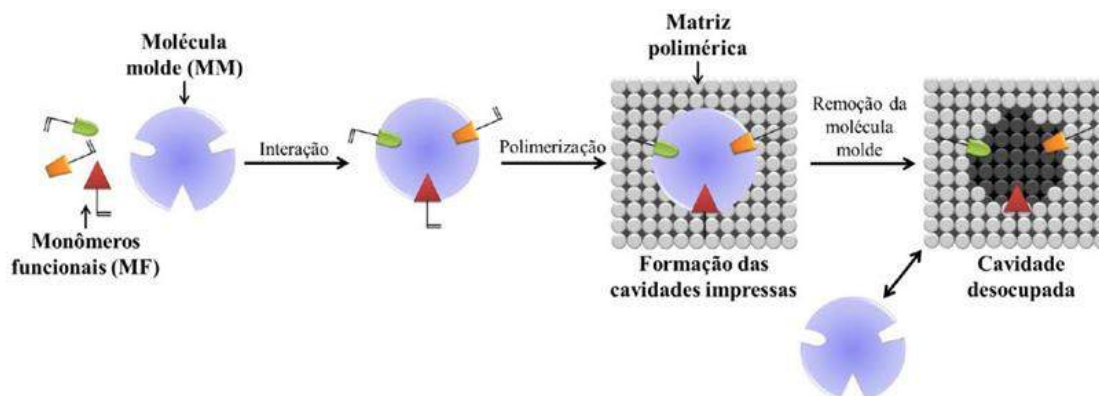


Figura 2 – Esquema de moldagem molecular na formação do MIP resumindo as etapas de reação e componentes da síntese.

Fonte: PUPIN *et al* (28).

Como exibido na Figura 2, por meio da interação do analito com as moléculas do monômero funcional, seja por ligação covalente ou interações químicas, é formado inicialmente o complexo analito-monômero funcional. Em sequência, adiciona-se no meio reacional um monômero estrutural que promove ligações cruzadas que formará uma matriz polimérica rígida contendo a cavidade impressa. Por fim, é acrescentado um iniciador radicalar para dar início à reação de polimerização. Após a formação do polímero, as cavidades impressas são liberadas pelo processo de remoção do analito por extração com solventes. (28,29)

De modo análogo ao MIP 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. Deste modo, por meio do NIP, é possível monitorar a especificidade e/ou inespecificidade das ligações químicas entre polímeros e analitos.

O processo de obtenção dos MIP se dá, em geral, por polimerização radicalar, sendo a mesma realizada em sistema com ausência de oxigênio, uma vez que o O_2 impede a reação de polimerização por consumir os radicais livres formados. A reação é iniciada com aquecimento ou radiação UV, os quais induzem a quebra do iniciador formando radicais. Diferentes metodologias são aplicadas para síntese dos polímeros: polimerização por radicais livres, polimerização por radicais controlados e por radicais vivos. (30)

Na polimerização por radicais livres (que inclui os métodos clássicos de síntese como “bulk” e precipitação) não há controle do tamanho das partículas formadas; no entanto, o método possui instrumentação simples e é realizado sob condições

brandas (de pressão e temperatura, por exemplo). A polimerização por radicais vivos ou controlados (como a polimerização radicalar por transferência de átomo ou a polimerização por transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação) permite controlar o tamanho das partículas poliméricas, contudo, exige instrumentação específica. (30)

A polimerização em “bulk” consiste em adicionar todos os reagentes ao mesmo tempo no frasco (um sistema de preparo homogêneo) e, embora a mais simples, apresenta algumas desvantagens como impressão irregular dos sítios de reconhecimento e tamanho não-uniformes de partículas. Devido a estas limitações, outros métodos de preparo dos MIP, como a precipitação, são utilizados com o intuito de produzir partículas com tamanhos uniformes. (30)

A polimerização por precipitação é utilizada devido à sua simplicidade e pela obtenção de partículas mais homogêneas. Nesse método volumes superiores de solventes (cerca de 5 vezes maiores quando comparado com o método em “bulk”) são empregados a fim de impedir a formação de uma pasta polimérica. A formação das partículas poliméricas a partir do método de polimerização por precipitação ocorre devido ao crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação, a qual se torna menos solúvel no meio devido ao seu tamanho e acaba precipitando. (30)

A organização tridimensional dos grupos funcionais dos MIP é obtida por meio do estabelecimento de uma ligação covalente ou interações químicas (ligação de hidrogênio, interação iônica, etc.) entre os monômeros funcionais e a molécula-molde durante o processo de polimerização. A formação do complexo analito-monômero com a melhor complementaridade entre os grupos funcionais das moléculas é essencial no processo de moldagem das cavidades seletivas. Cada método possui sua vantagem e desvantagem, sendo escolhido e aplicado de acordo com os grupos funcionais disponíveis no analito. (31–33)

Deste modo, os MIP vem sendo sintetizados para os mais diferentes tipos de moléculas, tais como íons, (34) corantes, (35) pesticidas (36) e antibióticos (37) até macromoléculas como proteínas. (38,39) Os MIPs também apresentam bons resultados quando aplicados em diferentes técnicas como extração em fase sólida, (40,41) cromatografia (42) e sensores. (43)

Um polímero impresso para determinação do íon Pb^{2+} (denominado de IIP – *Ion Imprinted Polymer*) foi desenvolvido por López e colaboradores. (34) A seletividade do polímero foi dada pelo rodizonato de sódio, que forma compostos de

coordenação com metais como o chumbo e avaliou-se o efeito de diferentes monômeros funcionais (escolhidos por simulação computacional). Com a avaliação dos ensaios de adsorção, o IIP que apresentou melhor eficiência foi composto por rodizonato e ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfônico; com capacidade máxima de adsorção do analito na ordem de $51,8 \text{ mg g}^{-1}$ e tempo de adsorção de 10 minutos. O polímero impresso foi aplicado em amostras de água de rio fortificadas com Pb^{2+} e a faixa de recuperação obtida foi de 97,9 – 99,2%.

Wang e colaboradores (44) desenvolveram um MIP para determinação simultânea de três classes diferentes de antibióticos: fluoroquinolonas, tetraciclinas e sulfonamidas. Para isso, uma molécula modelo de cada classe foi utilizada como template e a síntese conduzida pelo método *bulk*. Foi avaliada a capacidade de adsorção do material em extração em fase sólida para vinte moléculas pertencentes às três classes de antibióticos e a quantificação realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência. Foram analisadas amostras de carne de porco, com recuperações acima de 92% para todos os analitos e limite de detecção de $0,5 - 3 \text{ ng g}^{-1}$.

Mortari e colaboradores (45) sintetizaram um MIP para determinação do corante verde ácido 16. O MIP foi sintetizado pelo método bulk tradicional e, após otimização dos parâmetros, a eficiência de adsorção foi avaliada pela medida direta do corante adsorvido no MIP por meio de espectroscopia de reflectância difusa. O sistema apresentou faixa linear de trabalho de $1,0 - 10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de $0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O polímero impresso apresentou valores de seletividade superior à 1 para diferentes corantes e foi aplicado em amostras de água de rio, com recuperação na faixa de 93,3 – 98,8%.

Assim, em vista da sua versatilidade, os MIPs puderam ser acoplados com as técnicas clássicas e apresentaram alta eficiência no reconhecimento seletivo. No entanto, em virtude de algumas limitações que tais técnicas apresentam (como alto custo e elevado tempo de análise para a cromatografia ou a complexidade na construção de sensores; por exemplo), o desenvolvimento de dispositivos mais simples e de resposta rápida se mostram de alta relevância.

1.3 Testes de fluxo lateral

Entre os sistemas utilizados para análise rápida de modo qualitativo e quantitativo de diferentes moléculas, têm sido utilizados os imunoenaios de fluxo

lateral (do inglês *Lateral Flow Immunoassays*). Estes são sistemas de análise inspirados em *Point of Care Tests* (POCT), ou seja, testes para uso em qualquer local; sem a obrigatoriedade de estar em um laboratório. Deste modo, os testes de fluxo lateral se tornaram populares em análises clínicas, de alimentos e diagnósticos médicos devido à rapidez na obtenção dos resultados, alta seletividade e estabilidade, baixo custo e fácil manuseio. (46)

Entre os kits comerciais para uso doméstico, hospitalar, laboratorial ou clínico disponíveis atualmente que utilizam o formato fluxo lateral, encontram-se testes para: gravidez e fertilidade, glicose, colesterol, coagulação sanguínea, drogas, doenças infecciosas, urina, doenças oncológicas, marcadores cardíacos, patógenos alimentares, alérgenos, entre outros. (47)

A importância econômica desses dispositivos foi demonstrada em relatório reportado pela *LinkerReporter*, no qual é informado que em 2020 o mercado de POCT foi de 29,5 bilhões de dólares e com expectativa de que ele atinja 50,6 bilhões de dólares em 2025. Os principais usuários dos dispositivos de POCT, por região, foram América do Norte (39%), Europa (24%), Ásia (21%), América Latina (10%) e Oriente Médio e África (5%). O segmento de ensaios de fluxo lateral foi responsável pela maior participação do mercado, por plataforma, de diagnósticos *Point of Care* em 2020. (48)

Deste modo, a busca por dispositivos cada vez mais eficientes tem aumentado. A Figura 3a exibe o crescimento das publicações científicas em função dos anos para os imunoenaios de fluxo lateral; a Figura 3b mostra a segmentação do tipo de dados publicados.

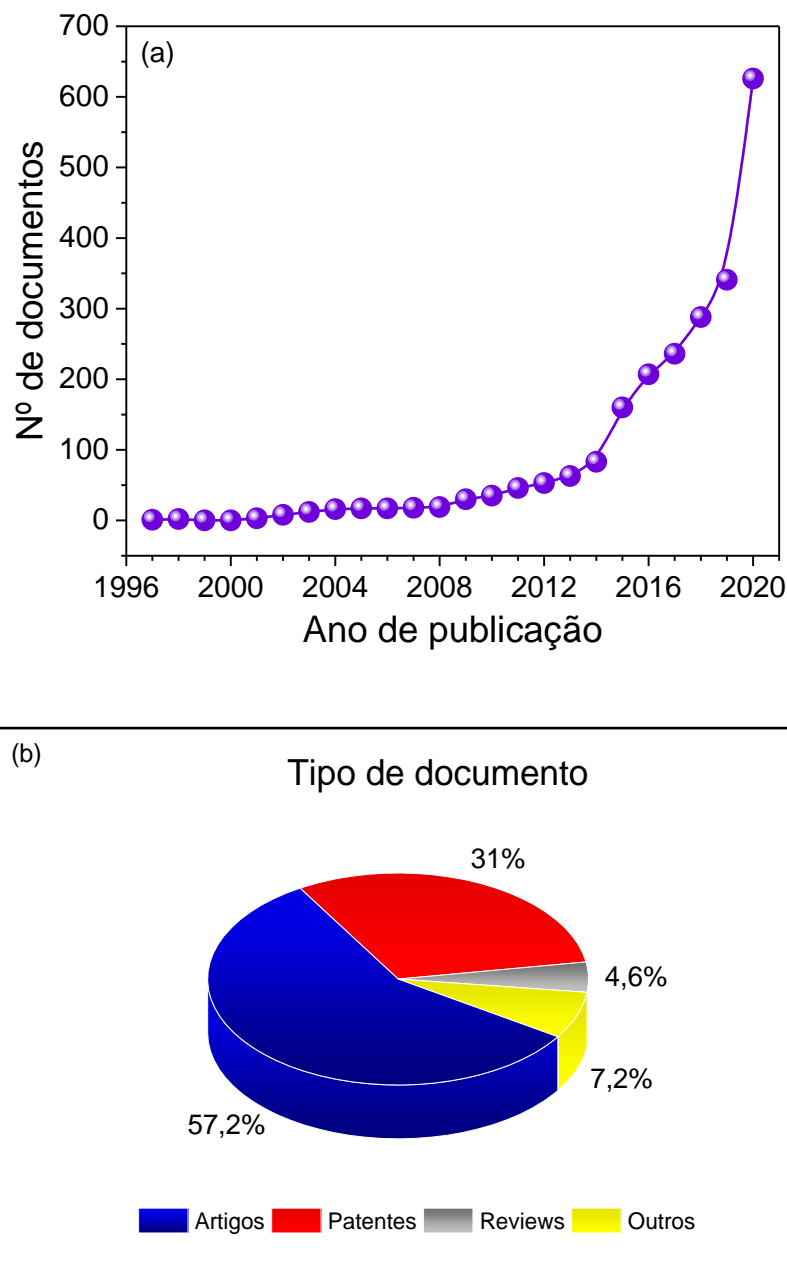


Figura 3 – (a) Levantamento anual do número de publicações utilizando o conceito *Lateral Flow Immunoassay* no intervalo de 1997 até 2020. (b) Distribuição das publicações em função do tipo de documento; na qual a categoria “outros” engloba “estudo de avaliação, estudo de comparação, ensaios clínicos, estudos de validação, *letters*, avaliação de caso, estudo de observação, errata, comentários e revisão sistemática”. Levantamentos utilizando a base de dados *SciFinder*[®].

Fonte: autor do trabalho.

Pela Figura 3a observa-se que até 2008 o número de publicações referentes aos imunoensaios de fluxo lateral se manteve constante, com um discreto aumento a partir 2009 até 2012. A partir 2013 houve um aumento acentuado ano a ano, sendo o maior número de publicações registrado em 2020, contando com 626 publicações. Esse aumento para o ano de 2020 pode ser explicado pela busca, desenvolvimento e

comparação da eficiência de testes rápidos tipo fluxo lateral para determinação do SARS-CoV-2, o coronavírus causador da pandemia mundial de Covid-19 que afetou todos os países a partir de 2020. (49)

Conforme exibido na Figura 3b, do total de trabalhos registrados, a maior parcela é para os artigos científicos (57,2%) seguida pelas patentes (31%). Portanto, é possível notar o crescimento na busca por sistemas mais eficientes e de com viabilidade comercial.

O dispositivo de fluxo lateral é constituído, como exibido na Figura 4, por um compartimento para inserir a amostra (tira de amostra); um compartimento conjugado à tira de amostra (tira conjugada) no qual são adicionadas as moléculas ou nanopartículas (NP) para o biorreconhecimento que se ligam ao analito (denominadas de moléculas/NP marcadoras); membrana de nitrocelulose, na qual flui a amostra e, por fim, uma tira para absorção dos reagentes (tira absorvente). (46)

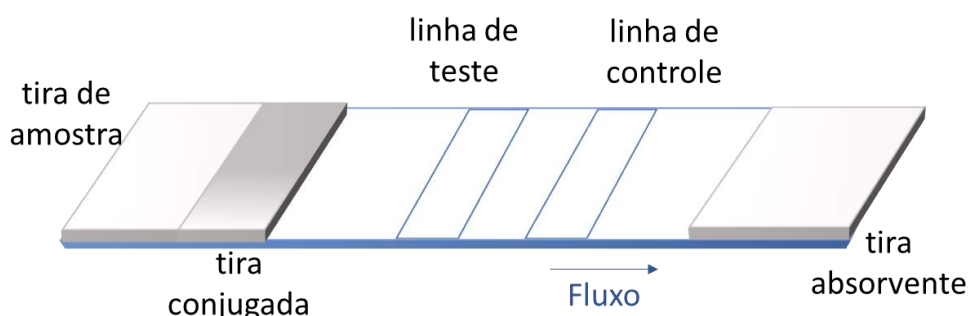


Figura 4 – Representação esquemática da tira de ensaio do tipo fluxo lateral com visão geral dos seus componentes e sentido do fluxo de solvente.

Fonte: autor do trabalho.

A amostra e a solução tampão de corrida são aplicadas na zona de amostragem que consiste em uma tira de amostra cuja constituição pode ser de nitrocelulose, nylon ou fibra de vidro. Podem ser aplicadas amostras de variadas composições: sangue total, plasma, soro, muco, saliva, água e alimentos. (50,51)

O segundo componente é a tira conjugada, cuja constituição pode ser a mesma da tira de amostra, sendo a fibra de vidro utilizada na maioria dos testes. Tanto a tira conjugada quanto a tira de amostra podem ser modificadas com a adição de agentes bloqueadores ou surfactantes para impedir a adsorção das biomoléculas, garantindo assim sua total eluição. (50,51)

A tira conjugada é recoberta com quantidades conhecidas de um marcador (por exemplo, anticorpo, proteína ou DNA) específico ao analito. O marcador responsável pelo biorreconhecimento é acoplado a nanopartículas responsáveis pela resposta visual do sistema na zona de teste. As nanopartículas mais utilizadas para a resposta colorimétrica são látex ou ouro coloidal. (50,51)

A membrana da zona de teste, constituída por nitrocelulose, é a parte na qual um segundo marcador específico para captura do analito é imobilizado em uma faixa estreita (linha de teste) na membrana. A intensidade da cor que aparece na linha de teste é proporcional à concentração do analito presente. As NP bioconjugadas livres migram pela membrana até a linha de controle, na qual é imobilizada um componente específico ao biorreconhecedor. Assim, a molécula conjugada na NP irá se ligar ao material específico formando uma linha visível, a qual é denominada de linha de controle e permite ao analista confirmar a viabilidade do teste. (50,51)

A zona do reservatório (tira absorvente) é composta por celulose e possui a função de absorver toda solução de corrida adicionada para análise e os demais componentes não-reagentes; sendo de extrema importância para impedir que as soluções adicionadas voltem à tira e ocasionem erros no experimento. (50,51)

A Figura 5 exemplifica o esquema básico de funcionamento do teste de fluxo lateral, além dos componentes principais do teste.

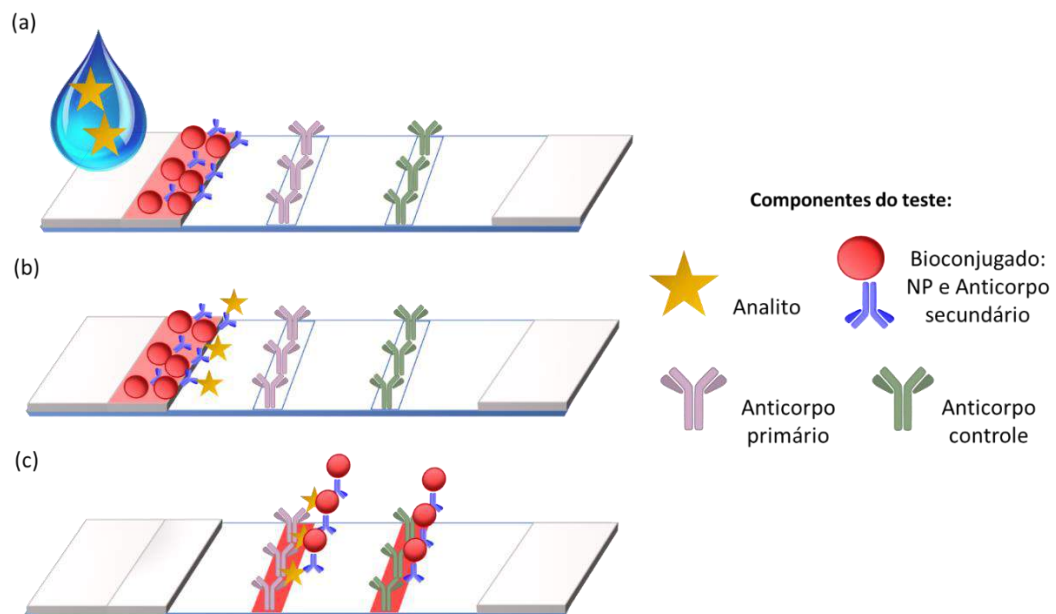


Figura 5 – Representação esquemática de funcionamento do imunoensaio não-competitivo de fluxo lateral com resposta positiva e dos componentes do teste. (a) Adição da amostra. (b) Eluição pelo sistema. (c) Resposta colorimétrica nas linhas de teste e controle.

Fonte: autor do trabalho.

Conforme exibe a Figura 5, a amostra contendo o analito é adicionada na tira de amostra e elui até a tira conjugada. O anticorpo imobilizado na nanopartícula de ouro se liga em um dos sítios disponíveis no analito. Ao continuar a eluição, outro sítio disponível se liga ao anticorpo de captura que compõe a linha teste. O excesso de conjugado continua a eluição e se liga ao anticorpo de captura específico na linha de controle; sendo observada a resposta colorimétrica gerada nas duas linhas.

A resposta visual do teste de fluxo lateral é o indicador qualitativo da presença ou ausência do analito na amostra, conforme resume a Figura 6.



Figura 6 – Resposta visual do teste de fluxo lateral de acordo com a presença do analito (teste positivo), ausência do analito (teste negativo) ou erros durante a resposta visual (teste inválido).

Fonte: autor do trabalho.

Pela Figura 6 nota-se que para a presença do analito, duas linhas coloridas são observadas, sendo a linha de teste e a linha de controle. No caso da ausência do analito, a linha de teste não apresenta resposta visual, apenas a linha de controle. É importante ressaltar que a linha de controle sempre deve apresentar resposta visual. Caso a linha de controle não apresente coloração ou apenas a linha de teste apresente resposta, o teste é considerado inválido e deve ser descartado. Possivelmente, algum erro durante a execução do teste ou degradação dos reagentes armazenados pode ter ocorrido. (50,51)

Os principais formatos para os imunoenaios de fluxo lateral são do tipo não-competitivo (como exemplificado na Figura 5) ou competitivos. O formato não-competitivo (ou também formato sanduíche) pode ser estruturado para analitos de alta massa molecular e que possuem mais de um epítopo disponível, como proteínas e enzimas, por exemplo. Já o formato competitivo é utilizado para haptenos, que são moléculas pequenas (baixa massa molecular) que geralmente possuem apenas um epítopo disponível. (52)

Os ensaios de fluxo lateral são majoritariamente utilizados como testes qualitativos. Contudo, eles também podem ser utilizados como testes quantitativos utilizando propriedades específicas das nanopartículas marcadoras (luminescência, fluorescência, quimiluminescência, entre outras) como forma de detecção. Diferentes tipos de leitores são disponíveis comercialmente, desde equipamentos mais sofisticados de bancada até os portáteis como os smartphones. (53)

Além dos anticorpos (mono ou policlonais) que são aplicados na maioria dos testes, atualmente outras fases de reconhecimento vêm sendo empregadas nos sistemas de fluxo lateral. São reportados o uso de fragmentos de anticorpos (apenas a porção Fab), nanocorpos (anticorpos específicos encontrados na família dos camelos) e aptâmeros (fitas simples de DNA). (51)

Tian e colaboradores (54) desenvolveram um dispositivo de fluxo lateral para determinação qualitativa e quantitativa da tetraciclina. O dispositivo foi estruturado no esquema competitivo: nanopartículas tipo rede-organometálicas (*Metal-Organic Frameworks* – MOFs) marcadas com anticorpos anti-tetraciclina competem pelo reconhecimento da tetraciclina presente na amostra e pela tetraciclina imobilizada na nitrocelulose (linha de teste). A linha de controle foi composta por anticorpos anti-IgG de rato produzido em cabra. As imagens para quantificação foram obtidas utilizando uma câmera fotográfica, quantificadas pelo software *ImageJ* e o teste apresentou faixa de trabalho linear de 0,09 a 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,045 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Um teste de fluxo lateral para determinação qualitativa de oxitetraciclina foi desenvolvido por Naik e colaboradores. (55) O ensaio foi estruturado no formato competitivo, sendo a linha de teste composta por oxitetraciclina conjugada à BSA e a linha de controle composta por anticorpo anti-IgG de rato produzido em cabra. Nas nanopartículas de ouro foram conjugados anticorpos anti-oxitetraciclina produzidos em ratos. Obteve-se que o LOD visual foi de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em solução padrão e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de leite fortificada com o analito.

Qian e colaboradores (56) desenvolveram um teste de fluxo lateral para determinação de tetraciclina utilizando o espalhamento Raman para quantificação do analito na linha de teste. Na tira conjugada foram depositadas nanoestrelas de ouro conjugadas com anticorpo monoclonal anti-tetraciclina produzido em rato, a linha de teste foi composta por tetraciclina conjugada à BSA e a linha de controle composta por anticorpo anti-IgG de rato produzido em cabra. Conforme estrutura do ensaio competitivo, para maiores concentrações de tetraciclina, houve diminuição na

intensidade do sinal Raman (sinal visual de coloração cinza). O ensaio de seletividade mostrou diminuição do sinal da linha teste para oxitetraciclina e clortetraciclina, indicando a ocorrência de reação cruzada e, deste modo, os pesquisadores concluíram que o teste deveria ser aplicado para a família das tetraciclina.

Portanto, em função do exposto, o desenvolvimento de materiais e sistemas de identificação altamente seletivos para contaminantes emergentes possui significativa importância. Assim, o presente trabalho dispõe sobre o desenvolvimento de diferentes tipos de MIPs para tetraciclina e construção de sistemas de fluxo lateral com diferentes composições para determinação desse antibiótico.

2 OBJETIVOS

Síntese, caracterização e avaliação da eficiência de MIPs seletivos a tetraciclina abordando três diferentes estratégias: convencional, com núcleo de sílica e de alta porosidade. Desenvolvimento e otimização de sistemas de análise rápida baseados em fluxo lateral contendo MIP ou aptâmeros como fase de reconhecimento seletivo à tetraciclina.

3 CAPÍTULO I

SÍNTESE E OTIMIZAÇÃO DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA IDENTIFICAÇÃO SELETIVA DE TETRACICLINA

3.1 Introdução

O MIP tradicional, embora muito eficiente, possui algumas limitações em suas funções; tais como transferência de massa lenta e reduzida acessibilidade do analito nas cavidades seletivas, devido à morfologia irregular das partículas e distribuição heterogênea dos sítios de ligação. (57,58)

Para minimizar esses inconvenientes, diferentes abordagens na síntese de MIP foram desenvolvidas. Uma alternativa consistiu na combinação entre MIPs e nanopartículas (NP), gerando materiais tipo *core-shell*; em que uma NP sólida atua como núcleo que é recoberto com uma casca polimérica de MIP. (59)

Em compósitos *core-shell*, devido à sua estrutura que tem pequena dimensão com elevada razão superfície/volume, a maioria dos locais impressos está situada na superfície ou na proximidade da superfície, com uma distribuição mais homogênea. Portanto, o MIP *core-shell* exibiu melhor capacidade de ligação, cinética mais rápida e melhor acessibilidade do analito ao sítio de reconhecimento quando comparado com o MIP tradicional. (60,61)

A espessura da casca do MIP e a densidade dos locais de reconhecimento são fundamentais para melhorar seu desempenho. Deste modo, a escolha do método de síntese desempenha um papel importante para os MIPs *core-shell*. Dos métodos disponíveis, a polimerização por precipitação é uma das mais empregadas por ser simples, rápida e fácil. (62)

Entre os diferentes tipos de NP que podem ser utilizadas como núcleo; cada material com suas propriedades permite diferentes aplicações, como exemplificado na Tabela 1. (59,61)

Tabela 1 – Principais tipos e respectivas funções desempenhadas por nanopartículas utilizadas como núcleo no desenvolvimento de MIP *core-shell*.

Tipo de núcleo	Função
Sílica	Homogeneidade no formato das partículas
Nanopartículas magnéticas	Separação magnética externa, evitando processos de centrifugação
Pontos quânticos	Amplificação de sinal analítico de fluorescência na construção de sensores
Metais nobres	Aumento sinal Raman, ganho de condutividade
Nanopartículas poliméricas	Dispersão das partículas e controle da forma

Fonte: autor do trabalho.

Os núcleos podem ser sem modificações ou recobertos com algum composto, a fim de melhorar sua estabilidade, solubilidade e impedir aglomeração das NP. A modificação também permite inserir grupos funcionais necessários para o recobrimento do MIP na superfície da nanopartícula. (63)

No ano de 2004, Cai e Gupta (64) desenvolveram o primeiro MIP reportado na literatura para identificação de tetraciclina. O estudo avaliou o efeito da capacidade ligação do polímero pelo antibiótico em função da concentração dos reagentes utilizados na síntese e do tipo solvente de ligação. Os pesquisadores observaram que solventes mais polares e concentrações intermediárias de monômero estrutural permitiram melhor ligação entre polímero e analito; além disso o MIP apresentou capacidade de retenção de três a cinco vezes superior em relação ao NIP.

O primeiro MIP do tipo *core-shell* desenvolvido para identificação de oxitetraciclina foi do tipo MIP magnético. Chen e colaboradores (65) sintetizaram nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) e acrescentaram as NP no processo de síntese do MIP. O polímero apresentou intervalo de recuperação para o analito em amostras na ordem de 72,8 – 96,5% e quando comparado com outros MIP para tetraciclina não modificados, o MIP magnético apresentou melhor resultado de recuperação do analito em amostras complexas.

Atualmente diferentes MIP *core-shell* magnéticos para identificação de análogos da tetraciclina foram desenvolvidos, (66) além da aplicação desses MIPs em extração em fase sólida com posterior detecção da tetraciclina tanto por métodos eletroquímicos (67) quanto por cromatografia líquida de alta eficiência. (68)

Pizán-Aquino e colaboradores (68) sintetizaram um MIP magnético para identificação de tetraciclina. O polímero foi caracterizado por técnicas como microscopia eletrônica de varredura e por infravermelho. Após otimizados os estudos de adsorção, o MIP foi aplicado em amostras de leite e a quantificação do analito (por meio da análise do sobrenadante) foi realizada tanto por cromatografia líquida de alta eficiência quanto por voltametria de pulso diferencial ao utilizar um eletrodo de pasta de carbono como eletrodo de trabalho. Para o método eletroquímico a faixa linear de trabalho foi de 0,13 – 1,9 mg L⁻¹ e para o método cromatográfico de 10 – 65 mg L⁻¹. A recuperação do analito em amostras de leite ficou próxima de 100% para o MIP.

Outros MIPs tipo *core-shell* reportados para identificação da tetraciclina são os que utilizam pontos quânticos como núcleo, permitindo utilizar as propriedades fluorescentes tanto do núcleo quanto da tetraciclina no desenvolvimento de sensores ou para análises em solução. (69)

Yu e colaboradores (70) desenvolveram um MIP com núcleo de pontos quânticos de carbono. O material foi caracterizado amplamente por diferentes técnicas, como difração de raio X, espectroscopia de fotoelétrons de raios X, infravermelho e calorimetria diferencial exploratória. Os pesquisadores observaram que a intensidade de fluorescência se manteve constante (0 a 60 min) e foi ótima na temperatura de 65 °C. Nas amostras de água avaliadas, o intervalo de recuperação para a tetraciclina foi de 101,2 – 104,1% para concentrações de 5,0 – 25,0 mg L⁻¹.

Mais recentemente tem sido desenvolvido MIP de alta porosidade (do inglês *hollow porous* MIP). Esses polímeros são inicialmente do tipo *core-shell* contendo núcleo sólido como magnetita, esferas de sílica ou pontos quânticos; sendo o núcleo removido do material utilizando uma solução adequada para solubilização do núcleo (geralmente soluções aquosas ácidas ou básicas) e mantendo íntegra a estrutura do polímero. (71,72)

Muitas vezes no MIP *core-shell*, devido à espessura da casca polimérica, o acesso às cavidades seletivas acaba se tornando limitado, o que diminui a sensibilidade do MIP. Ao remover o núcleo o MIP se torna oco, liberando o acesso a um maior número de cavidades seletivas no MIP. O aumento das cavidades seletivas liberadas usando esta estratégia de síntese na obtenção do MIP permite uma transferência de massa bilateral do analito, tanto pela interface exterior quanto pela interface interior da camada polimérica; o que amplia consideravelmente a difusão do analito para os sítios de conhecimento. (62)

Mais ainda, quando comparada a eficiência de reconhecimento entre um MIP com núcleo nanoparticulado e seu correspondente MIP após remoção do núcleo, uma vez que a área superficial disponível no MIP oco se torna maior, esse último apresentou maior sensibilidade no reconhecimento do analito. (62,72)

Um dos primeiros trabalhos reportados na obtenção de MIP oco (ou MIP de alta porosidade) foi desenvolvido por Zhao e colaboradores. (73) Os pesquisadores desenvolveram um sensor quimiluminescente para determinação do inseticida fenpropatrina. O MIP de alta porosidade foi obtido por meio da remoção do núcleo nanoparticulado de sílica (SiO_2 NP) ao lavar o MIP em solução de ácido fluorídrico. O MIP apresentou capacidade de retenção aproximadamente 2,5 vezes maior que o NIP e o sensor, após otimizado, limite de detecção de $3,1 \times 10^{-8}$ g mL⁻¹ e porcentagem de recuperação na faixa de 97,6 – 102,3% quando aplicado em amostras de vegetais.

Fan e colaboradores (74) sintetizaram polímeros impressos fotorresponsivos do tipo *core-shell* (com núcleo de sílica modificada) e MIP oco de alta porosidade para identificação seletiva do oligossacarídeo α -ciclodextrina. Os polímeros foram caracterizados por diferentes técnicas (como infravermelho, termogravimetria e microscopia eletrônica de varredura) e tiveram sua eficiência avaliada por diferentes ensaios de adsorção. O material de alta porosidade exibiu maior capacidade de ligação e transferência de massa mais rápida quando comparado com o polímero *core-shell*; respectivamente 2 h com capacidade de ligação máxima em cerca de 13,9 mg g⁻¹ e 4 h com capacidade de 10,5 mg g⁻¹.

Diversos trabalhos que mostram a obtenção e aplicação de MIP oco de alta porosidade sintetizaram inicialmente o MIP *core-shell* com núcleo de sílica (75–77) ou magnetita. (78–80) Também são reportados MIPs ocos de alta porosidade que respondem à estímulos específicos (luz, temperatura e calor) para liberação/ligação do analito. (81–83)

Embora sejam relatados diferentes tipos de MIP para determinação de tetraciclina e outros antibióticos, MIPs de alta eficiência, como o MIP oco de alta porosidade, ainda são escassos na literatura; principalmente se comparados com o tipo *core-shell*. Assim, o desenvolvimento de novos tipos de MIP podem permitir maior eficiência na identificação de antibióticos como a tetraciclina e seus análogos.

3.2 Objetivos

Síntese e caracterização físico-química de três tipos diferentes de MIP (convencional, com núcleo de sílica e de alta porosidade); bem como otimização e comparação da eficiência na identificação da tetraciclina por meio de estudos de adsorção. Por fim, verificação da capacidade de reconhecimento seletivo do material em amostras complexas.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para a síntese do MIP convencional foram tetraciclina, ácido acrílico e etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) fornecidos pela Sigma-Aldrich® e peróxido de benzoíla fornecido pela Vetec. Os solventes utilizados para síntese do polímero foram metanol, adquirido da Panreac® e etanol, da marca Synth®; e para a remoção do analito utilizou-se metanol e ácido acético glacial fornecidos pela Synth®.

Para a síntese e modificação das nanopartículas de sílica foram utilizados tetraetil ortossilicato (TEOS) e metacriloxipropil trimetoxissilano (MPS), fornecidos respectivamente pela Acros® e Aldrich®. Os solventes utilizados foram etanol e hidróxido de amônio (NH₄OH), ambos fornecidos pela Synth®.

A remoção do núcleo de sílica para obtenção do MIP de alta porosidade foi avaliada utilizando-se soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido fluorídrico (HF); fornecidos respectivamente pela Synth® e Sigma-Aldrich®.

Todos os sistemas aquosos foram preparados com água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q *Ultra Pure Water System* da marca Millipore® (com resistividade igual a 18,2 MΩ cm).

Para os estudos de otimização dos MIP sintetizados foram preparadas soluções de tetraciclina em metanol, acetonitrila (ambos Panreac®), etanol (Synth®), água ultrapura e misturas desses solventes. A otimização dos MIP sintetizados (estudo de dosagem de massa, tempo de equilíbrio e isoterma) foram realizadas em acetonitrila. Para os ensaios de seletividade e interferência, todos os compostos utilizados (minociclina, doxiciclina, norfloxacina, penicilina G, diclofenaco e biotina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®.

As quantificações dos ensaios de otimização foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para as medidas utilizou-se metanol e acetonitrila grau HPLC, ambos da Panreac[®]. Para o preparo de fase móvel aquosa acidificada, utilizou-se ácido fosfórico fornecido pela Panreac[®].

3.3.2 Instrumentação

3.3.2.1 Caracterizações

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, utilizando uma faixa de leitura de 4000 a 400 cm^{-1} . A análise foi realizada diretamente nas amostras sólidas, no modo de reflectância total atenuada.

A morfologia dos polímeros foi observada utilizando o microscópio eletrônico de varredura de emissão por campo (MEV-FEG) da marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2.1.0.3, equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (*energy dispersive spectroscopy* - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software de operação NSS 2.3. Os polímeros foram sonicados em álcool isopropílico por 10 min e recobertos com carbono, para posterior análise no microscópio.

3.3.2.2 Métodos analíticos

As análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 60 da Agilent[®], comandado pelo software *ScanCary WinUV*. Todas as análises foram realizadas em cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e varredura do comprimento de onda no intervalo de 200 a 700 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 otimizada consistiu na mistura de solução aquosa 0,1% (v/v) de H_3PO_4 com acetonitrila na proporção 70:30 (v/v), a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A detecção foi realizada utilizando comprimento de onda de 285 nm e volume de injeção de amostra de $10 \mu\text{L}$.

3.3.3 Síntese dos MIPs e das nanopartículas de sílica (SiO_2 NP)

O MIP convencional para tetraciclina foi obtido pelo método de síntese por precipitação, o qual consistiu em: tetraciclina (0,25 mmol) e ácido acrílico (3,0 mmol) – monômero funcional – foram misturados em 50 mL da mistura metanol:etanol (1:1 v/v), utilizada como solvente porogênico, e mantidos interagindo sob agitação por 12 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A seguir, acrescentou-se à mistura EGDMA (30,0 mmol) – monômero estrutural – e foi borbulhado N_2 por 25 min na solução de maneira a impedir que o O_2 interferisse na polimerização. Por fim, o iniciador radicalar peróxido de benzoíla (0,25 mmol) foi adicionado e o sistema vedado logo a seguir; sendo levado ao aquecimento a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h. (68) Finalizada a síntese, lavou-se o polímero em sistema soxhlet com metanol/água para remover a tetraciclina e os reagentes em excesso. As águas de limpeza foram monitoradas por espectrofotometria na região do UV-Vis.

Para síntese dos polímeros do tipo *core-shell*, inicialmente foram sintetizadas nanopartículas de SiO_2 conforme método proposto por Stöber (84) e modificadas com a inserção de um grupo vinil, (72) conforme esquema exibido na Figura 7a. Para tanto, adicionou-se 1,2 mL de tetraetil ortossilicato (TEOS) em uma solução composta por 18,0 mL de EtOH; 1,8 mL de água ultrapura e 0,8 mL de NH_4OH . O sistema foi vedado e mantido sob agitação em temperatura ambiente por 1 h. A seguir, foi adicionada gota a gota uma solução composta pela mistura de 1,0 mL de TEOS e 0,6 mL de metacriloxipropil trimetoxissilano (MPS). O sistema foi mantido sob agitação por 1 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e, após esse período, as nanopartículas de SiO_2 contendo o grupo vinil (SiO_2 - $CH=CH_2$ NP) foram extensivamente lavadas com etanol e água ultrapura e secas.

A síntese do MIP *core-shell* foi realizada com as mesmas proporções e reagentes da síntese do MIP convencional, cujo protocolo de obtenção foi modificado pela adição de 300,0 mg de SiO_2 - $CH=CH_2$ NP no sistema e pelo borbulhamento de N_2 constante até o final da síntese (Figura 7b). A limpeza dos polímeros também foi realizada de modo idêntico ao do MIP convencional.

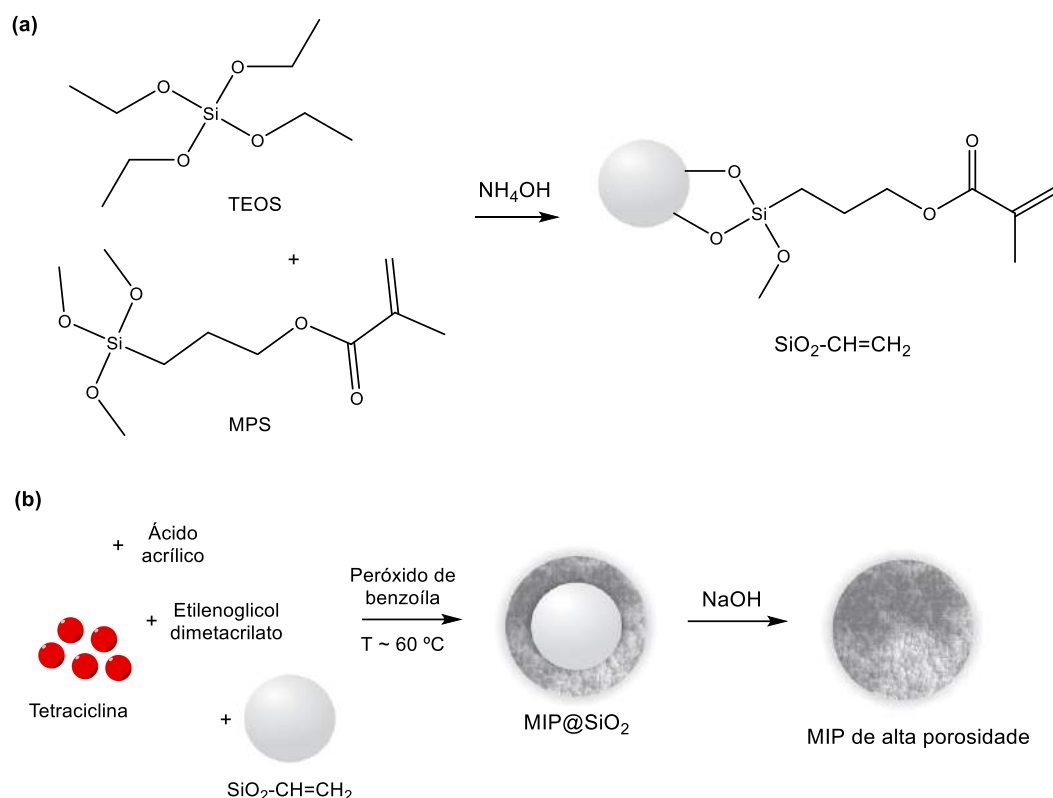


Figura 7 – Esquemas de (a) síntese das nanopartículas de SiO_2 modificadas com grupo vinil e (b) reagentes e condições para obtenção do MIP do tipo core-shell - MIP@SiO_2 - e posterior remoção do núcleo de sílica para obtenção do MIP de alta porosidade.

Fonte: autor do trabalho.

Para obtenção do MIP de alta porosidade (Figura 7b) 100,0 mg de MIP@SiO_2 foram adicionadas em 10,0 mL de solução de NaOH $2,0\text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram sonicadas a $40\text{ }^\circ\text{C}$ por 40 minutos. Após esse tempo, as soluções foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido, seguido pela adição de mais 10,0 mL da solução de NaOH e o sistema mantido sob agitação por 4 horas. A seguir, os polímeros de alta porosidade foram lavados 5 vezes com água ultrapura e 2 vezes com EtOH e separados da mistura por centrifugação.

Analogamente aos diferentes MIPs, foram sintetizados NIPs como material de controle. As condições de síntese são semelhantes à do MIP; contudo, não há adição do analito.

3.3.4 Otimização das condições cromatográficas

Foram preparadas soluções de tetraciclina em MeOH ou ACN nas concentrações de 1,0 e $100,0\text{ mg L}^{-1}$. (68) Mantendo-se constante a vazão da fase

móvel e volume de injeção, respectivamente em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $10 \text{ }\mu\text{L}$, variou-se tanto a composição quanto as proporções dos solventes da fase móvel.

Utilizando método de eluição isocrático e com maior composição de fase aquosa, trabalhou-se no intervalo entre 75:25 v/v até 65:35 v/v dos seguintes eluentes: H_3PO_4 0,1 % (v/v) : ACN e H_3PO_4 0,1 % (v/v) : MeOH.

3.3.5 Validação analítica

O coeficiente de assimetria do pico cromatográfico foi calculado a partir de $A_s = \frac{B_{0,1}}{A_{0,1}}$; na qual A_s é o fator de assimetria, $B_{0,1}$ é a distância do máximo do pico até a cauda do pico (ponto definido na altura do pico a partir de 10% da linha base) e $A_{0,1}$ é distância do máximo do pico até a borda inicial (ponto também definido na altura do pico a partir de 10% da linha base).

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram obtidos a partir da equação da reta da curva analítica, respectivamente pelas relações $\text{LOD} = 3 \frac{s}{S}$ e $\text{LOQ} = 10 \frac{s}{S}$; nas quais s é o desvio do coeficiente linear e S é o coeficiente angular.

Os desvios padrão relativos (RSD) foram obtidos a partir de
$$\text{RSD} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média}} \times 100.$$

3.3.6 Estudos de otimização e avaliação da eficiência dos polímeros

Para todos os experimentos de otimização descritos a seguir, após o final de cada tempo de interação sob agitação constante, os polímeros foram separados da solução por centrifugação, os sobrenadantes filtrados em membranas de PTFE hidrofílico de $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ e avaliados por CLAE.

Para a análise dos resultados obtidos durante o processo de adsorção foi avaliada a quantidade de tetraciclina adsorvida, denominada doravante de porcentagem retida no MIP. Para tanto, como foi quantificada a tetraciclina livre no sobrenadante, a porcentagem retida foi calculada a partir da diferença entre a quantidade adicionada inicialmente (C_i) e a quantidade livre no equilíbrio (C_{eq}).

Portanto, considerou-se que $\% \text{ Retida} = \frac{C_i - C_{eq}}{C_i} \times 100.$

Os estudos de otimização começaram com uma avaliação preliminar do tipo de solvente para religação da tetraciclina e da quantidade ideal de MIP. Para isso, foram colocadas em contato diferentes massas de MIP e NIP (intervalo de 5,0 até 40,0 mg) com 2,0 mL de solução 20,0 mg L⁻¹ de tetraciclina clorada com 2 h de interação.

Cada experimento de dosagem de massa foi avaliado em solução do analito preparada em diferentes solventes: MeOH, EtOH, ACN e misturas desses solventes orgânicos com diferentes proporções de água ultrapura.

Após definido o melhor solvente e a melhor massa de polímero para os estudos, avaliou-se o melhor tempo de interação. Deste modo, 5,0 mg dos materiais sintetizados (MIP, MIP@SiO₂ e MIP de alta porosidade) ficaram interagindo com 4,0 mg L⁻¹ de solução tetraciclina preparada em ACN por diferentes tempos; em intervalo de 10 até 240 min.

Para avaliar a capacidade de adsorção dos MIPs pela tetraciclina foram construídas curvas de isoterma de adsorção. Assim, 5,0 mg dos polímeros foram pesadas e deixadas para interagir por 90 min com diferentes concentrações de tetraciclina (1,0 – 90,0 mg L⁻¹) preparada em ACN.

Por fim, para avaliação da seletividade dos polímeros tradicionais e de alta porosidade, soluções dos seguintes analitos foram preparadas na concentração de 5,0 mg L⁻¹ em ACN: tetraciclina, minociclina, doxiciclina, norfloxacina, penicilina G e diclofenaco.

Para o ensaio competitivo (de interferência) desses mesmos analitos, soluções contendo uma mistura de tetraciclina mais um interferente (tetraciclina + minociclina, tetraciclina + doxiciclina, etc.) foram preparadas na mesma concentração e composição de solvente do ensaio anterior. A avaliação do sobrenadante por CLAE permitiu a quantificação simultânea do analito e do interferente.

Tanto nos ensaios de seletividade quanto de interferência, 5,0 mg de polímeros foram colocados em contato com as soluções sob agitação por 90 min.

3.3.7 Preparo das amostras

Foram avaliados três tipos de amostras diferentes: água, fluido biológico e alimento. As amostras de água consistiram em água mineral e água de rio coletada na região de Araraquara (rio Jacaré-Guaçu). A amostra biológica consistiu em solução

padrão sintética que simula urina humana, fornecida pela Sigma-Aldrich®. O alimento avaliado foi leite semidesnatado adquirido em mercado local.

Todas as amostras foram fortificadas com tetraciclina com concentração final de 50 mg L⁻¹. As amostras de água foram fortificadas e filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílica 0,45 µm para remoção das partículas sólidas. As amostras de urina sintética e leite foram diluídas em 50% na análise final; das quais a urina não exigiu preparo e a amostra de leite foi previamente tratada antes da análise para remoção das proteínas.

A amostra de leite foi preparada de acordo com o seguinte protocolo: (85,86)

- i. Foram adicionados 5,0 mL de ácido tricloroacético (24% m/v em acetonitrila) em 10,0 mL da amostra de leite;
- ii. A mistura foi levada em banho de ultrassom a 25 °C por 10 min;
- iii. Posteriormente a mistura foi colocada sob agitação em vórtex por 1 min e levada à centrifugação por 10 min a 2500 rpm;
- iv. Por fim, a amostra foi filtrada em membrana de PTFE 0,45 µm.

3.3.8 Aplicação em amostra

Para avaliação da capacidade de recuperação dos polímeros impressos em amostras complexas: 5,0 mg do MIP e NIP de alta porosidade foram colocados em contato com as amostras previamente fortificadas com tetraciclina 50 mg L⁻¹ sob agitação por 90 min. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 5 min a 2500 rpm, filtradas em membrana de PTFE e os sobrenadantes analisados por CLAE.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Sínteses dos polímeros propostos

Foram sintetizados, conforme procedimento descrito na metodologia experimental, três tipos de polímeros biomiméticos para identificação seletiva de tetraciclina: MIP convencional, MIP do tipo *core-shell* contendo núcleo de sílica (MIP@SiO₂) e MIP de alta porosidade; além dos respectivos polímeros controle (NIP).

O MIP convencional foi obtido pelo método da precipitação, no qual utiliza-se um excesso de solvente em relação aos outros reagentes da síntese; sendo utilizado esse método por sua vantagem na obtenção de partículas poliméricas homogêneas.

Para síntese do MIP *core-shell* inicialmente foram obtidas nanopartículas (NP) de SiO₂ modificadas com grupo vinil. Esses grupos são importantes uma vez que, por meio da reação radicalar de polimerização, (87) são os responsáveis por ligar covalentemente o MIP na superfície das nanopartículas.

Para obtenção do MIP de alta porosidade utilizou-se o MIP@SiO₂ como base e, para tanto, foi realizada uma etapa de remoção do núcleo; a ser discutida posteriormente.

Todos os polímeros sintetizados, após secos, foram submetidos a lavagem em sistema soxhlet de refluxo do solvente para remoção do analito e do excesso de reagentes empregados na síntese. A Figura 8 exibe os espectros de absorção na região do UV-Vis para os solventes de limpeza do MIP e NIP convencionais; no qual a limpeza 1 corresponde à primeira solução composta pela mistura de solventes metanol:ácido acético (9:1 v/v) e a limpeza 7 corresponde à última solução de limpeza composta por MeOH; sendo cada solução trocada a cada 12 h.

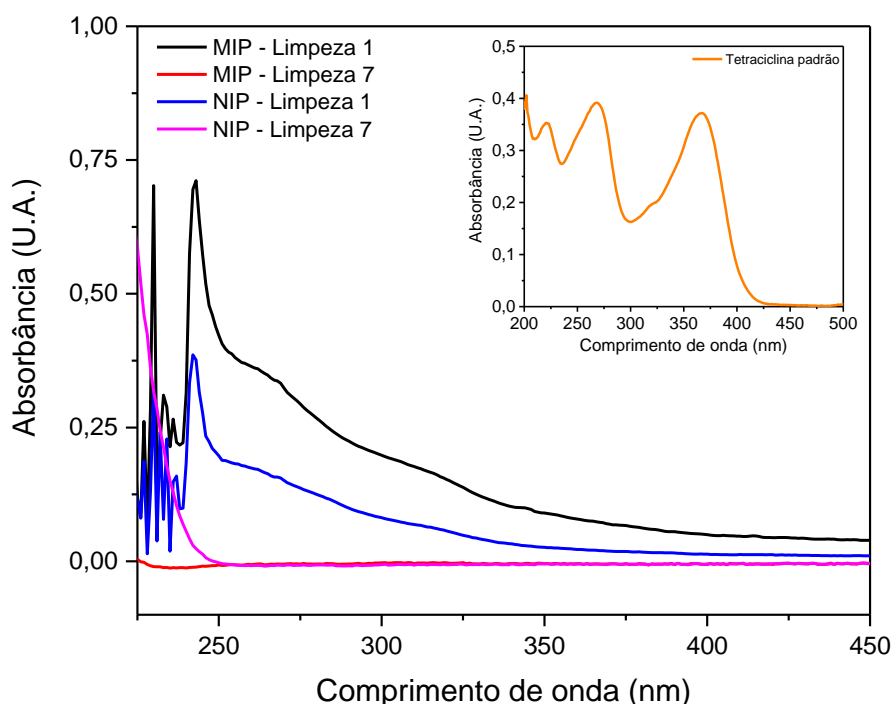


Figura 8 – Espectros de absorção no UV-Vis da primeira (limpeza 1) e última (limpeza 7) solução de lavagem dos polímeros convencionais MIP e NIP. *Inset*: espectro de absorção no UV-Vis de solução padrão de tetraciclina 10,0 mg L⁻¹.

Fonte: autor do trabalho.

Por meio da Figura 8, observa-se na limpeza com MeOH:HAc a banda correspondente ao ácido acético em 242 nm, de alta intensidade. A presença das bandas de alta intensidade da tetraciclina (em 268 nm e 365 nm, conforme exibido no espectro da solução padrão) não foram constatadas com precisão devido à baixa concentração de tetraciclina presente. No espectro referente à limpeza 1 do MIP é possível observar em 264 nm uma absorção de baixa intensidade que pode ser atribuída à tetraciclina, cujo deslocamento da banda possivelmente ocorre devido à presença do ácido acético e outros reagentes da síntese.

Observou-se que a solução de solvente ficou amarelo clara (coloração característica da tetraciclina em solução) na primeira limpeza do MIP, indicando que o analito estava sendo removido dos polímeros.

Assim, o processo de limpeza consistiu em três soluções de MeOH:HAc e quatro soluções de MeOH. O MeOH puro foi utilizado para remover qualquer resquício de ácido presente no polímero. Como observado no espectro da limpeza 7 não há presença de nenhuma banda de absorção, confirmando que os polímeros foram limpos.

O mesmo processo de limpeza foi realizado para os polímeros *core-shell* e de alta porosidade. Para esses materiais o processo de limpeza foi otimizado consistindo em limpeza com duas soluções de MeOH:HAc (9:1 v/v) e três soluções de MeOH puro.

Para obtenção do MIP de alta porosidade foi realizada uma etapa adicional além do procedimento de limpeza tradicional, uma vez que esse tipo de material é obtido pela remoção do núcleo nanoparticulado do MIP tipo *core-shell*. A literatura mostra diferentes metodologias utilizando tanto pH ácidos - menor que 2,5 - (71) ou básicos - maiores que 8 - (80) para remoção do núcleo nanoparticulado de MIP; uma vez que a sílica possui as ligações Si-O-Si hidrolisadas em meio ácido e em meio básico o excesso de grupos OH reage com os silanóis residuais ocasionando a dissolução da sílica. (88,89)

Deste modo, para avaliar a remoção da sílica, foram utilizadas as $\text{SiO}_2\text{-CH=CH}_2$ NP como controle: 100,0 mg dessas nanopartículas foram colocadas separadamente em contato com 5,0 mL de solução de HF 10% (v/v) e NaOH 2,0 mol L⁻¹. Após o procedimento de agitação, tanto no meio ácido quanto no básico ainda foram verificadas NPs presentes e, deste modo, optou-se por dobrar o volume de solução.

Para o meio ácido, mesmo após as mudanças, ainda restou uma pequena quantidade de NP aglomeradas em solução. Para o meio básico, como exibido na Figura 9, todas as NP foram solubilizadas com 10,0 mL de solução.

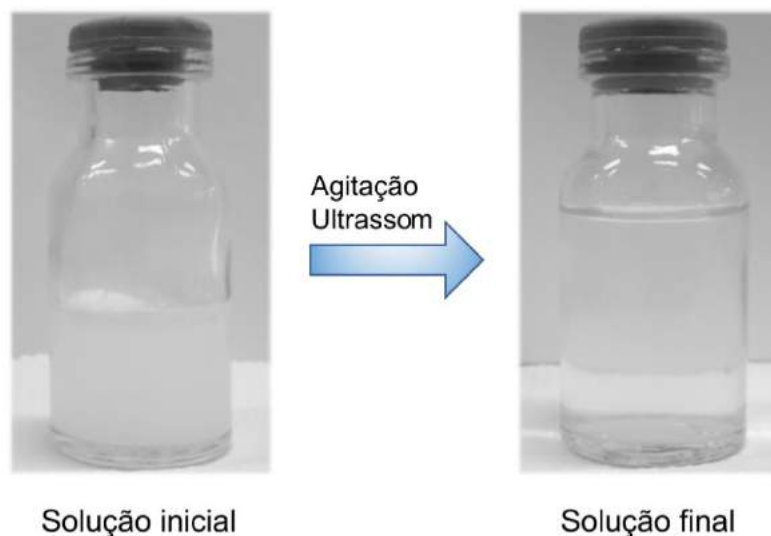


Figura 9 – Soluções padrão para verificação da dissolução das NP: solução inicial de 100,0 mg de SiO₂ NP dispersas em NaOH 2,0 mol L⁻¹ e solução final após banho ultrassônico e agitação.

Fonte: autor do trabalho.

Deste modo, a mudança de turbidez da solução inicial de 5,0 mL para transparência no volume final indica completa solubilização das SiO₂ NP. Portanto, foi adotada a solução concentrada de NaOH 2,0 mol L⁻¹ para dissolução do núcleo de sílica do MIP@SiO₂; sendo o mesmo procedimento do controle de SiO₂-CH=CH₂ aplicado para os polímeros. Ao final, obteve-se o MIP/NIP de alta porosidade, os quais foram lavados com excesso de água ultrapura e etanol para remover o excesso de NaOH dos materiais.

Para todos os tipos de polímeros sintetizados as sínteses e procedimento de limpeza foram repetidas diversas vezes para obter as massas de material necessárias para as caracterizações e experimentos de adsorção, seguindo sempre o mesmo protocolo descrito anteriormente.

3.4.2 Caracterização dos polímeros

Todos os polímeros biomiméticos (convencional, *core-shell* e de alta porosidade) e seus respectivos controles, após limpos e secos, foram devidamente caracterizados por diferentes técnicas.

A análise de MEV-FEG foi realizada com o intuito de observar a morfologia, distribuição e características superficiais dos diferentes materiais. A Figura 10 exibe as imagens da microscopia de varredura para as SiO₂ NP e a Figura 11 para os MIPs e NIPs sintetizados.

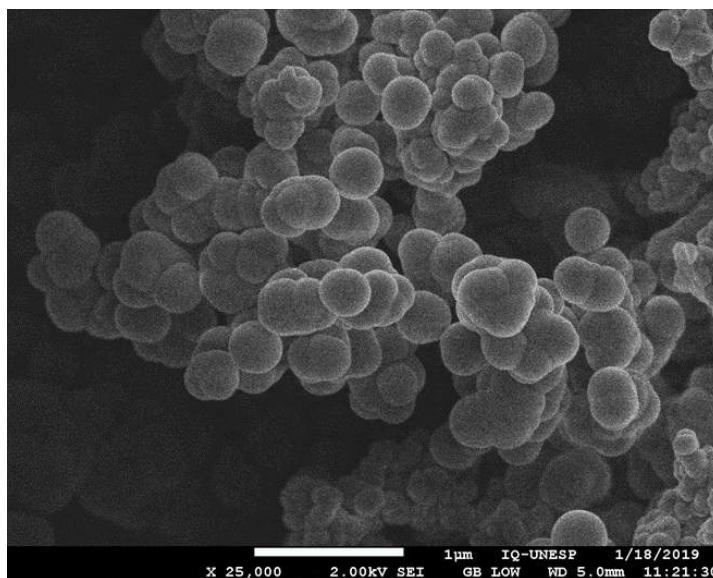


Figura 10 – Imagens de MEV-FEG das nanopartículas de SiO₂.
Fonte: autor do trabalho.

Para as nanopartículas de SiO₂ (Figura 10) observam-se partículas homogêneas, com formato esférico bem definido e superfície rugosa; apresentando tamanho médio de $0,33 \pm 0,03 \mu\text{m}$.

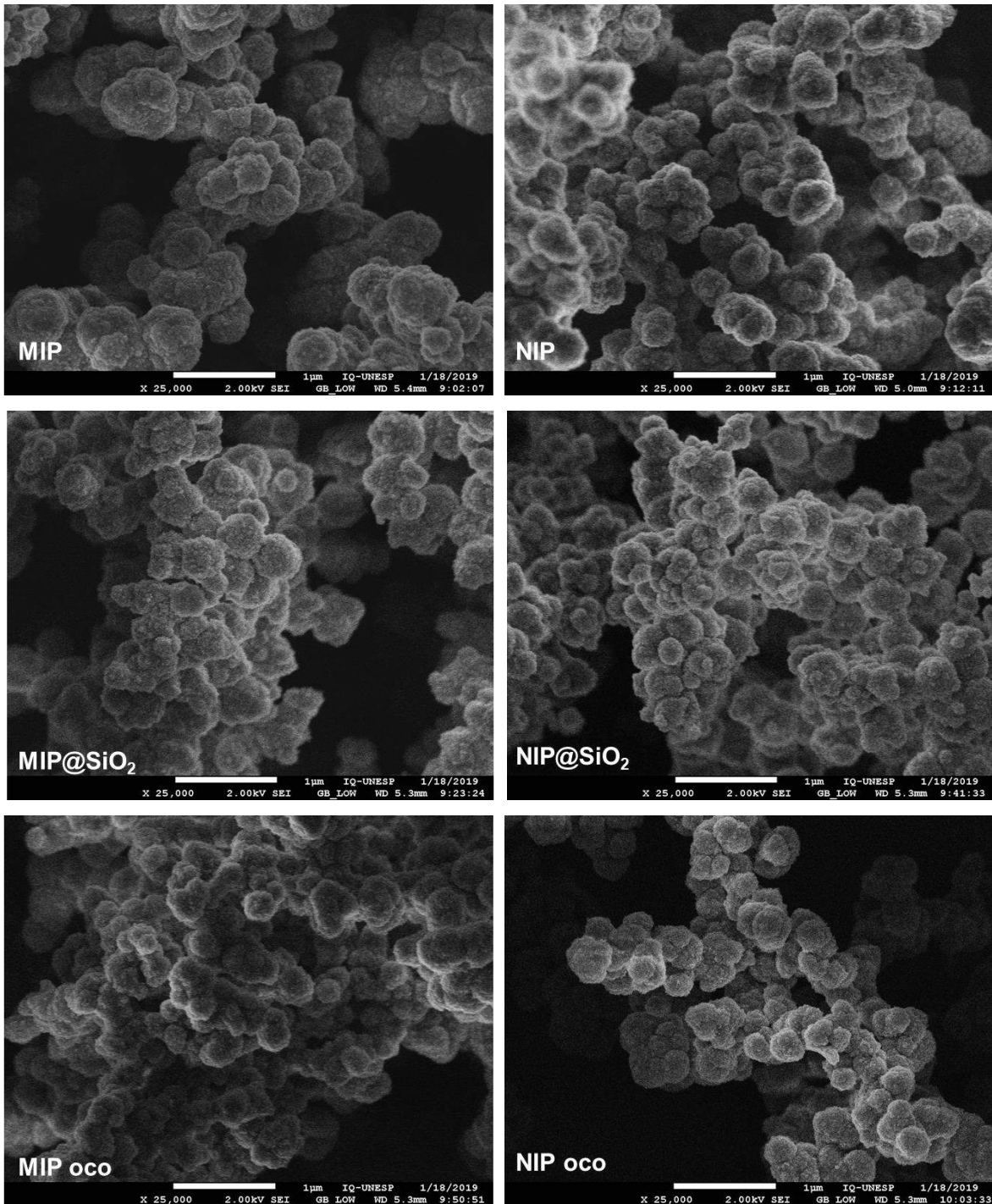


Figura 11 – Imagens de MEV-FEG par os diferentes MIPs sintetizados e seus respectivos controles.
Fonte: autor do trabalho.

Os diferentes polímeros apresentaram características superficiais semelhantes, como formato esférico e com alta rugosidade; além das partículas estarem ligeiramente aglomeradas. É importante notar a diferença superficial da sílica, a qual é mais homogênea, com a superfície rugosa dos polímeros; proveniente da estrutura monomérica altamente porosa que é característica desses materiais.

Comparando cada MIP com o seu respectivo NIP não são observadas diferenças entre as superfícies dos materiais, uma vez que suas sínteses e composição são idênticas. Além disso, não foi possível determinar com precisão o tamanho das partículas poliméricas devido à aglomeração delas.

Em concomitante com as imagens de MEV foram obtidos dados de espectroscopia por dispersão em energia de raios X (EDS), como exibido na Figura 12. A partir dessa técnica qualitativa foi possível determinar a composição elementar dos materiais e verificar sua composição.

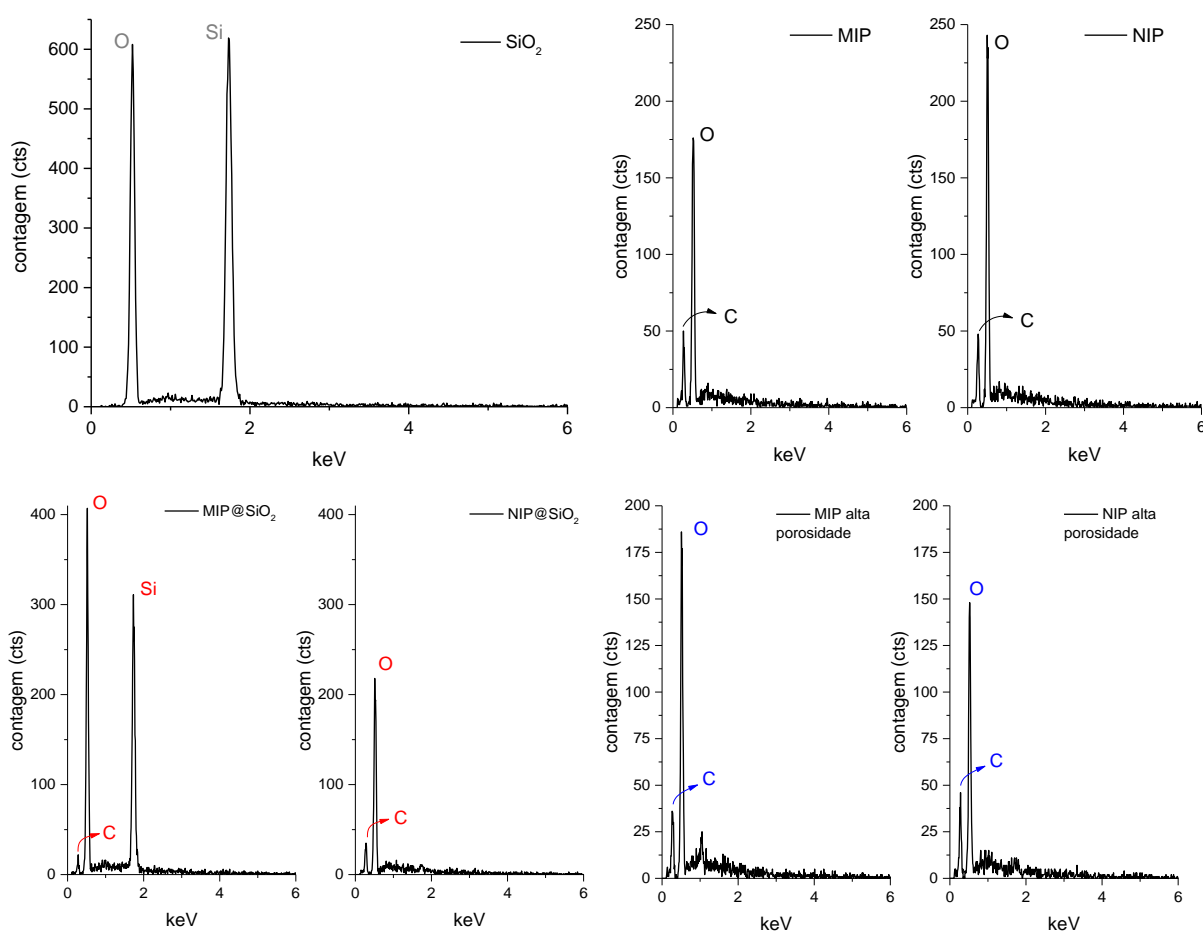


Figura 12 – Espectros de EDS para verificação e comparação dos elementos químicos presentes em todos os materiais sintetizados.

Fonte: autor do trabalho.

Para as nanopartículas de sílica são observados apenas os elementos Si e O; a modificação com o MPS responsável por inserir os grupos vinil não é observada porque trata-se apenas de uma funcionalização superficial, cuja concentração do modificador não é suficiente para ser detectada pela medida.

Todos os polímeros apresentaram C e O na sua estrutura, o que era esperado por condizer com a composição do monômero estrutural EGDMA; o qual é responsável pela formação da rede polimérica.

Entre o MIP e NIP convencional e de alta porosidade não são observadas diferenças significativas. No caso do MIP@SiO₂ observa-se a presença de Si no espectro; a qual pode ser ocasionada pela parte da amostra coletada para análise: possivelmente a camada de polímero que recobriu a nanopartícula era muito fina na região amostral analisada pelo microscópio.

Para confirmar a presença dos grupos vinil nas nanopartículas de SiO₂ e avaliar os diferentes MIP foram realizadas medidas de FTIR. As bandas são atribuídas na Figura 13 e Figura 14 a seguir e as atribuições encontram-se tabeladas (Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4) e detalhadas a seguir de cada espectro de infravermelho (IV).

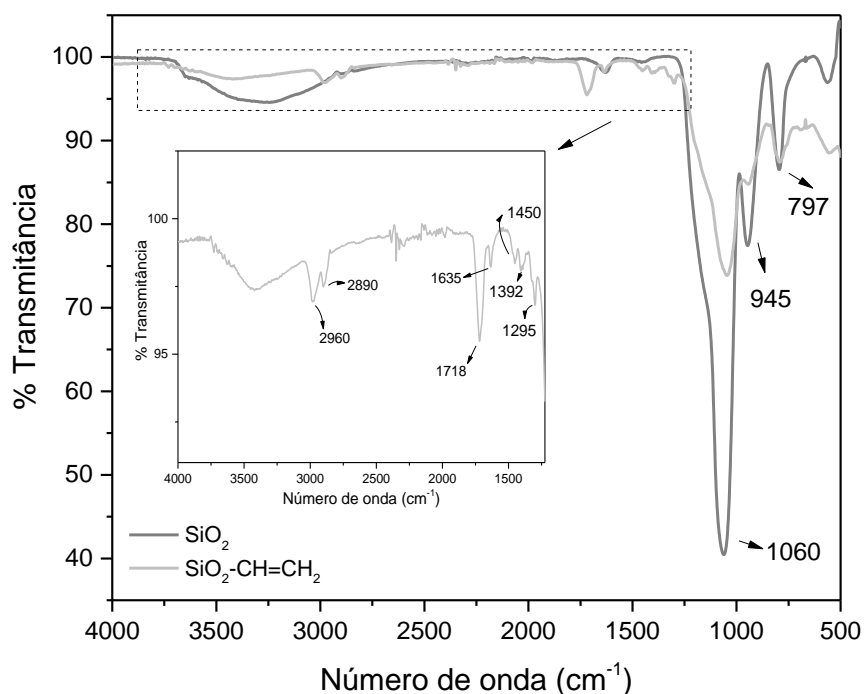


Figura 13 – Espectros na região do IV com designação das principais bandas para comparação entre as nanopartículas de sílica (SiO₂) e modificadas com grupo vinil (SiO₂-CH=CH₂). *Inset*: ampliação da região selecionada com atribuição das bandas das SiO₂-CH=CH₂ NP.

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 2 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 13 para as NP de SiO₂.

Banda (cm ⁻¹)	3285	1060	945	797
Atribuição	v OH	v _{assim} Si-O-Si	δ _{assim} Si-OH	v _{sim} Si-O-Si

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 3 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 13 para as NP de SiO₂-CH=CH₂.

Banda (cm ⁻¹)	2960	2890	1718	1635	1450	1392	1295
Atribuição	$\nu_{\text{assim}} \text{CH}_3$	$\nu_{\text{sim}} \text{CH}_3$	$\nu \text{C=O}$	$\nu \text{C=C}$	$\delta_{\text{assim}} \text{CH}_3$	$\delta_{\text{sim}} \text{CH}_3$	$\nu \text{C-O-C}$

Fonte: autor do trabalho.

As bandas foram atribuídas de acordo com o tipo de vibração: de estiramento (ou deformação axial), representada por ν ; ou por vibrações de dobramento (deformação angular), representada por δ . Também foi designado o modo de cada vibração: simétrico (sim) ou assimétrico (assim).

A Figura 13 exibe os espectros de IV para as nanopartículas de SiO₂, as modificadas com grupos vinil (SiO₂-CH=CH₂) e, ademais, o *inset* apresenta uma ampliação para melhor visualização das bandas na região de maior número de onda para as SiO₂-CH=CH₂ NP. É observada a banda de estiramento assimétrico em 1050 cm⁻¹ referente à ligação Si-O-Si que forma a NP e os grupos silanóis que apresentam bandas de dobramento em 955 e 790 cm⁻¹.

A modificação com MPS é observada, na região ampliada, pelo aparecimento de bandas características da estrutura química desse composto; como os grupos CH₃ com estiramentos e dobramentos simétricos e assimétricos, o estiramento referente ao grupo vinil em 1635 cm⁻¹ e a banda de maior intensidade que corresponde à carbonila em 1718 cm⁻¹.

A Figura 14 compara todos os espectros de IV para os diferentes MIP sintetizados. Conforme as atribuições na Tabela 4, todos os polímeros possuem a mesma composição do monômero estrutural EGDMA, cujas principais bandas são os estiramentos assimétricos e simétricos do grupo CH₃ (respectivamente em 2986 e 2885 cm⁻¹) e da carbonila em 1720 cm⁻¹.

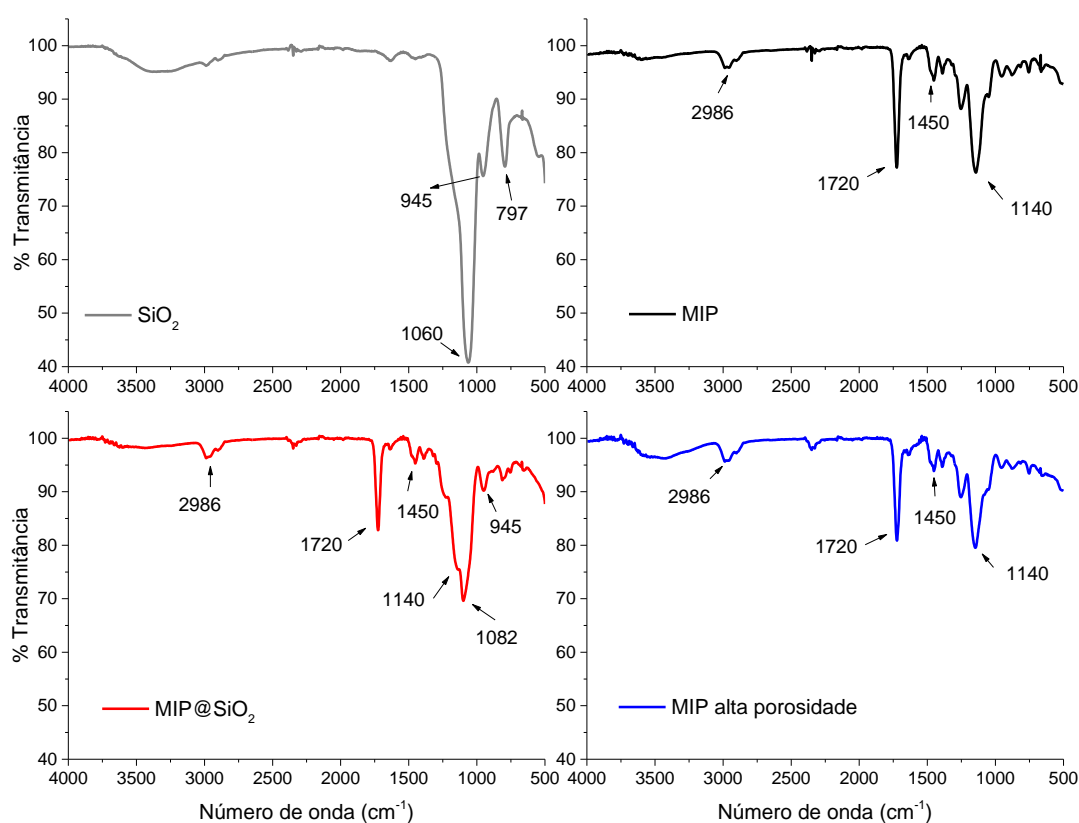


Figura 14 – Espectros na região do IV com designação das principais bandas para comparação entre as nanopartículas de sílica (SiO_2) e os diferentes polímeros impressos.

Fonte: autor do trabalho.

Tabela 4 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 14 referentes aos polímeros impressos.

Banda (cm^{-1})	2986	2885	1720	1450	1140
Atribuição	$\nu_{\text{assim}} \text{CH}_3$	$\nu_{\text{sim}} \text{CH}_3$	$\nu \text{C}=\text{O}$	δCH_2	$\nu \text{C}-\text{O}$

Fonte: autor do trabalho.

É interessante notar que para o MIP@SiO_2 há o surgimento de uma banda em 1082 cm^{-1} que não aparece no MIP convencional e no de alta porosidade. Ao comparar com o espectro de IV da sílica, verifica-se que essa banda corresponde à ligação Si-O-Si, indicando que o polímero foi ligado à superfície da NP. Essa banda pode ser observada uma vez que a camada de MIP que recobre o núcleo de SiO_2 é fina; e, deste modo, esse espectro de IV corrobora o resultado apresentado anteriormente no espectro de EDS para o MIP *core-shell*. Além disso, a ausência da banda de Si no MIP de alta porosidade indica que o núcleo foi removido com sucesso.

3.4.3 Otimização das condições cromatográficas

Após caracterizados, todos os polímeros tiveram seu desempenho avaliado frente à capacidade de religação com a tetraciclina, cuja quantificação foi monitorada por CLAE. Para tanto, o método de análise foi adaptado baseando-se em método reportado na literatura, (68) sendo analisadas diferentes composições e proporções da fase móvel (solução aquosa de H_3PO_4 0,1 % (v/v), MeOH e ACN) como descrito no procedimento experimental.

Após variação das condições experimentais comparando os diversos eluentes e concentrações do analito, ACN apresentou-se como melhor eluente orgânico uma vez que o pico da tetraciclina exibiu menor tempo de retenção (de 6 min em MeOH para 3,6 min em ACN), maior intensidade de sinal e maior simetria (fator de assimetria igual a 1,1), indicando a ausência de cauda ou alargamento frontal.

A Figura 15a exibe os cromatogramas de diferentes quantidades de eluente, sendo obtida como melhor condição de separação e quantificação fase móvel composta por solução aquosa de H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} com ACN na proporção 70:30 (v/v), a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} no modo isocrático; detecção utilizando comprimento de onda de 280 nm e volume de injeção de amostra de 10 μL .

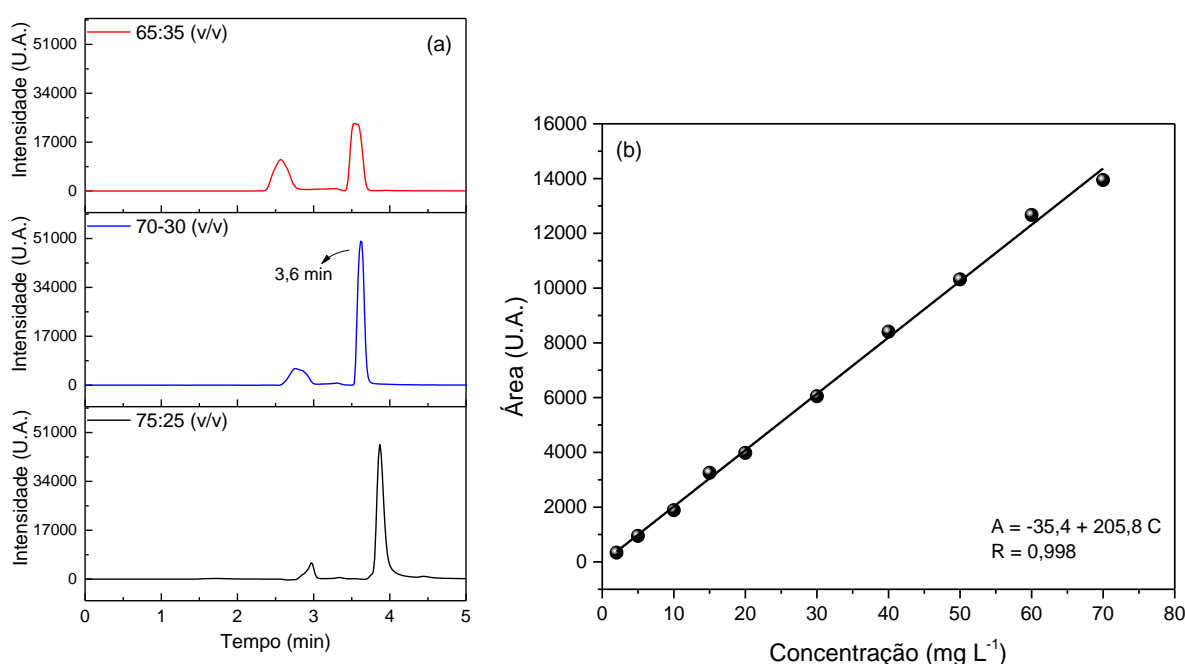


Figura 15 – (a) Avaliação da eluição de tetraciclina (100,0 mg L^{-1}) em diferentes proporções (v/v) de fase móvel composta por H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} : ACN; (b) curva analítica obtida após método otimizado para análise de solução padrão de tetraciclina 2,0 – 70,0 mg L^{-1} solubilizada em acetonitrila.

Fonte: autor do trabalho.

Curvas analíticas foram construídas para cada ensaio realizado. A Figura 15b exemplifica uma curva que apresenta linearidade; com coeficiente de correlação igual a 0,998 na faixa de concentrações de tetraciclina de $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $155 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para o método desenvolvido obteve-se LOD igual a $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e LOQ igual a $13 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.4.4 Avaliação da eficiência e otimização dos diferentes MIPs

Com o objetivo de maximizar a capacidade de retenção dos polímeros biomiméticos para a tetraciclina foram otimizadas diferentes condições como tempo de interação para atingir o equilíbrio (estudo cinético), tipo do solvente de ligação e massa de adsorvente. Em todas as etapas os sistemas foram mantidos sob agitação em temperatura ambiente e as quantificações dos sobrenadantes foram realizadas por CLAE.

3.4.4.1 Dosagem da massa de polímero e composição do solvente

Os estudos iniciais foram realizados com MIP e NIP convencionais e trataram da avaliação simultânea da quantidade de massa dos polímeros e do tipo de solvente para religação do analito.

Como exibido na Figura 16, em metanol e na mistura metanol:etanol 1:1 (v/v) a porcentagem de retenção foi muito baixa para ambos os casos: menor do que 5 e 10% de analito retido, respectivamente. Em acetonitrila e etanol foram obtidas as maiores porcentagens de retenção; no entanto, independente da massa de MIP aumentar, a quantidade de analito retida foi praticamente a mesma. Além disso, em nenhum dos casos houve boa diferenciação entre MIP e NIP.

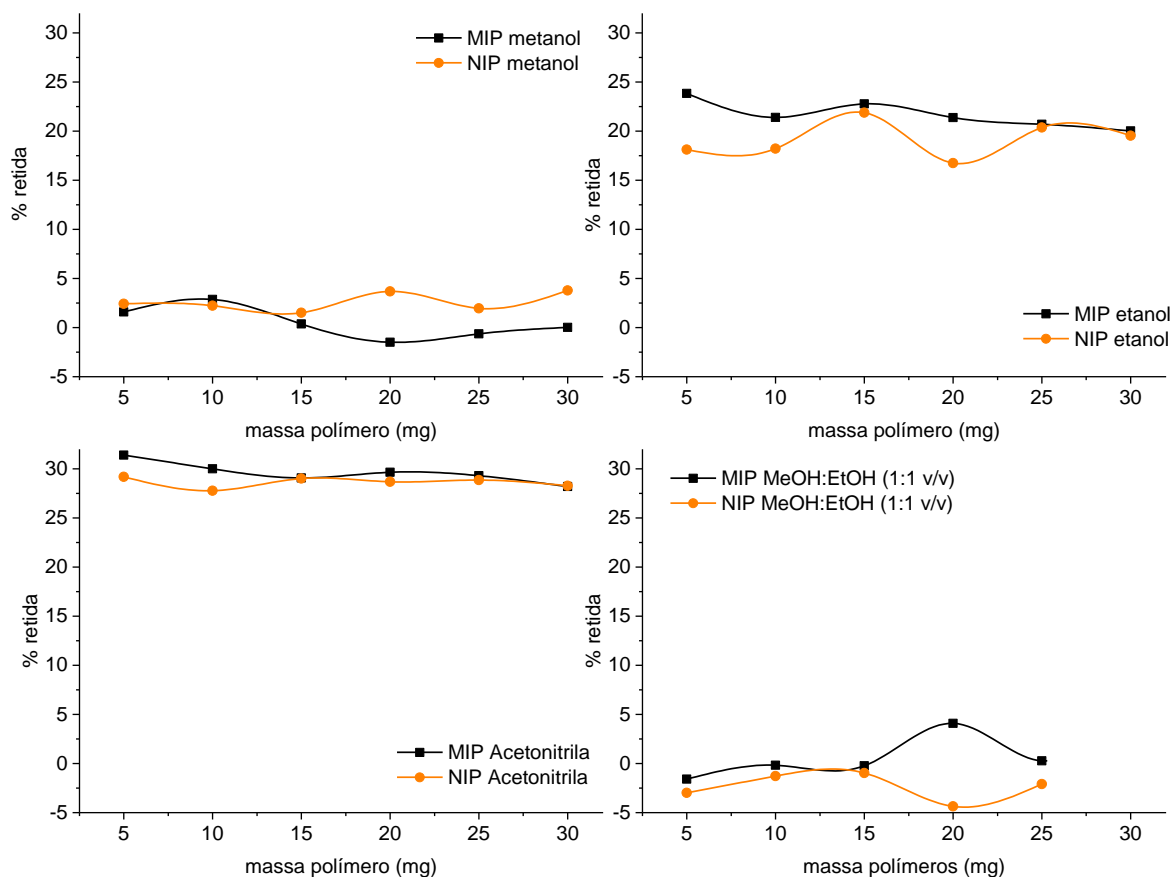


Figura 16 – Avaliação concomitante da dosagem de massa dos polímeros (5,0 até 30,0 mg) e do tipo de solvente para análise da tetraciclina ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Fonte: autor do trabalho.

Uma vez que em ACN houve maior porcentagem de retenção, com o intuito de melhorar esse valor e tentar encontrar uma capacidade de diferenciação entre MIP e NIP, adicionou-se diferentes proporções de água ultrapurificada nessa fase orgânica (Figura 17).

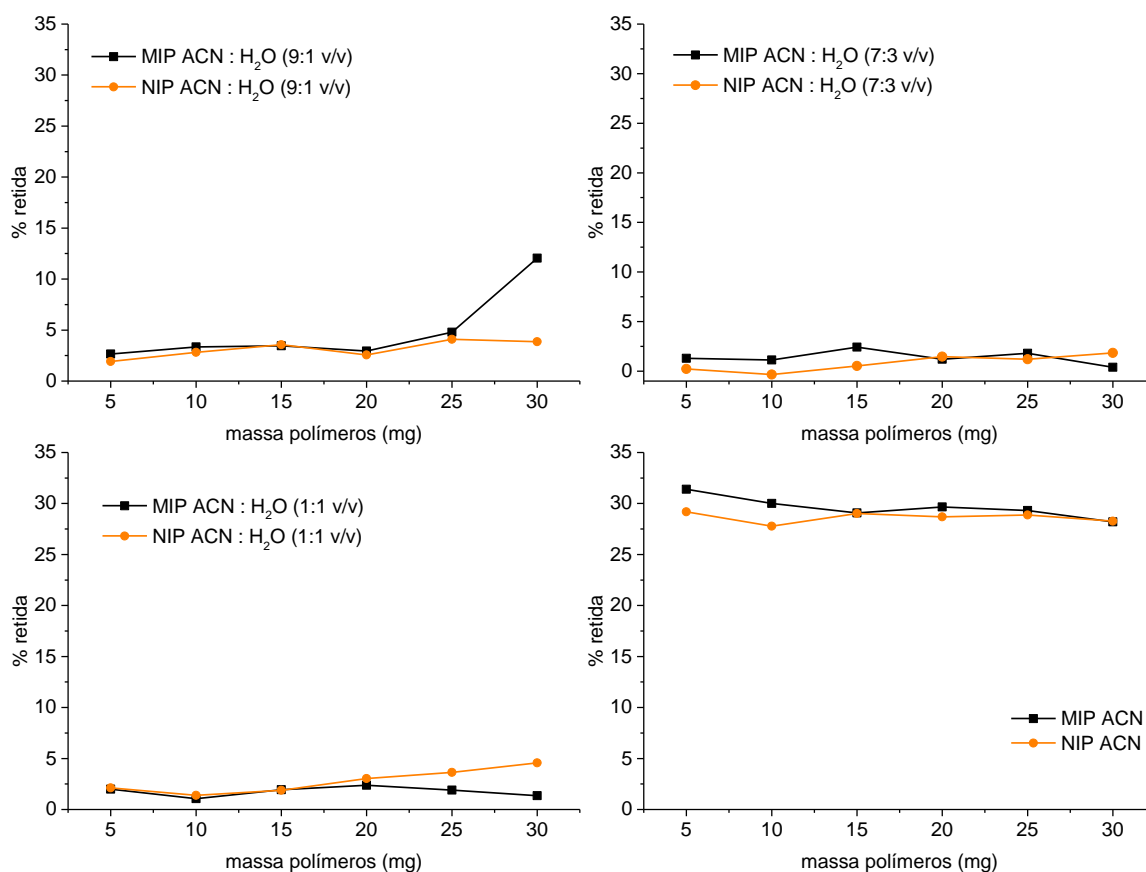


Figura 17 – Avaliação concomitante da dosagem de massa dos polímeros (5,0 até 30,0 mg) e do solvente acetonitrila (pura e em misturas com água ultrapura) para análise da tetraciclina (20,0 mg L⁻¹).

Fonte: autor do trabalho.

Em todos os casos que se adicionou água na fase orgânica ACN, independente da proporção, os resultados de retenção foram inferiores quando comparados com ACN pura. Além disso, mesmo na presença de meio aquoso continuou não ocorrendo diferenciação entre MIP e NIP e nem mudança na porcentagem retida independente da massa de polímero.

Após esses resultados, uma possibilidade observada era de que a concentração de tetraciclina pudesse estar muito elevada e saturando os sítios dos polímeros, o que pode explicar a ausência de um crescimento na porcentagem de retenção com aumento da quantidade de massa de polímero e diferenciação entre MIP e NIP. Assim, um novo estudo foi realizado utilizando 4,0 mg L⁻¹ de tetraciclina ao invés de 20,0 mg L⁻¹; conforme exibido na Figura 18.

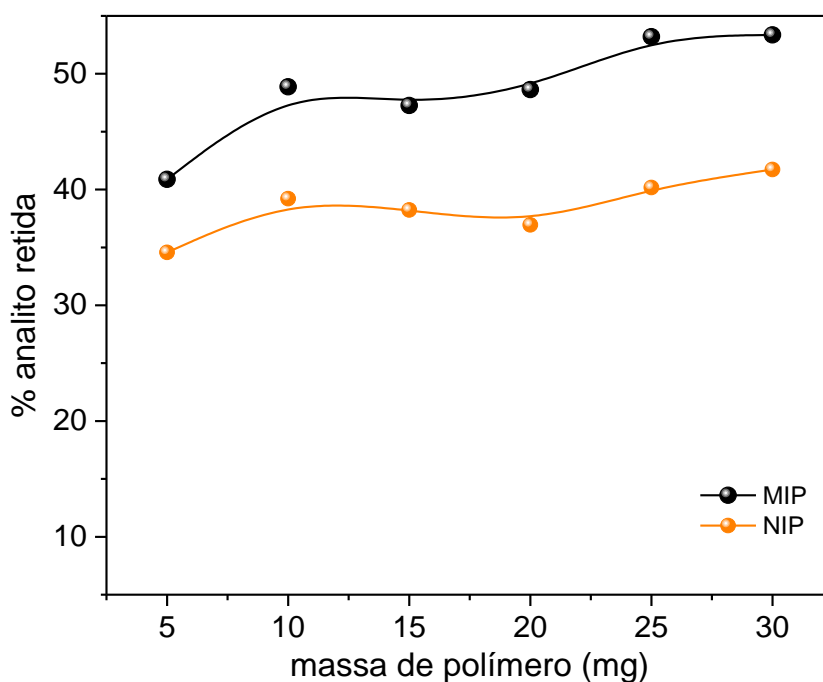


Figura 18 – Dosagem de massa de MIP e NIP no intervalo de 5,0 até 30,0 mg em contato com tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$ solubilizada em acetonitrila).

Fonte: autor do trabalho.

É possível observar que em menor concentração de tetraciclina ocorreu um aumento na porcentagem retida pelos polímeros, que aumentou em aproximadamente 15% no intervalo de massa analisado e houve diferença de retenção que se manteve constante entre MIP e NIP; quando comparados com a análise em acetonitrila exibida na Figura 16.

Uma vez esgotadas as possibilidades de solventes de ligação (além das misturas) e a inviabilidade experimental do uso de grandes quantidades de massa do polímero, para dar sequência aos estudos optou-se por trabalhar com 5,0 mg de MIP/NIP; na qual há uma boa porcentagem de retenção com diferenciação entre os materiais. Para comparação entre o efeito das diferenças estruturais, as mesmas condições de análise foram padronizadas para o MIP com núcleo de SiO_2 e o de alta porosidade.

3.4.4.2 Estudo de adsorção em função do tempo

Com os parâmetros de massa e solvente otimizados, a seguir foi realizado o estudo de adsorção em função do tempo, avaliando o tempo de equilíbrio entre analito e polímeros. Tanto para esse estudo quanto para as isotermas de adsorção (último

experimento de adsorção a ser realizado), um parâmetro importante que mostra os resultados de eficiência é denominado de Q ; o qual fornece a quantidade de tetraciclina (em mg) retida por quantidade de polímero (em g). O valor de Q pode ser obtido a partir da Equação 1:

$$Q = \frac{(C_i - C_e)V}{m} \quad (1)$$

na qual C_i é a concentração inicial do analito (mg L^{-1}); C_e a concentração remanescente no equilíbrio (mg L^{-1}); V é o volume de solução adicionada (L) e m representa a quantidade (em gramas) de material adsorvente (polímeros biomiméticos).

Deste modo, como mostra a Figura 19, o MIP de alta porosidade apresentou melhores valores de Q , o qual aumentou quase linearmente até atingir o platô no equilíbrio em 90 min. Esperava-se esse comportamento visto que esse material possui as propriedade de melhor cinética de ligação; uma vez que após a remoção do núcleo as cavidades seletivas ficam mais expostas e permitem que o analito se difunda até elas por todos os ângulos. (72)

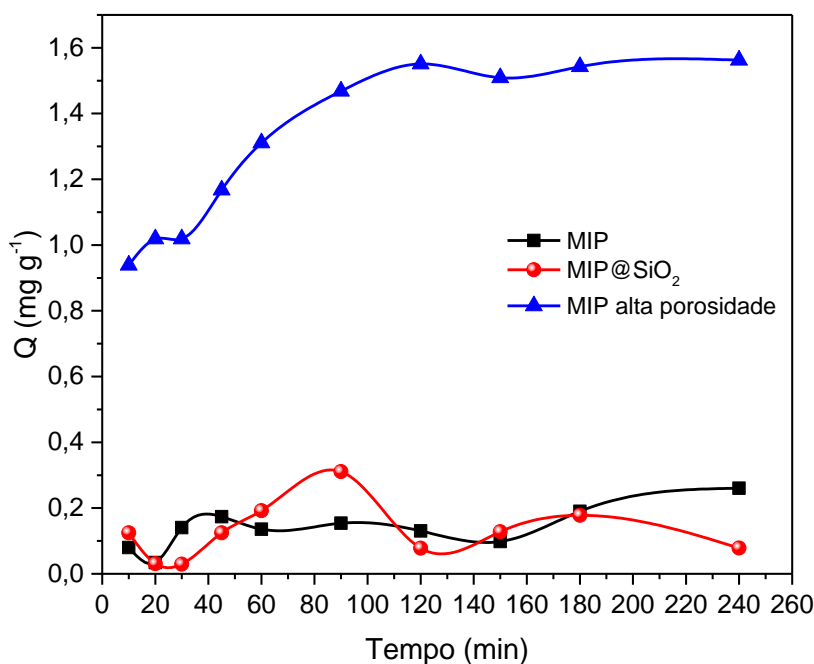


Figura 19 – Estudo de adsorção em função do tempo de equilíbrio entre os diferentes polímeros (massa de 5,0 mg) e tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$ em acetonitrila); com intervalo de tempo de 10 min até 240 min.

Fonte: autor do trabalho.

Já para o MIP convencional e o MIP@SiO₂ não se obtiveram resultados satisfatórios, uma vez que para o MIP praticamente não há diferença no valor de Q e

para o MIP@SiO₂ os valores de retenção estão muito irregulares e baixos. Uma possibilidade para isso é a concentração de tetraciclina não estar adequada para esses materiais, não sendo visualizada ligação significativa independente do tempo avaliado. Possivelmente esses materiais, devido à sua estrutura, respondam melhor a concentrações superiores de analito. Assim, para confirmar essa hipótese, seria necessário otimizar separadamente cada parâmetro para cada tipo de MIP.

Embora o MIP e MIP@SiO₂ não apresentarem resultados satisfatórios de Q, para comparação do efeito da estrutura polimérica na capacidade cinética e, uma vez que o MIP de alta porosidade para tetraciclina foi desenvolvido com ineditismo, foram obtidos os parâmetros cinéticos.

Os ajustes lineares de cinética de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem são dados pelas Equações 2 e 3, (36,90) respectivamente; e os parâmetros calculados a partir do gráfico de ln (Q_e - Q_t) em função de t e t/Q_t em função de t:

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (2)$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{t}{Q_e} \quad (3)$$

Os resultados obtidos foram resumidos na Tabela 5 a seguir, com destaque nos melhores ajustes indicados pelo coeficiente de correlação:

Tabela 5 – Parâmetros dos modelos cinéticos da ligação da tetraciclina nos MIPs avaliados.

Material	Cinética	Equação	k	Q _e	R ²
MIP	Pseudo-1 ^a	y = -4,68 + 0,0105x	0,0105	0,010	0,788
	Pseudo-2 ^a	y = -53,9 + 7,79x	1,32	0,128	0,964
MIP@SiO ₂	Pseudo-1 ^a	y = -0,318 - 0,00937x	0,00937	0,727	0,988
	Pseudo-2 ^a	y = 2571,3 - 8,86x	0,0310	0,112	0,888
MIP alta porosidade	Pseudo-1 ^a	y = -0,0286 - 0,0240x	0,0240	0,972	0,939
	Pseudo-2 ^a	y = 11,9 + 0,566x	0,0268	1,76	0,994

Pseudo-1^a: pseudo-primeira ordem; Pseudo-2^a: pseudo-segunda ordem; k = constante da taxa de adsorção (em min⁻¹ para pseudo-primeira ordem e g mg⁻¹ min⁻¹ para pseudo-segunda ordem); Q_e = quantidade adsorvida por grama de material no equilíbrio (em mg g⁻¹).

Fonte: autor do trabalho.

Pelos resultados exibidos na Tabela 5 o modelo de pseudo-primeira ordem se mostrou adequado para o MIP@SiO₂, já para o MIP convencional e o MIP de alta porosidade o melhor ajuste se deu para o modelo de pseudo-segunda ordem. Para o MIP@SiO₂ o modelo de pseudo-primeira ordem sugere que a adsorção externa possui

papel predominante. Para os dois MIPs sem núcleo sólido o processo de adsorção é influenciado pelas interações químicas da etapa limitante na velocidade. (91,92)

Ademais, comparando as constantes de velocidade para o MIP e MIP de alta porosidade (1,32 e 0,027 g mg⁻¹ min⁻¹, respectivamente) é possível observar que elas coincidem com o perfil experimental obtido: MIP atingiu o equilíbrio em tempo menor (30 min) do que MIP de alta porosidade (90 min). No entanto, a adsorção não foi a ideal para o material convencional, pois a quantidade retida foi um valor de aproximadamente doze vezes menor do que o material de alta porosidade.

As cinéticas de adsorção geralmente são controladas por diferentes mecanismos, sendo o mais comum a difusão. Considerando um processo difusional de adsorção intrapartícula, os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens não podem explicar o mecanismo de difusão e, assim, são aplicados outros modelos.

De acordo com modelo proposto por Webber e Morris, se a difusão intrapartícula é o fator determinante da velocidade, a remoção do analito da solução para o adsorvente varia com a raiz quadrada do tempo (93,94):

$$Q_t = K_d t^{0,5} + C \quad (4)$$

sendo Q_t é quantidade de analito adsorvida na fase sólida (mg g⁻¹) em um tempo t (min); K_d é o coeficiente de difusão intrapartícula (mg g⁻¹ min^{-0,5}) e C é uma constante relacionada com a resistência à difusão (mg g⁻¹).

Segundo o modelo proposto por Boyd, (95) para determinar se a difusão no interior dos poros (intrapartícula) ou a difusão externa (intrafilme) é a etapa limitante do processo de adsorção, o fenômeno é explicado pela Equação 5 a seguir:

$$F = 1 - \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^2}\right) \exp(-\pi^2 Bt) \quad (5)$$

na qual Q_e é a quantidade de analito adsorvido em um tempo infinito (mg g⁻¹); Q_t é a quantidade de analito adsorvido em um tempo t e Bt é uma função matemática de F . No caso, F pode ser calculado (Equação 6) a partir de:

$$F = \frac{Q_t}{Q_e} \quad (6)$$

Como Bt (Equações 7 e 8) é uma função de F , ele pode ser obtido substituindo a Equação (6) em (5):

$$\text{Para } F > 0,85, Bt = -0,4977 - \ln(1 - F) \quad (7)$$

$$\text{Para } F < 0,85, Bt = \left(\sqrt{\pi} - \sqrt{\pi - \left(\frac{\pi^2 F}{3}\right)} \right)^2 \quad (8)$$

Para estudar o mecanismo de adsorção, como MIP e MIP@SiO₂ não apresentaram um perfil regular de adsorção, os modelos anteriores foram aplicados sem sucesso, cujos dados não geraram valores ajustados (observando R²). Desse modo, a seguir foi apresentado apenas a avaliação do processo adsorptivo no MIP de alta porosidade.

Assim, pelo modelo de Webber-Morris foi possível determinar se o processo de difusão intrapartícula é um fator determinante da velocidade a partir de Q em função de t^{0,5} (Figura 20a). O valor de K_d pode ser obtido da inclinação e o valor de C pela intersecção da curva. Os valores de C dão uma ideia da espessura da camada limite, e, portanto, quanto maior for o valor de C maior será o efeito da camada limite. (93,94)

Já pelo modelo de Boyd, a partir do gráfico de Bt em função de t (Figura 20b) foi possível determinar quem limita a adsorção: processo de difusão no filme gerado na superfície do material ou difusão intraporo. De acordo com o gráfico gerado, se for uma reta que atravessa a origem, é possível concluir que o processo de difusão intraporo é a etapa limitante do processo de adsorção para a faixa de tempo avaliada. (93,94)

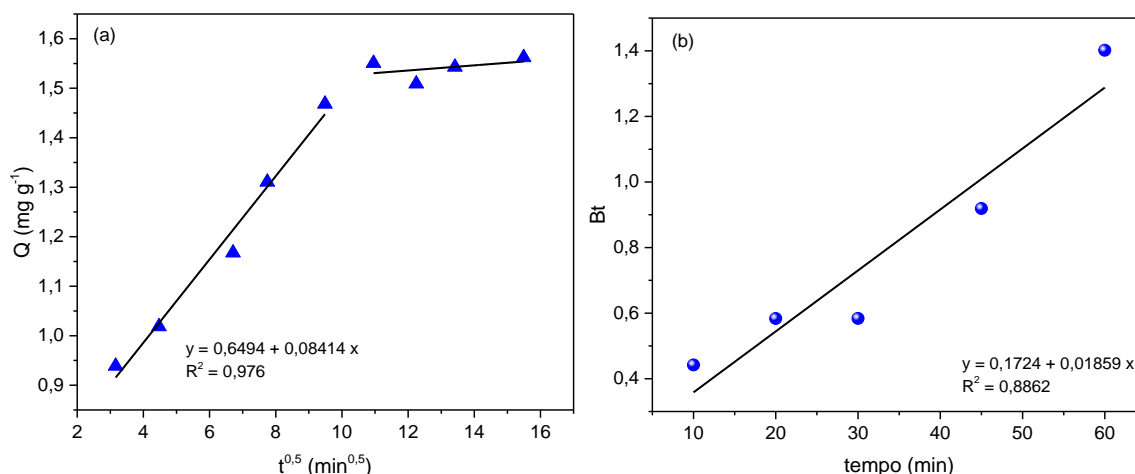


Figura 20 – Cinética de adsorção do MIP de alta porosidade pela tetraciclina segundo os modelos de (a) Weber-Morris e (b) Boyd.

Fonte: autor do trabalho.

Pelo modelo de Weber-Morris (Figura 20a) obteve-se $K_d = 0,0841 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-0,5}$ e $C = 0,649 \text{ mg g}^{-1}$. O perfil do modelo obtido pode ser dividido em duas etapas: um aumento acentuado seguido por um platô. A etapa inicial está relacionada com a difusão intrapartícula, que estimula a transferência de massa da tetraciclina da solução para a superfície interna do MIP. A segunda etapa (platô) é atribuída ao

estado de equilíbrio final.(91,96) Como o valor de C é diferente de zero, indicando que a reta não passa pela origem, pode-se concluir que há influência de outros processos de adsorção; podendo ser uma difusão intrafilme controlada pelo transporte externo, cuja espessura do filme é dada por C.

Os resultados obtidos pelo modelo acima são corroborados pelo modelo de Boyd (Figura 20b). Os dados experimentais nesse caso não se comportaram linearmente e não passam pela origem, indicando que o processo de difusão no filme gerado na superfície do material pode ser um dos mecanismos de adsorção.

3.4.4.3 Comparação da adsorção entre MIPs e NIPs

Embora os resultados tenham sido até então satisfatórios, comprovando que o MIP de alta porosidade apresenta resultados de adsorção superiores em relação ao MIP e MIP@SiO₂; uma adversidade encontrada foi a elevada adsorção apresentada pelos polímeros controle.

Como observado na Figura 21 a seguir, no estudo de adsorção em função do tempo os valores de adsorção do analito entre os polímeros biomiméticos e os controles foram muito próximos para o MIP e o MIP de alta porosidade ou superiores pelos controles como no caso do MIP@SiO₂.

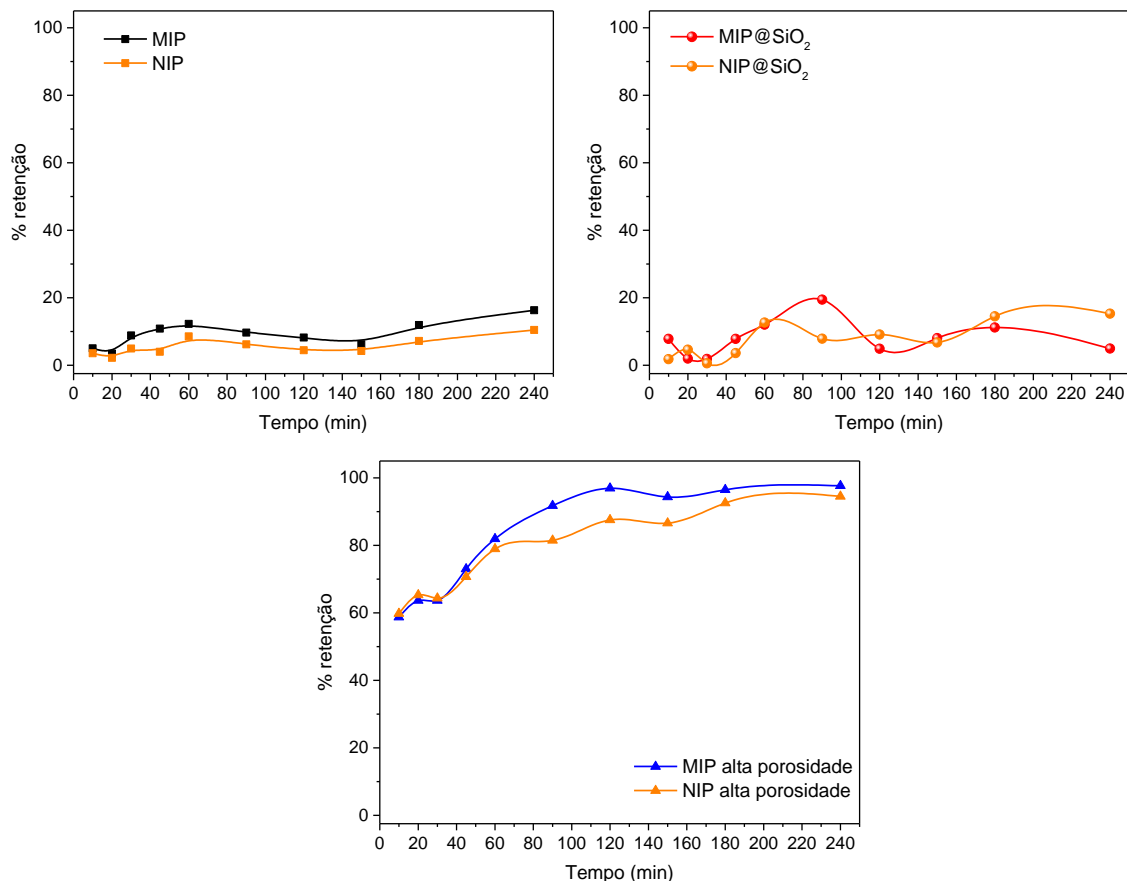


Figura 21 – Estudo cinético do tempo de equilíbrio entre os diferentes polímeros e seus respectivos controles (massa de 5,0 mg) e tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$ em acetonitrila); com intervalo de tempo de 10 min até 240 min.

Fonte: autor do trabalho.

Alguns estudos sugerem que ao otimizar a composição do MIP, o polímero impresso com a maior afinidade e seletividade em relação ao seu analito geralmente possui um NIP correspondente que também se liga fortemente ao analito. (97,98)

Além de considerar que as propriedades de ligação do MIP pelo analito (e do NIP também) são características da composição dos reagentes e do método de preparo, os principais fatores que influenciam as ligações incluem o tipo de monômero funcional e a razão monômero: analito; além do solvente porogênico. (98)

De acordo com Ansell, (98) para MIPs preparados por meio de impressão não covalente nas quais os complexo analito-monômero possui principalmente ligação de hidrogênio (MIPs que utilizam ácidos como monômero funcional, por exemplo), um solvente orgânico apolar é comumente aplicado como meio para síntese, e a religação mais forte e seletiva também é frequentemente observada em um solvente orgânico apolar.

No caso deste trabalho não foi possível utilizar solventes apolares porque estes tornam a quantificação da tetraciclina inviável pelo método cromatográfico, uma vez que a instrumentação da CLAE não permite a injeção de solventes orgânicos apolares como clorofórmio, por exemplo.

Os solventes porogênicos avaliados foram os polares próticos (metanol, etanol e água) e apróticos (acetonitrila), bem como misturas desses solventes (Figura 16 e Figura 17). Em nenhum dos casos a porcentagem adsorvida foi satisfatória e com diferenciação significativa entre MIP e NIP. A adsorção do MIP em meio aquoso sofreu uma forte diminuição comparada aos solventes orgânicos puros.

Em condições aquosas as interações hidrofóbicas se tornam consideráveis, o que para MIPs feitos em solventes orgânicos utilizando EDGMA como agente reticulante, como é o caso do MIP aqui desenvolvido para tetraciclina, levam a adsorção não específica significativa do analito, além de alterar a solubilidade do analito.

Uma vez que as possibilidades de trabalho com o solvente de ligação se esgotaram e, com o intuito de melhorar a diferenciação entre polímero biomimético e controle, uma nova síntese com diferentes proporções dos reagentes foi realizada.

A nova proporção (em mmol) avaliada de analito: monômero funcional: monômero estrutural foi respectivamente de 1: 33: 44; aumentando a proporção entre monômero funcional e estrutural comparados com a síntese inicial (de 1: 12: 120).

Para verificar a eficiência da síntese, o mesmo procedimento de dosagem da massa e avaliação do solvente foi realizado, como exibe a Figura 22.

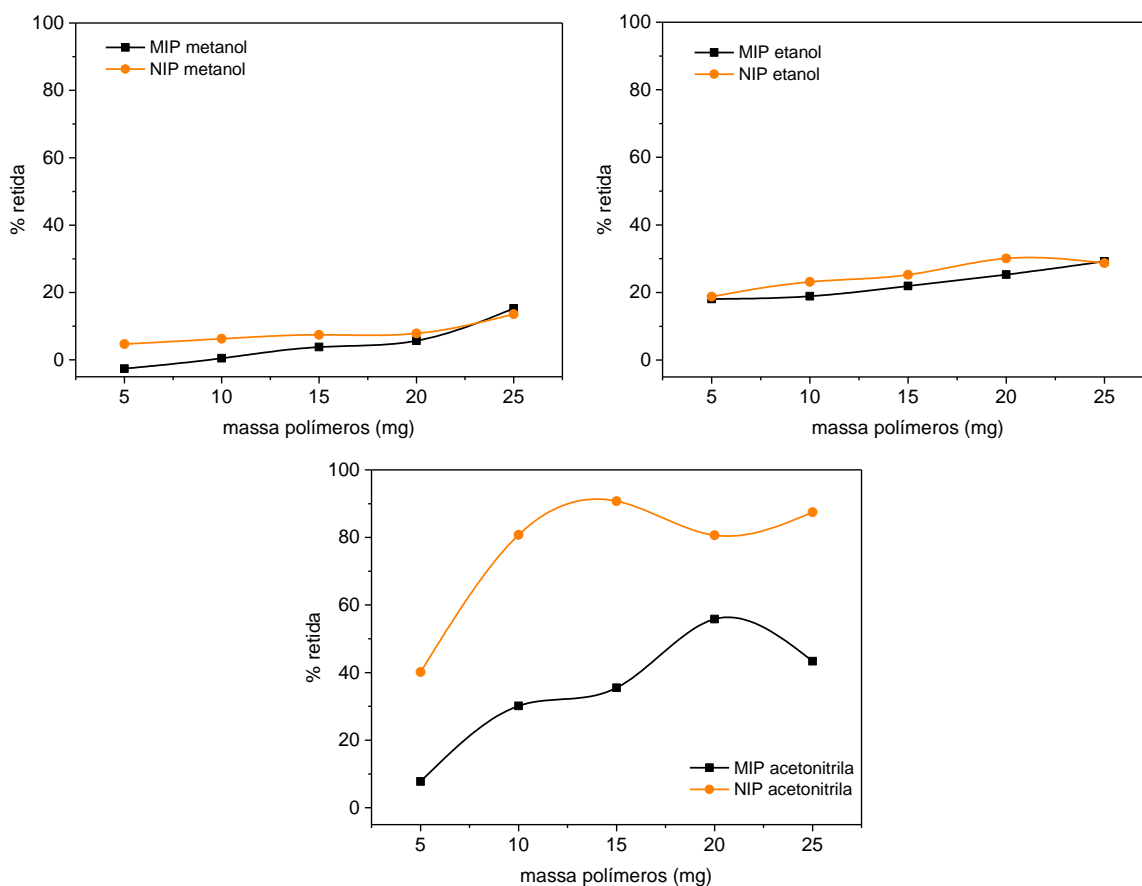


Figura 22 – Avaliação concomitante da dosagem de massa dos polímeros (5,0 até 25,0 mg) e dos solventes (metanol, etanol e acetonitrila) para análise da tetraciclina ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Fonte: autor do trabalho.

Os resultados de adsorção em todos os solventes para a nova síntese foram inferiores em relação aos obtidos até então (como exibido na Figura 16). Além disso, na nova síntese as ligações inespecíficas foram superiores em todos os casos e, inclusive em ACN, o NIP apresentou adsorção de 2,5 a 3 vezes superior ao MIP.

Como nessa nova síntese a proporção de monômero funcional em relação ao analito foi duas vezes maior do que na síntese inicial, o excesso de grupos funcionais livres do monômero contribuiu para as ligações inespecíficas. Deste modo, optou-se por seguir os experimentos com a proporção da síntese inicial (1:12:120); conforme descrito no procedimento do item 3.3.3.

Avaliando a proporção da síntese inicial, o monômero estrutural está dez vezes maior do que o monômero funcional, gerando uma área superficial polimérica muito maior quando comparada com a área de alta afinidade dos sítios seletivos (a qual é baseada na quantidade do monômero funcional). Isso contribui para o maior número de ligações inespecíficas que vão ocorrer na superfície do polímero em áreas de baixa

afinidade, (99) o que explica também a alta capacidade de adsorção apresentada pelo MIP desenvolvido para tetraciclina.

Nessa síntese, embora MIP e NIP (tradicional, com núcleo e alta porosidade) tenham apresentado porcentagem de retenção semelhantes (baixa diferenciação), os parâmetros cinéticos foram satisfatórios. Além disso, a quantidade de analito retida (Q) variou conforme a estrutura do polímero foi sendo modificada.

3.4.4.4 Isotermas de adsorção

Após o estudo de adsorção em função do tempo, avaliou-se a capacidade de adsorção dos materiais por meio da construção de isotermas de adsorção. Os parâmetros das equações dos modelos de isotermas podem fornecer algumas informações sobre o mecanismo de adsorção e as propriedades de superfície e afinidade do adsorvente.

A isoterma de Langmuir é a isoterma de adsorção mais aplicada e prediz uma capacidade constante de adsorção em monocamada, enquanto a isoterma de Freundlich é um modelo empírico para adsorção não ideal e reversível em superfícies heterogêneas, bem como não restrita a formação de monocamadas. A isoterma de Langmuir-Freundlich incorpora características de ambos os métodos. Em baixas concentrações, essa isoterma é reduzida à expressão da isoterma de Freundlich e em concentrações mais altas seu comportamento prediz adsorção na monocamada segundo Langmuir. (100)

Para o ensaio, foram preparadas diversas concentrações de tetraciclina e avaliadas com as condições de massa, tempo e solvente previamente otimizadas, conforme exibido pela Figura 23.

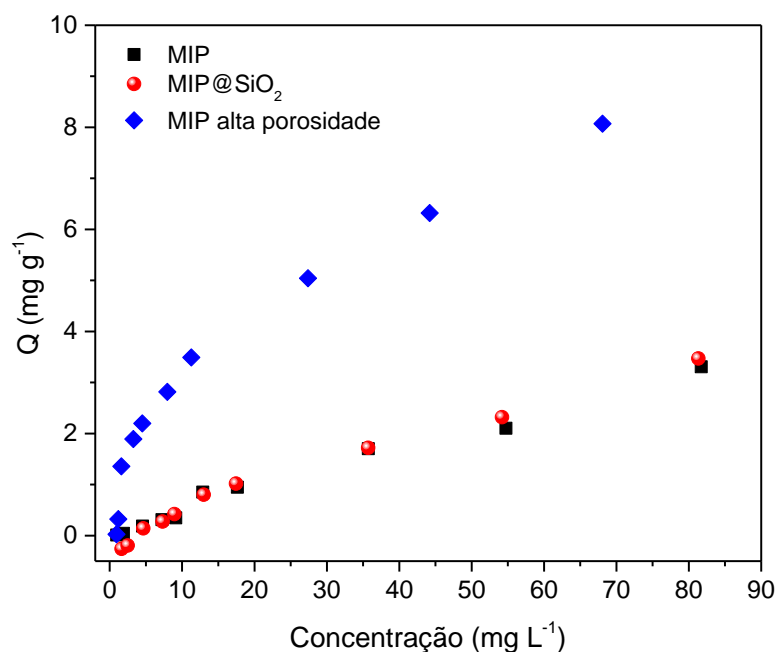


Figura 23 – Isoterma de adsorção para tetraciclina (de 1,0 até 90,0 mg L⁻¹ em acetonitrila) em contato com os polímeros (5,0 mg) com tempo de interação de 90 minutos.

Fonte: autor do trabalho.

As isotermas de adsorção experimentais (Figura 23) foram ajustadas pelos modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich; cujas equações e parâmetros obtidos são exibidos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros das isotermas de adsorção dos MIPs para tetraciclina (ajuste até 60,0 mg L⁻¹).

Modelo	Equação	Material	K	Q _m	β	R _L	R ²
Langmuir	$Q_e = \frac{Q_m K C}{1 + K C}$	MIP	0,0179	4,26	-	0,929	0,922
		MIP@SiO ₂	0,0124	5,70	-	0,933	0,988
		MIP alta porosidade	0,196	5,48	-	0,482	0,991
Freundlich	$Q_e = K C^\beta$	MIP	0,124	-	0,728	-	0,978
		MIP@SiO ₂	0,108	-	0,778	-	0,995
		MIP alta porosidade	1,54	-	0,314	-	0,981
Langmuir-Freundlich	$Q_e = \frac{Q_m K C^\beta}{1 + K C^\beta}$	MIP	0,00587	2,65	1,61	0,985	0,988
		MIP@SiO ₂	0,00268	2,21	0,963	0,994	0,988
		MIP alta porosidade	0,142	5,57	1,05	0,558	0,885

K = constante de afinidade analito-MIP (em L mg⁻¹); Q_m = capacidade máxima de adsorção do analito pelo MIP (em mg g⁻¹); β = heterogeneidade dos sítios de ligação; R_L = parâmetro de equilíbrio.

Fonte: autor do trabalho.

Diferente dos outros parâmetros exibidos na Tabela 6 que são obtidos diretamente da equação de cada modelo, um fator importante das isotermas de Langmuir é o fator de separação ou parâmetro de equilíbrio (R_L). O valor dado por R_L exhibe o grau de desenvolvimento da adsorção, indicando se o processo adsorptivo será favorável ou desfavorável. No caso, esse parâmetro é obtido conforme exhibe a Equação 9:

$$R_L = \frac{1}{1 + (KQ_m)} \quad (9)$$

a partir da qual infere-se que a adsorção pode ser: desfavorável ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorável ($R_L < 1$) ou irreversível ($R_L = 0$). Assim, se o valor é menor que 1 a adsorção é favorável, mas quanto mais esse valor se aproximar de zero, a adsorção se torna tão favorecida pelo sistema que a interação de contato entre analito e adsorvente se torna irreversível. (101)

Pelos dados exibidos é possível observar que em todos os casos, até mesmo nos quais não houve os melhores ajustes ($R^2 < 0,99$) o parâmetro de equilíbrio R_L foi menor que 1, indicando que a adsorção dos MIPs pela tetraciclina é favorável. Assim, pode-se concluir que a tetraciclina possui maior afinidade com os polímeros do que com a fase líquida. Ademais, considerando MIP e MIP oco, é possível notar que o valor de R_L para o MIP oco é duas vezes menor, indicando que a interação entre tetraciclina e MIP oco é mais favorável (e forte) do que para com o MIP tradicional.

Conforme exibido na Tabela 6, pelos valores destacados dos coeficientes R^2 : MIP convencional se ajustou melhor ao modelo de Langmuir-Freundlich, MIP@SiO₂ ao modelo de Freundlich e MIP de alta porosidade ao modelo de Langmuir.

É interessante notar que a carga máxima de adsorção pelos polímeros (Q_m) calculada - 2,6 mg g⁻¹ para o MIP e 5,5 mg g⁻¹ para MIP de alta porosidade - está relativamente próxima dos valores experimentais obtidos: 2,1 mg g⁻¹ para o MIP e 6,0 mg g⁻¹ para MIP de alta porosidade; indicando correlação dos ajustes teóricos com os valores experimentais.

Para o MIP@SiO₂, cujo melhor ajuste foi Freundlich, a constante β (0,78) indica que os sítios de ligação são homogêneos; uma vez que quanto mais próximo de zero for a constante, mais heterogênea é a superfície. Além disso, o processo de adsorção também é favorável para esse polímero; sendo $1/\beta = 1,3$ e considerando a partir do ajuste que se $0 < 1/\beta < 10$ o processo é favorável. (102)

Considerando a constante de afinidade K para cada modelo ajustado, o MIP de alta porosidade apresentou maior valor de constante ($0,20 \text{ L mg}^{-1}$), o que reflete diretamente nos valores superiores de adsorção obtidos por esse material quando comparado com os outros dois polímeros.

Portanto, com intuito de verificar a influência da adsorção em ligações não-específicas, foram realizados ensaios de seletividade e interferência.

3.4.5 Seletividade e interferência

A Figura 24 exhibe a estrutura química das moléculas utilizadas nos ensaios de interferência e seletividade: antibióticos da mesma classe da tetraciclina (doxiciclina e minociclina), antibióticos de outras classes (norfloxacina e penicilina G) e um anti-inflamatório (diclofenaco).

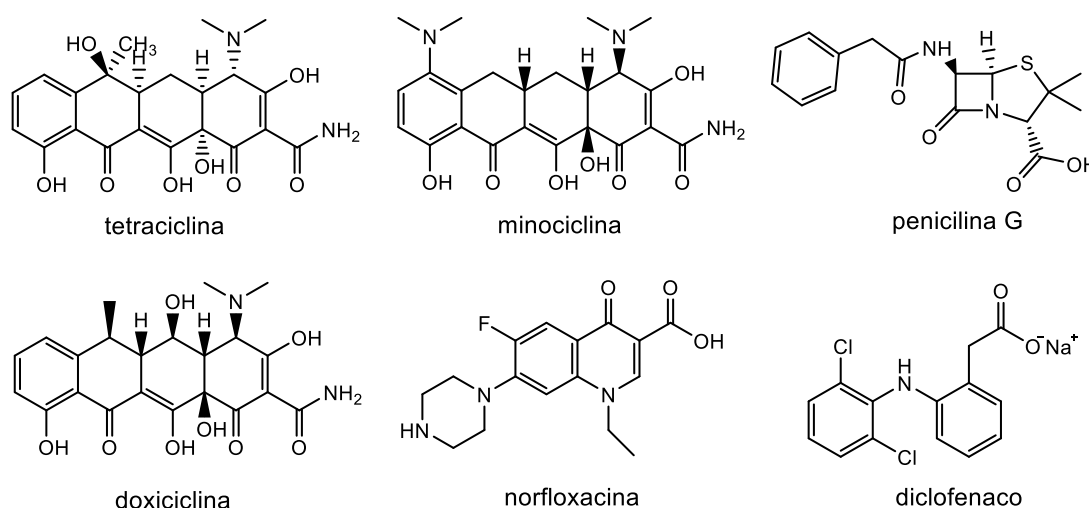


Figura 24 – Fórmula estrutural das moléculas utilizadas no ensaio de seletividade e interferência.

Fonte: autor do trabalho.

No ensaio de seletividade cada polímero foi colocado em contato com soluções de cada molécula avaliada (cada solução contendo somente um composto); enquanto no ensaio de interferência, para avaliar a preferência de ligação dos polímeros pela tetraciclina na presença de outros compostos, os materiais foram colocados em contatos com misturas de tetraciclina e dos outros compostos (cada mistura foi composta por tetraciclina e mais uma molécula avaliada; não sendo avaliada uma mistura geral do analito com todos os interferentes). Cada molécula foi quantificada e

separada, no caso do ensaio de interferência, por CLAE com métodos previamente otimizados.

Por meio dos ensaios de seletividade e interferência (ou ensaio competitivo), ao comparar MIPs e NIPs, foi possível verificar a eficiência da ligação dos MIPs para tetraciclina (comparando a adsorção do analito e de outras moléculas) e ao mesmo tempo verificar a eficiência das cavidades seletivas frente às ligações inespecíficas.

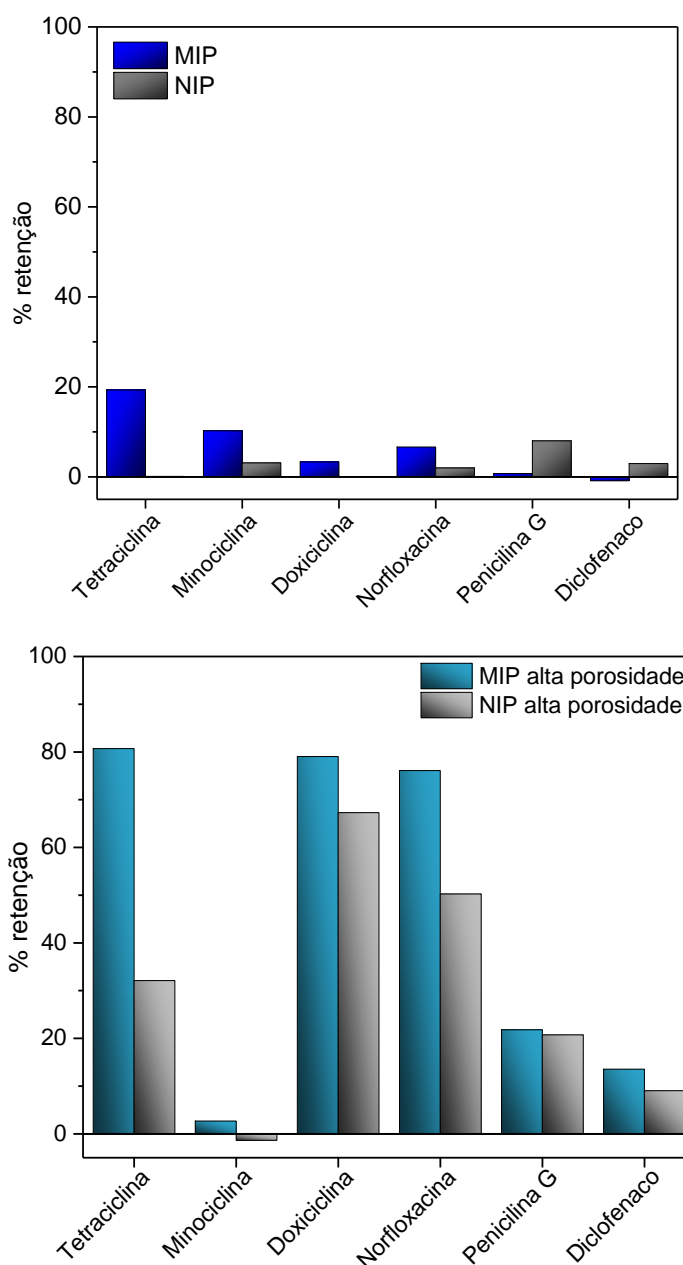


Figura 25 – Ensaio de seletividade para o MIP convencional e MIP de alta porosidade. Em separado, soluções de cada analito ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$ preparadas em ACN) foram colocadas em contato por 90 min com $5,0 \text{ mg}$ dos polímeros.

Fonte: autor do trabalho.

Pela Figura 25, no ensaio de seletividade é possível observar que a capacidade de adsorção da tetraciclina do MIP para o MIP de alta porosidade aumentou em quatro vezes, devido às diferenças estruturais entre eles. Como esperado, a adsorção do MIP altamente poroso foi mais eficiente. Além disso, houve diferenciação entre o polímero impresso e o controle para ambos os MIPs, indicando que para a concentração estudada as interações nas cavidades específicas foram superiores às interações não específicas (como por exemplo com os grupos funcionais livres na superfície dos polímeros não-impressos).

Para todas as outras moléculas, no caso do MIP, a retenção se manteve em valores inferiores à da tetraciclina e em alguns casos o polímero não impresso apresentou maior retenção; indicando que, embora a capacidade de retenção do MIP pelo analito foi baixa, o polímero foi seletivo.

Para o MIP de alta porosidade a seletividade obtida foi boa frente à análise da minociclina, penicilina G e diclofenaco. No entanto, doxiciclina e norfloxacina apresentaram elevados valores de adsorção. A doxiciclina, por ser um antibiótico da mesma classe da tetraciclina, pode ter interagido com as cavidades seletivas. Já a norfloxacina interagiu inespecificamente.

Para verificar se a doxiciclina e a norfloxacina poderiam interferir na capacidade seletiva do MIP, com base no ensaio de seletividade, foi realizado o ensaio de interferência (ensaio competitivo); para o qual uma solução contendo mistura dos analitos (tetraciclina e outro interferente) foi colocada em contato com os polímeros. No ensaio comparou-se a capacidade de retenção do MIP sem modificação e do MIP oco de alta porosidade, conforme exhibe a Figura 26.

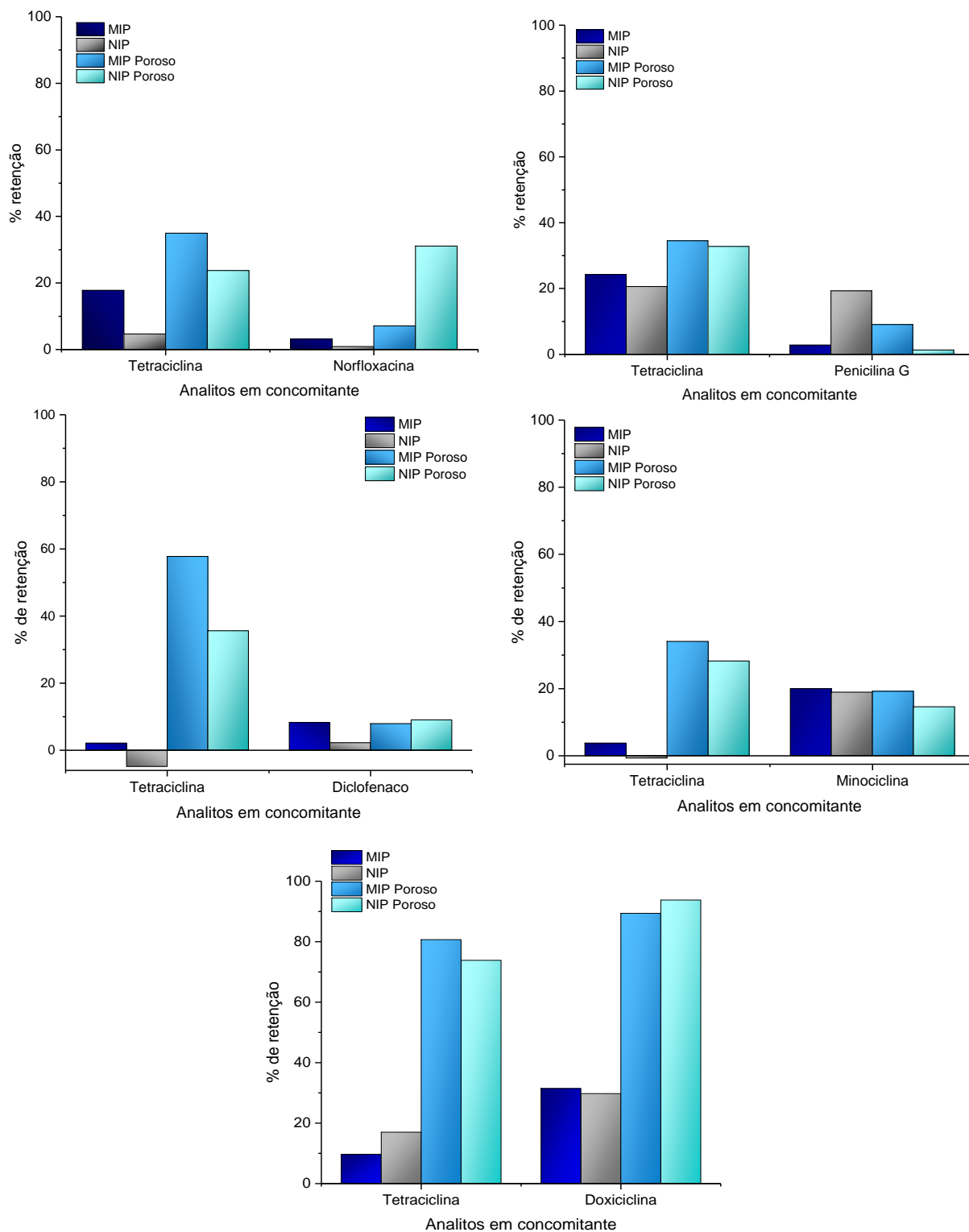


Figura 26 – Ensaio competitivo (interferência) para o MIP convencional e MIP de alta porosidade. Soluções contendo tetraciclina mais interferente (ambos na concentração final de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ preparadas em ACN) foram colocadas em contato por 90 min com $5,0 \text{ mg}$ dos polímeros.

Fonte: autor do trabalho.

No ensaio de interferência, quando os polímeros foram colocados em contato com solução contendo mistura da tetraciclina e o outro interferente, na competição

com a norfloxacinina tanto o MIP quanto o MIP de alta porosidade apresentaram maior afinidade pela tetraciclina, conforme exibido pelos valores superiores de adsorção - aproximadamente 40% para tetraciclina e menos de 10% para norfloxacinina.

Já no caso da doxiciclina, o MIP de alta porosidade apresentou alta afinidade tanto pela tetraciclina quanto pela doxiciclina, com valores de retenção superiores à 80% para ambos analitos. Nesse caso, a alta afinidade pode ser explicada por serem antibióticos da mesma classe e com estruturas muito semelhantes (variação ocorre no grupo OH que está em C₅ na doxiciclina e em C₆ na tetraciclina). Para a minociclina, embora também da mesma classe da tetraciclina, os resultados de retenção foram baixos, possivelmente pelas diferenças estruturais com a tetraciclina nos carbonos C₅, C₆ e C₇ da estrutura.

Com base nos resultados para o ensaio de seletividade e interferência, ao comparar os resultados de retenção para tetraciclina, minociclina e doxiciclina, é possível concluir que o sítio de ligação entre MIP e tetraciclina baseia-se principalmente pela interação com os grupos funcionais da parte superior da estrutura.

Nesse mesmo ensaio, tanto para a penicilina G quanto o diclofenaco, os polímeros apresentaram preferência pela retenção da tetraciclina.

Baseando-se no ensaio competitivo foram obtidos os parâmetros de eficiência de separação e seletividade para o MIP e o MIP de alta porosidade, conforme exibido na Tabela 7 a seguir.

O coeficiente de partição (K_p , em L g⁻¹) representa a quantidade de analito retida no polímero em relação à concentração final no sobrenadante (Equação 10):

$$K_p = \frac{Q}{C} \quad (10)$$

na qual Q é a quantidade de analito (em mg) retido por grama de polímero e C a concentração final de cada analito no sobrenadante (em mg L⁻¹).

O fato de impressão (IF) é a relação entre o K_p do MIP em relação ao seu respectivo NIP (Equação 11). Quanto maior o valor de IF, maior a seletividade do polímero. Finalmente, o fator de seletividade (S) permite uma estimativa do valor de seletividade comparando efeito de impressão do analito com o respectivo interferente (Equação 12).

$$IF = \frac{K_p \text{ (MIP)}}{K_p \text{ (NIP)}} \quad (11)$$

$$S = \frac{IF_{\text{tetraciclina}}}{IF_{\text{interferente}}} \quad (12)$$

Tabela 7 – Parâmetros de seletividade dos diferentes polímeros (tradicional e de alta porosidade) para a tetraciclina em comparação com cada um dos interferentes avaliados.

Analito	Material	K_p (L g⁻¹)	IF	S
Tetraciclina	MIP	0,0865	4,4	1,3
	NIP	0,0198		
Norfloxacin	MIP	0,0124	3,5	
	NIP	0,0036		
Tetraciclina	MIP P	0,214	1,7	10,2
	NIP P	0,123		
Norfloxacin	MIP P	0,0304	0,16	
	NIP P	0,180		
Analito	Material	K_p (L g⁻¹)	IF	S
Tetraciclina	MIP	0,484	1,1	9,3
	NIP	0,411		
Penicilina G	MIP	0,056	0,12	
	NIP	0,386		
Tetraciclina	MIP P	0,689	1,1	0,14
	NIP P	0,655		
Penicilina G	MIP P	0,180	7,6	
	NIP P	0,025		
Analito	Material	K_p (L g⁻¹)	IF	S
Tetraciclina	MIP	0,0423	0,5	0,30
	NIP	0,0970		
Diclofenaco	MIP	0,0621	1,5	
	NIP	0,0439		
Tetraciclina	MIP P	1,150	2,5	2,7
	NIP P	0,711		
Diclofenaco	MIP P	0,157	0,8	
	NIP P	0,180		
Analito	Material	K_p (L g⁻¹)	IF	S
Tetraciclina	MIP	0,0155	5,7	5,4
	NIP	0,0027		
Minociclina	MIP	0,0997	1,1	
	NIP	0,0934		
Tetraciclina	MIP P	0,206	1,3	1,0
	NIP P	0,157		
Minociclina	MIP P	0,094	1,4	
	NIP P	0,068		
Analito	Material	K_p (L g⁻¹)	IF	S
Tetraciclina	MIP	0,042	0,5	0,5
	NIP	0,081		
Doxiciclina	MIP	0,183	1,1	
	NIP	0,169		
Tetraciclina	MIP P	1,66	1,5	2,6
	NIP P	1,12		
Doxiciclina	MIP P	3,37	0,6	
	NIP P	6,01		

IF: fator de impressão; K_p: coeficiente de partição (L g⁻¹); MIP/NIP: MIP ou NIP tradicional; MIP/NIP P: MIP ou NIP de alta porosidade; S: fator de seletividade.

Fonte: autor do trabalho.

Pelos dados de seletividade acima exibidos, é possível observar para a mistura contendo norfloxacin, diclofenaco e doxiciclina que o MIP de alta porosidade apresentou os melhores resultados de seletividade (10,2; 2,7 e 2,6; respectivamente) quando comparado ao MIP convencional; indicando a preferência do polímero no reconhecimento seletivo à tetraciclina.

Para minociclina e penicilina G o MIP tradicional apresentou melhores valores de seletividade, que provém da comparação da separação entre MIP e o NIP. No entanto, as porcentagens de retenção para tetraciclina foram inferiores quando comparadas ao MIP de alta seletividade; conforme discutido anteriormente.

O fator de impressão, que compara a quantidade de analito ligado no MIP em relação ao NIP, variou para cada analito e cada tipo de polímero. Para o MIP, os melhores fatores de impressão foram nas misturas com norfloxacin, penicilina G e minociclina. Para o MIP de alta porosidade a impressão molecular foi mais efetiva nas misturas de doxiciclina, diclofenaco e norfloxacin.

Dessa forma, é possível concluir que o MIP, ao ter sua estrutura modificada (tanto pela inserção do núcleo de SiO₂ quanto pela posterior remoção desse núcleo) interage de forma diferente com a tetraciclina. A remoção do núcleo para obtenção do MIP de alta porosidade levou à um aumento da capacidade de adsorção do material pelo analito, com aumento da área superficial disponível (pelo buraco deixado pela remoção da NP) que facilita a ligação entre tetraciclina e MIP tanto pela parte interna quanto externa do polímero. Além disso, no MIP oco manteve-se a seletividade do polímero, conforme parâmetros apresentados na Tabela 7 e previamente discutidos.

3.4.6 Aplicação dos MIPs em amostras

Considerando a aplicação tradicional dos polímeros impressos como materiais adsorventes, o MIP de alta porosidade foi colocado em contato com diferentes tipos de amostra: água mineral, água de rio, urina sintética e leite semidesnatado.

Para verificar a possibilidade da presença da tetraciclina nas amostras de água ou leite, essas foram avaliadas diretamente com o método cromatográfico otimizado (sendo considerado como branco das amostras) e, de acordo com a sensibilidade do método desenvolvido, a tetraciclina não foi detectada naturalmente em nenhuma amostra. Deste modo, as amostras foram fortificadas com tetraciclina com o intuito de verificar a eficiência da capacidade de extração do analito da amostra pelo MIP.

Como parâmetro de comparação e sendo um branco para a capacidade máxima de adsorção do MIP, foi preparada uma solução padrão de tetraciclina na mesma concentração da fortificação das amostras, conforme descrito previamente (item 3.3.7).

Todas as medidas foram realizadas em triplicata (n=3) e para comparação os polímeros não impressos também foram avaliados nas diferentes amostras.

Uma vez que os MIPs possuem uma capacidade de carga máxima de analito para cada solução em que são dispersos, a partir do valor real de extração foram obtidos os valores normalizados para cada amostra. A Tabela 8 resume os resultados de recuperação obtidos.

Tabela 8 – Valores de recuperação relativa (n=3) da tetraciclina em diferentes tipos de amostra pelos polímeros (MIP e NIP) de alta porosidade.

Amostra	Polímero	Recuperação relativa* (%)	RSD (%)
Leite semidesnatado	MIP P	88 ± 1	1,1
	NIP P	136 ± 6	4,4
Urina sintética	MIP P	74 ± 4	5,4
	NIP P	49 ± 7	14,3
Água mineral	MIP P	76 ± 5	6,5
	NIP P	63 ± 13	20,6
Água de rio	MIP P	96 ± 2	2,1
	NIP P	164 ± 4	2,4

* Os valores reais de extração na solução padrão de tetraciclina para o MIP e NIP foram de 23,1% e 18%, respectivamente.

Fonte: autor do trabalho.

Conforme exibido na Tabela 8, os MIPs apresentaram maior precisão do que os NIPs na recuperação, indicando que o polímero atuou seletivamente no reconhecimento da tetraciclina dispersa em amostras complexas.

Os MIPs apresentaram faixa de recuperação compreendida no intervalo de 74 – 96% para todas as amostras. Assim, é possível observar que os diferentes componentes das amostras (como proteínas e outras moléculas) não interferem na capacidade seletiva dos polímeros impressos. Os resultados de recuperação dos MIPs também apresentaram precisão adequada, com valores de desvio padrão relativo menores que 7%.

Os NIPs em geral apresentaram recuperação relativa inferiores aos MIPs, exceto para as amostras de leite e água de rio. No caso, o valor de extração dos NIPs

nessas amostras foi maior do que na solução padrão e, deste modo, ao normalizar os valores, a recuperação relativa acabou sendo muito elevada.

3.5 Considerações finais

Todos os MIPs sintetizados foram caracterizados físico-quimicamente. Pelas imagens de MEV observou-se a semelhança na superfície dos polímeros; enquanto pelos espectros de EDS e IV foram observadas a composição de cada um, confirmando as diferenças estruturais entre cada material.

Nos testes de adsorção foram avaliadas as condições de ligação dos polímeros pela tetraciclina, sendo obtidas como condições ótimas o uso de 5,0 mg de polímero e acetonitrila como solvente. Dos três materiais sintetizados, o MIP de alta porosidade apresentou melhor resultado na adsorção da tetraciclina, com cinética de ligação de 90 min e carga máxima de ligação de 5,5 mg de analito por grama de polímero. MIP tradicional e com núcleo de SiO₂ apresentaram resultados inferiores, com Q_{máx} próximo a 2,6 mg de analito por grama de polímero. Cada material apresentou parâmetros de adsorção diferentes, com os ajustes comparados pelos diferentes modelos de isotermas de adsorção.

A avaliação do mecanismo de adsorção no MIP tradicional e no MIP@SiO₂ não foi possível de ser realizada pela ausência de linearidade dos dados obtidos nos modelos estudados. No caso do MIP de alta porosidade, foi possível determinar que o processo de difusão na superfície do material é um dos mecanismos de adsorção.

Quando comparados os MIPs com seus respectivos controles observou-se que os NIPs, embora apresentassem capacidade de adsorção menor do que os polímeros impressos, os valores de ligação para tetraciclina foram próximos em todos os ensaios realizados. Por meio dos ensaios de seletividade e interferência pode-se concluir que a adsorção ocorria por meio das cavidades seletivas do MIP, uma vez que a adsorção da tetraciclina sempre foi superior quando comparada com cada interferente avaliado e superior também para os MIPs em relação aos NIPs.

Ao aplicar o MIP de alta porosidade em diferentes tipos de amostras a faixa de recuperação para o analito ficou entre 74 – 96 %, indicando que o material consegue ser seletivo e se ligar ao analito mesmo em soluções de composição complexa.

Portanto, devido ao bom desempenho apresentado pelo MIP de alta porosidade, este foi escolhido para ser aplicado como fase de reconhecimento seletivo no desenvolvimento de dispositivos de fluxo lateral.

4 CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS DE FLUXO LATERAL CONTENDO MIP OU APTÂMEROS PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA

4.1 Introdução

Entre os sistemas *Point of Care*, aqueles que são baseados em papel são os mais empregados devido sua simplicidade para imobilizar os reagentes necessários para o teste, ao mesmo tempo que o papel pode ser acoplado em diferentes plataformas sensoras. Dos sistemas que utilizam papel, os testes de fluxo lateral apresentam amplo uso devido a versatilidade de composições que podem ser estruturadas para identificar os analitos. (103)

Os sistemas de fluxo lateral também são conhecidos como imunoensaios cromatográficos ou imunoensaios de fluxo lateral, uma vez que a maior parte dos testes empregam anticorpos como fase de reconhecimento seletivo; tanto imobilizado como fase de captura na nitrocelulose quanto como biorreceptores de detecção imobilizado nas nanopartículas. (103)

Han e colaboradores (104) desenvolveram uma tira de fluxo lateral para detecção simultânea de oito analitos diferentes e, entre eles, a tetraciclina. Todos os analitos foram conjugados à albumina do soro bovino para serem imobilizados como linha de teste e cada anticorpo de captura foi conjugado a nanopartículas de ouro. Os pesquisadores comprovaram que não há interferência entre as diferentes classes de analito sendo avaliadas simultaneamente. Para a tetraciclina, o teste apresentou limite de detecção de $0,64 \text{ ng mL}^{-1}$ e recuperação de 99,2 % ao analisar amostras de leite fortificadas com os diferentes analitos.

A literatura apresenta escassos trabalhos para detecção de tetraciclina por meio de sistemas de fluxo lateral. A principal diferença entre os trabalhos reportados está no tipo de nanopartículas que são utilizadas e modo de detecção/quantificação da tetraciclina. Todos os testes se baseiam no sistema de reconhecimento por meio de anticorpos. (54,56,105,106)

A produção de anticorpos demanda, além do elevado tempo e alto custo, aspectos relacionados à ética no uso de animais. Uma alternativa mais recente que vem sendo empregada é o uso de aptâmeros no lugar de anticorpos. (107)

Os aptâmeros são sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) compostas por estrutura de 15 a 100 nucleotídeos de comprimento, na forma de fitas simples. Os aptâmeros são obtidos por um processo denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), o qual é baseado em purificações únicas de uma biblioteca combinatória de sequências de ácidos nucleicos com alta afinidade para um alvo em particular por ciclos repetitivos de separações e ampliações. (108,109)

Devido à sua estrutura, os aptâmeros se ligam aos seus alvos por meio da modulação da sua estrutura com alta afinidade e especificidade aos sítios de ligação. Possuem vantagens frente aos anticorpos como facilidade de produção em larga escala, menor variação entre lotes, maior estabilidade para armazenamento e mudanças de condições (como pH, temperatura e força iônica). (108,109)

Dai e colaboradores (110) desenvolveram um método livre de marcação para determinação de tetraciclina utilizando aptâmero. A medida indireta foi realizada colocando em solução o aptâmero e tioflavina. A tioflavina livre não apresentou fluorescência, mas ao se intercalar com as bases nitrogenadas, foi monitorada sua emissão de fluorescência em aproximadamente 490 nm. Quando adicionadas alíquotas de tetraciclina, o aptâmero mudou sua conformação e reconheceu seletivamente a tetraciclina; sendo monitorada a diminuição do sinal de fluorescência.

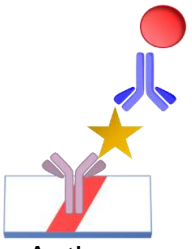
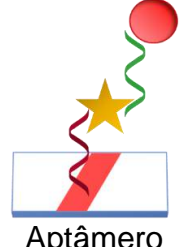

Um sensor eletroquímico para tetraciclina utilizando aptâmeros como fase de reconhecimento seletivo foi desenvolvido por Huang e colaboradores. (111) Os pesquisadores depositaram duas sequências de tamanhos diferentes e seletivas para o analito na superfície de eletrodo impresso de ouro. O sensor foi aplicado em amostra de mel e apresentou limite de detecção de $0,0073 \text{ ng mL}^{-1}$, faixa linear de trabalho entre $0,01 - 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ e recuperação entre $96,4 - 114,6\%$.

A maioria dos trabalhos utilizando aptâmero para detecção de tetraciclina e seus análogos realizam as medidas por detecção espectrofotométrica, eletroquímica e eletroquimiluminescência. (20,112)

O trabalho desenvolvido por Birader e colaboradores (113) apresentou um sistema de fluxo lateral para determinação de oxitetraciclina utilizando aptâmeros. O teste foi do tipo competitivo, no qual o aptâmero foi imobilizado em nanopartículas de ouro, a oxitetraciclina conjugada com BSA depositada como linha de teste e a fita de aptâmero complementar como linha de controle. As imagens capturadas foram quantificadas utilizando o software *ImageJ* e o sistema apresentou limite de detecção visual de $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e de quantificação $0,24 \text{ ng mL}^{-1}$.

Além das diferentes estratégias para fase de reconhecimento, os testes podem empregar uma ampla gama de nanopartículas que variam em formato, tamanho e propriedades permitem explorar diferentes tipos de detecção. A Tabela 9 resume as principais estratégias de detecção, tipos de nanopartículas e fases de reconhecimento que são reportadas nos sistemas de fluxo lateral. (114)

Tabela 9 – Métodos de detecção para sistemas de fluxo lateral. Os métodos são categorizados de acordo com o modo de detecção, os quais podem atuar com diferentes tipos de marcadores e materiais de reconhecimento.

Modalidade de detecção	Evento	Marcador	Reconhecimento
Óptica	Colorimétrico Fluorescência Espalhamento RAMAN Quimiluminescência	Nanopartículas (Au, Ag, IrO ₂ , CuO, magnéticas), nanotubos de carbono, óxido de grafeno e polímeros	 Anticorpo
Térmica	Imagem Térmica Fotoacústica	Nanopartículas (Au e Ag), nanotubos de carbono, fósforo preto	 Aptâmero
Magnética	Magnetorresistência gigante Magnetorresistência de tunelamento Quantificação das partículas magnéticas	Nanopartículas magnéticas	 Aptâmero
Eletroquímica	Amperometria Voltametria cíclica Eletroquimiluminescência	Nanopartículas (Au, Au@Pt, magnéticas) e óxido de grafeno	

Fonte: adaptado de Nguyen e colaboradores. (114)

Ademais as fases de reconhecimento e detecção comumente utilizados, como exibido na Tabela 9, apenas um trabalho contendo MIP como fase de reconhecimento em teste de fluxo lateral é reportado até o presente momento.

He e colaboradores (115) sintetizaram um MIP seletivo para o pesticida triazofós e depositaram o material na membrana de nitrocelulose por eletroforização como linha de teste. A linha de controle foi composta por anti-IgG de rato produzido em cabra e o ensaio foi competitivo: monitorou-se a ligação no MIP entre o triazofós

e o conjugado triazofós-IgG-Fluoresceína. O sistema apresentou limite de detecção de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ quando avaliado em amostras de água de rio.

A literatura, até o momento, não exhibe trabalhos que relatem testes rápidos de fluxo lateral qualitativos e/ou quantitativos para tetraciclina que utilizem MIP ou aptâmeros como fase de reconhecimento. Deste modo, apresenta-se nesse capítulo o desenvolvimento de testes rápidos com diferentes fases de reconhecimento para tetraciclina.

4.2 Objetivos

Desenvolvimento de dois dispositivos de fluxo lateral diferentes para identificação rápida de tetraciclina: um sistema baseado no reconhecimento seletivo dos MIPs e outro no dos aptâmeros. Ademais, otimizar a composição e estrutura de cada teste visando sua aplicação em amostras complexas.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Reagentes e soluções

A síntese das nanopartículas de ouro (Au NP) foi realizada utilizando-se ácido cloroáurico e citrato de sódio dihidratado, ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich®.

Para a reação de acoplamento da tetraciclina na superfície das nanopartículas de sílica foram utilizados glutaraldeído, fornecido pela Sigma-Aldrich® e borohidreto de sódio, da Acros®.

Todos os sistemas aquosos e soluções tampão foram preparados com água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q *Ultra Pure Water System* da marca Millipore® (com resistividade igual a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Para a reação colorimétrica no fluxo lateral utilizou-se cloreto de Ferro (III) da Aldrich®. Os sais utilizados para preparar as soluções tampão de corrida nesses sistemas foram TRIS, HEPES e PIPES, obtidos da Sigma-Aldrich® e fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico da marca NEON. Os bloqueios da membrana de nitrocelulose foram realizados com albumina do soro bovino (BSA) e polietilenoglicol biscarboximetil éter (PEG), ambos Sigma-Aldrich®.

Para os ensaios no sistema de fluxo lateral foram utilizados como controles biotina-HRP (Fischer Scientific®), (3-mercaptopropil)trimetoxissilano e ácido tioglicólico, todos fornecidos pela Sigma-Aldrich®. Nanopartículas de Au recobertas com estreptavidina (Au-STA NP) 40 nm 100D foram adquiridas da Abcam®.

A sequência de aptâmero de DNA de ligação à tetraciclina foi 40-mer 5'-GTTTGTGTATTACAGTTATGTTACCCTCATTTTTCTGAAC-3'. (116) A sequência complementar 5'-GTTTCAGAAAAATGAGGGTAACATAACTGTAATACACAAAC-3' foi utilizada nos ensaios como controle. Para as reações e montagem dos sistemas de fluxo lateral as sequências acima descritas foram utilizadas contendo marcação com biotina (b-APT) ou tiol (SH-APT) na terminação 5'. Todos os aptâmeros foram adquiridos pela Sigma-Aldrich®.

As medidas eletroquímicas de voltametria cíclica foram realizadas em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹ contendo o par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} 1,0×10⁻³ mol L⁻¹. Para preparo da solução foram utilizados K₄[Fe(CN)₆] da Mallinckrodt, K₃[Fe(CN)₆] da Synth e KCl fornecido pela Dinâmica.

As amostras foram previamente preparadas e/ou tratadas do mesmo modo conforme foi descrito no tópico de preparo de amostras do Capítulo I (item 3.3.7).

4.3.2 Instrumentação

4.3.2.1 Caracterizações

A distribuição e morfologia das nanopartículas de ouro foi avaliada utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (TEM; Philips, CM200) e o microscópio eletrônico de varredura com campo de emissão (MEV-FEG) da marca JEOL, modelo JSM-7500F.

A deposição dos polímeros e presença de tetraciclina no sistema de fluxo lateral foram observadas por meio de microscopia confocal (microscópio Carl Zeiss LSM 800 com *Airyscan*) aplicando laser de excitação em 405 nm. As membranas de nitrocelulose avaliadas foram preparadas pela deposição da suspensão de MIP e eluição de tetraciclina. Após secas por 24 h, as membranas foram cortadas ao redor da linha de MIP em tamanho de 5x5 mm e levadas para análise.

4.3.2.2 Métodos analíticos

As análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 60 da Agilent®, comandado pelo software ScanCary WinUV. 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 700 nm.

O ajuste de pH das soluções tampão foi realizado utilizando um pHmetro da marca Digital Gehaka® modelo PG 2000.

As análises de voltametria cíclica foram realizadas em potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT 302 (Metrohm Autolab®) e software NOVA (versão 2.1.4) para obtenção dos dados. Utilizou-se uma célula eletroquímica de compartimento único de 5 mL contendo sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (carbono vítreo com área geométrica de 0,071 cm²), eletrodo de referência (Ag|AgCl_{(KCl(sat))}) e eletrodo auxiliar (fio de Pt).

Os dispositivos de fluxo lateral foram construídos utilizando-se membranas de nitrocelulose (FF 120HP), tira de amostra (CF4), tira conjugada de fibra de vidro (Standard 14) e tira absorvente (CF7); todos fornecidos pela GE Healthcare.

As quantificações dos sistemas de fluxo lateral foram realizadas em sistema fechado com iluminação constante utilizando três lâmpadas brancas de LED alimentadas por fonte de tensão controlada da marca Tectrol. As imagens foram obtidas utilizando um smartphone do tipo Samsung Galaxy J7 (Android 6.0.1) com câmera traseira de 13 Mpx com o aplicativo de livre acesso *Open Camera* (v. 1.47.3). Para processamento das imagens foi utilizado o software livre *ImageJ* (v. 1.52a).

4.3.3 Desenvolvimento dos sistemas de fluxo lateral contendo MIP como fase de reconhecimento seletivo

Os sistemas de fluxo lateral basearam-se em dois tipos distintos de fase de reconhecimento seletivo para tetraciclina: MIP e aptâmeros. Deste modo, a construção e otimização de cada um deles foram realizadas separadamente e de acordo com as especificidades de cada formato de teste estabelecido.

No sistema contendo MIP, a resposta visual indicativa da presença do analito baseou-se em uma reação de complexação entre a tetraciclina e o cátion Fe³⁺, formando um composto de coordenação de coloração amarelo escuro.

O experimento inicial para prova de conceito da efetividade da reação no fluxo lateral e da capacidade de reconhecimento do MIP baseou-se na deposição do MIP (suspensão 5,0 mg mL⁻¹ em solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20®) na membrana de nitrocelulose e do Fe³⁺ na tira conjugada. Foram aplicadas soluções estoque de tetraciclina 0,2 mol L⁻¹ e FeCl₃ 0,1 mol L⁻¹ preparadas em água. Essas soluções foram utilizadas para posteriores diluições conforme a necessidade dos experimentos.

O procedimento inicial para construção das tiras de fluxo lateral está resumido nos passos a seguir, com esquematização exibida na Figura 27.

- i. 5,0 µL de suspensão de MIP foram depositados na membrana de nitrocelulose formando uma linha, a qual ficou secando por 2 h;
- ii. 60,0 µL da solução de estoque de FeCl₃ foram depositados na tira conjugada antes da eluição do analito;
- iii. Adicionou-se 40,0 µL da solução estoque de tetraciclina na tira de amostra e, logo após, adições sucessivas da solução de corrida;
- iv. Após alguns minutos, avaliou-se o resultado da formação de cor na linha de teste.

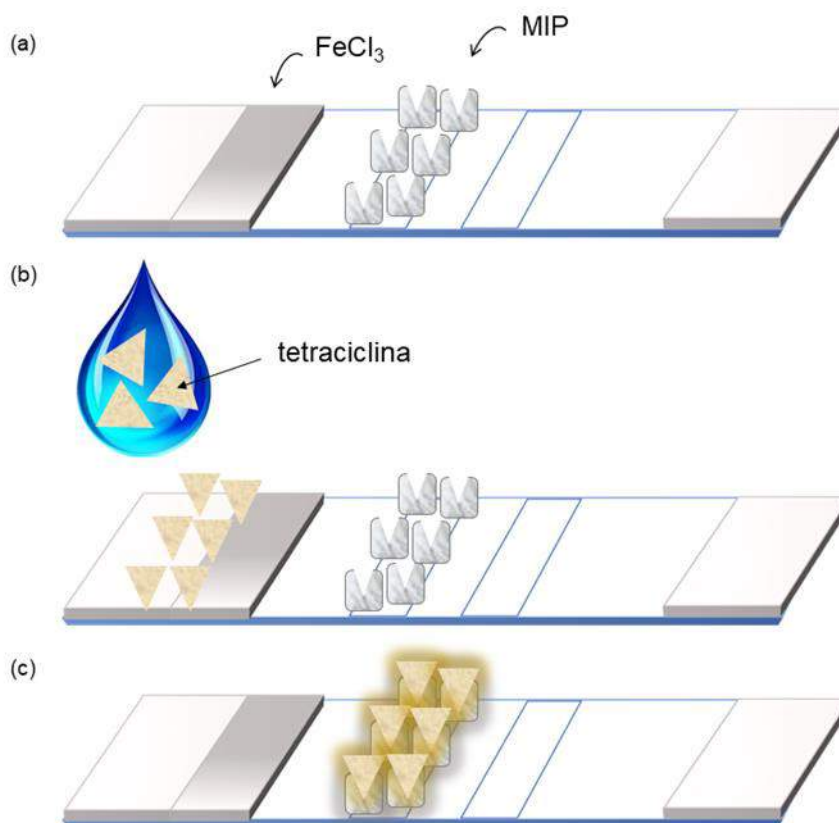


Figura 27 – Procedimento experimental no sistema de fluxo lateral utilizando reação de complexação entre tetraciclina e FeCl_3 . (a) Inicialmente MIP e solução de FeCl_3 são depositados na tira de fluxo lateral. (b) Posteriormente adiciona-se solução de tetraciclina, a qual elui pela tira e que, (c) em contato com o metal forma o composto de coordenação colorido que fica retido na linha teste de MIP.

Fonte: autor do trabalho.

4.3.3.1 Avaliação da reação de complexação entre tetraciclina e Fe^{3+}

Após verificar a efetividade da reação no fluxo lateral, foram otimizados os parâmetros da reação de complexação para formação do composto de coordenação.

Os experimentos para avaliar a estequiometria e cinética da reação de complexação entre tetraciclina e Fe^{3+} foram realizados utilizando soluções estoque de ambos os reagentes na concentração de $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparadas em água.

Para o ensaio de determinação da estequiometria do complexo, alíquotas das soluções estoque (analito e metal) para um volume total de $1\,000 \mu\text{L}$ foram utilizadas, variando a razão entre os volumes e, conseqüentemente, levando à variação da fração molar das espécies no intervalo de 0,1 até 0,9. As misturas foram levadas para análise espectrofotométrica de absorção na região do UV-Vis no comprimento de onda de 435 nm.

A cinética de formação do complexo foi realizada preparando uma mistura de tetraciclina e Fe^{3+} na proporção 1:1 (v/v) a partir das soluções estoque; e o tempo de formação do complexo após a mistura avaliado no intervalo de 15 segundos até 20 minutos. As medidas de absorção do complexo na região do visível foram realizadas em 435 nm.

4.3.3.2 Otimização dos componentes na construção do sistema MIP/tetraciclina/ Fe^{3+}

A tira de fluxo lateral foi composta sempre pelos mesmos materiais: tira de amostra de celulose, tira conjugada de fibra de vidro, membrana de nitrocelulose e tira absorvente de celulose; todos suportados sobre o cartão adesivo da membrana de nitrocelulose.

O procedimento geral adotado sempre foi, conforme resumido na Figura 27 anteriormente, na seguinte ordem: montagem da tira, deposição dos reagentes e materiais, secagem, adição do analito e eluição e, finalmente, avaliação do parâmetro desejado. No caso dos testes considerados como brancos, não houve eluição do analito.

As principais variáveis analisadas na construção do teste são resumidas na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10 – Descrição de cada componente e seu respectivo parâmetro analisado na construção das tiras de fluxo lateral; sendo descritas nas condições as composições, quantidades e concentrações.

Componente	Parâmetro analisado	Condições avaliadas
Eluente	Tipo de solução	Água ultrapura, soluções tampão a pH 7,4 (fosfato, TRIS, HEPES, PIPES)
	Intervalo de concentração	0,005 – 0,2 mol L ⁻¹
Membrana de nitrocelulose	Porosidade	120 HP® e 170 HP®
	Componentes de bloqueio	BSA, PEG, sais das soluções tampão (fosfato, TRIS, HEPES, PIPES)
FeCl ₃	Intervalo de concentração	3,5 – 35 mmol L ⁻¹
	Modo de adição	Deposição na tira conjugada ou adição direta na nitrocelulose
MIP	Quantidade de suspensão depositada	0,75 – 5,0 mg mL ⁻¹
	Tipo de MIP/NIP	Convencional, com núcleo de SiO ₂ , de alta porosidade
Tetraciclina	Avaliação qualitativa	1×10 ⁻⁸ – 1×10 ⁻³ mol L ⁻¹
	Avaliação quantitativa	1×10 ⁻⁸ – 1×10 ⁻² mol L ⁻¹

Fonte: autor do trabalho.

Durante a avaliação de alguns ensaios de otimização, além da identificação qualitativa do resultado positivo indicado pela aparição de cor na linha de teste; em alguns ensaios os resultados foram avaliados quantitativamente.

4.3.3.3 Quantificação dos ensaios nas tiras de fluxo lateral

As quantificações das linhas de amostra foram realizadas por meio de imagens obtidas utilizando um smartphone e um sistema fechado para garantir as mesmas condições a cada fotografia. A Figura 28 exemplifica o procedimento experimental de obtenção das imagens e quantificação; bem como os materiais e softwares utilizados.

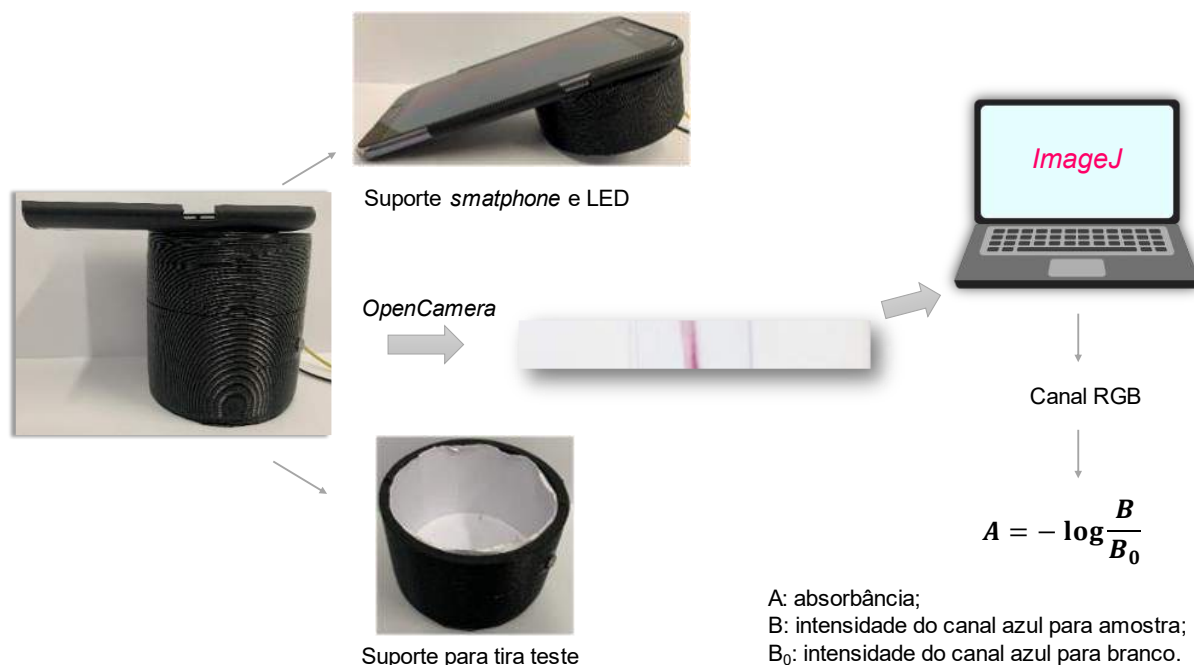


Figura 28 – Sistema de quantificação das tiras de fluxo lateral, cuja parte superior comporta o smartphone e os LEDs para iluminação alimentados por fonte de tensão de 12 V e parte inferior para suporte da tira de fluxo lateral. A imagem é obtida utilizando o aplicativo *OpenCamera* e, por meio do software *ImageJ* a imagem é tratada selecionando a cor de maior intensidade do canal RGB, cuja intensidade de área colorida é convertida no sinal analítico de absorvância.

Fonte: autor do trabalho.

As imagens foram capturadas utilizando o aplicativo *Open Camera* no smartphone, de acordo com o seguinte procedimento: as tiras de fluxo lateral foram colocadas dentro de uma caixa circular impressa (8,0 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura) com ácido polilático preto; para controlar a luminosidade e evitar interferências de radiação externa.

A luminosidade do sistema foi controlada usando três LEDs brancos de alto brilho (10 mm cada) posicionados em um arranjo triangular e alimentados com uma fonte de 14 V; sendo o smartphone posicionado sempre na mesma posição (cerca de 10 cm acima das tiras suportadas na parte inferior da caixa). As imagens foram obtidas utilizando foco e exposição automáticos, sem flash ou controle de macros.

As fotografias tiveram a área da linha de teste quantificada por meio da correlação da intensidade do sinal colorimétrico (de acordo com a maior intensidade selecionada do canal RGB) com absorvância, levando o branco (ausência do analito) em consideração. (117)

Foi avaliado a influência do tempo de captura da imagem, após o surgimento de coloração na linha teste, nos resultados de quantificação. Para tanto, após o início

da reação colorimétrica, com sinal da eluição da tetraciclina, avaliou-se o efeito do tempo de obtenção da imagem (estudando o intervalo de 5 — 120 min) na resposta quantitativa.

4.3.3.4 Métodos analíticos

Para o processamento das imagens, foi utilizado o software livre ImageJ para obter as intensidades dos canais RGB. O canal azul (B) foi selecionado porque forneceu a maior intensidade de cor do analito. A resposta analítica foi expressa em absorvância, de acordo com a relação $A = -\log\left(\frac{B}{B_0}\right)$, na qual B_0 e B são valores de intensidade de sinal do canal azul para o branco e o padrão/amostra, respectivamente.

O limite de detecção (LOD) foi obtido a partir da equação da reta da curva analítica, pela relação $LOD = 3 \frac{s}{S}$, na qual s é o desvio do coeficiente linear e S é o coeficiente angular. O limite de quantificação (LOQ) foi considerado como a menor concentração (primeiro ponto) da curva analítica.

4.3.3.5 Desenvolvimento da linha de controle

A linha de controle foi desenhada pela deposição de $K_4[Fe(CN)_6]$, o qual possui alta afinidade e especificidade pelo Fe^{3+} , formando um complexo de coordenação de coloração azul intensa denominado de azul da Prússia. A otimização da linha de controle foi realizada avaliando-se:

- Intervalo de concentração de $K_4[Fe(CN)_6]$ depositado: 1 – 25 mg mL⁻¹ (solubilizado em água ultrapura);
- Deposição de mistura BSA (0,5% m/v) + $K_4[Fe(CN)_6]$ como linha de controle;

Os parâmetros acima descritos foram variados e avaliados separadamente para comparação. O procedimento de construção do teste e eluição foram idênticos aos descritos anteriormente: deposição do ferrocianeto ou da mistura ferrocianeto e BSA, secagem, eluição com solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹, adição de 10,0 µL de $FeCl_3$ 0,05% (m/v).

4.3.3.6 Ensaio de seletividade e interferência

O teste desenvolvido foi avaliado frente sua capacidade de ser seletivo no reconhecimento da tetraciclina; avaliando-se a resposta frente à eluição de outros antibióticos da classe das tetraciclinas (minociclina e doxiciclina), antibióticos de outras classes (penicilina G e norfloxacina), fármaco anti-inflamatório (diclofenaco) e vitamina (biotina).

O teste e o procedimento de eluição foram realizados com as condições previamente otimizadas: deposição de 2,0 μL da suspensão de MIP e NIP de alta porosidade, eluição com solução tampão HEPES 0,05 mol L^{-1} a pH 7,4 e adição de 10,0 μL de FeCl_3 0,5% (m/v). Cada composto (50 mg L^{-1} solubilizado em água ultrapura) foi eluído separadamente e, após a reação colorimétrica, realizada a quantificação dos testes. Para avaliar a interferência, a eluição foi realizada contendo uma mistura de tetraciclina e interferente, ambos na concentração final de 50 mg L^{-1} .

4.3.3.7 Aplicação em amostras

Os sistemas de fluxo lateral foram montados conforme procedimento anteriormente otimizado e descrito. Foram depositados de 2,0 μL da suspensão de MIP e NIP de alta porosidade, adicionados 40,0 μL das amostras (enriquecidas com tetraciclina 50 mg L^{-1}) e eluição com solução tampão HEPES 0,05 mol L^{-1} a pH 7,4 e adição de 10,0 μL de FeCl_3 0,5% (m/v). Os sistemas foram quantificados para determinar a porcentagem de recuperação em cada amostra avaliada.

4.3.4 Desenvolvimento dos sistemas de fluxo lateral contendo aptâmeros como fase de reconhecimento seletivo

4.3.4.1 Síntese das nanopartículas de ouro (Au NP)

Para obtenção das Au NP adotou-se o procedimento desenvolvido por Turkevich *et al.* (118): 100,0 mL de água ultrapura foi aquecida até a ebulição e, posteriormente, sob agitação constante foram adicionados 40,0 μL de ácido cloroáurico (HAuCl_4) 0,5 mol L^{-1} . A seguir, foram acrescentados 1,5 mL de solução aquosa de citrato de sódio (0,07 mol L^{-1}) e o sistema mantido sob aquecimento e

agitação constante por 5 min. Finalmente, o aquecimento foi desligado e após resfriar até temperatura ambiente, a solução de Au NP foi armazenada sob refrigeração.

Também foram realizadas sínteses, seguindo o mesmo procedimento previamente descrito, adicionando-se maiores volumes de solução de citrato de sódio (1,7 mL; 2,2 mL e 3,0 mL) com o intuito de verificar o efeito do volume de citrato no tamanho das NPs formadas. Todas as sínteses foram avaliadas por espectrofotometria na região do UV-Vis.

4.3.4.2 Avaliação da viabilidade dos aptâmeros

Para verificar a atividade dos aptâmeros, esses foram colocados em contato com o laranja de tiazol (LT), um corante que apresenta afinidade pelas bases nitrogenadas.

Foram preparadas soluções de tetraciclina (concentração final no tubo no intervalo de 1 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$); as quais adicionou-se o aptâmeros com concentração 0,050 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mantida constante. Após interação sob agitação por 15 min a 25 °C, adicionou-se o LT (concentração final constante de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). As soluções interagiram por mais 10 min e foram levadas para medida por espectrofotometria.

Os brancos consistiram na avaliação do LT, tetraciclina e aptâmeros separadamente, com as concentrações idênticas às das misturas.

4.3.4.3 Imobilização dos aptâmeros nas nanopartículas de Au

Para comparar e verificar a eficiência da imobilização, diferentes procedimentos foram avaliados na imobilização dos APT de ligação na superfície das Au NP:

- **Adsorção:** imobilização das fitas de aptâmeros sem modificação.

Para a reação de imobilização por adsorção, 10,0 μL da solução estoque de APT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram diluídos em 45,0 μL de água ultrapura. A seguir, 20,0 μL da solução anterior foram diluídos em 80,0 μL de solução de AuNP. A mistura interagiu sob agitação em temperatura ambiente por 30 min.

- **Interação:** imobilização de aptâmeros marcados com tiol (SH-APT).

Inicialmente 10,0 μL da solução estoque de SH-APT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram diluídos em 45,0 μL da solução 1×10^{-3} mol L^{-1} de tris(2-carboxietil)fosfina, preparado

em solução tampão TRIS 50,0 mmol L⁻¹ contendo 250,0 mmol L⁻¹ de NaCl. A solução interagiu em temperatura ambiente sob agitação por 1 h. Posteriormente, 20,0 µL da solução preparada de SH-APT foram diluídos em 80,0 µL de solução de AuNP. A mistura interagiu sob agitação em temperatura ambiente por 15 min.

- **Interação:** imobilização da fita de aptâmero marcada com biotina (b-APT).

Para a reação, 4,0 µL da solução estoque de b-APT (100 µmol L⁻¹) foram diluídos em 20,0 µL de Au NP recobertas com estreptavidina (Au-STA NP comerciais). A solução interagiu sob agitação em temperatura ambiente por 30 min. A seguir, essa solução foi centrifugada e ressuspensa em 180,0 µL de solução composta por sacarose 10% (m/v) e ácido bórico 10 mmol L⁻¹.

4.3.4.4 Ensaio de avaliação da estrutura do teste

Os ensaios iniciais no sistema de fluxo lateral consistiram na construção das linhas de controle para verificar a capacidade de eluição e estabilidade das Au NPs sintetizadas e de nanopartículas de ouro recobertas com estreptavidina (Au-STA NP) comerciais.

Como linha de controle para as Au NP foram avaliados diferentes compostos contendo grupo tiol disponível. O resumo dos parâmetros avaliados na eluição das Au NP é apresentado na Tabela 11 a seguir:

Tabela 11 – Descrição de cada componente e seu respectivo parâmetro analisado na eluição das Au NP, sendo descritas nas condições as composições, quantidades e concentrações avaliadas.

Componente	Parâmetro analisado	Condições avaliadas
Eluente	Tipo de solução	Água ultrapura, soluções tampão a pH 7,4 (fosfato, TRIS, HEPES, PIPES)
	Intervalo de concentração	0,01 – 0,1 mol L ⁻¹
Tira conjugada	Bloqueio e/ou modificadores	BSA, Tween, sacarose
Linha de controle	Composição, intervalo de concentração e melhor resposta colorimétrica	Deposição de mercaptossilano e ácido tioglicólico.

Fonte: autor do trabalho.

Em cada experimento variou-se um parâmetro por análise, sendo o procedimento geral adotado para construção da tira de fluxo lateral:

- i. 2,0 μL das soluções de mercaptosilano/ ác. tioglicólico foram aplicadas na nitrocelulose formando o desenho de uma linha. A membrana secou por 2 h em temperatura ambiente.
- ii. Na tira conjugada adicionou-se 50,0 μL da solução de bloqueio. A tira secou por 2 h em temperatura ambiente. Depois de seca, adicionou-se 45,0 μL da solução de Au NP e a tira foi seca por mais 2 h em temperatura ambiente.
- iii. Adicionou-se três alíquotas de 40,0 μL da solução tampão de corrida na tira de amostra até completa eluição das NP pelo sistema; sendo observada a resposta colorimétrica do sistema.
- iv. Nos ensaios de quantificação, as imagens foram obtidas após 60 min de secagem das membranas.

4.3.4.5 Síntese de nanopartículas de SiO_2 e modificação com tetraciclina

A linha de teste foi composta por tetraciclina depositada de dois modos diferentes: deposição direta na nitrocelulose e imobilizada previamente em nanopartículas de SiO_2 .

Para deposição direta da tetraciclina na membrana, avaliou-se o intervalo de concentração de deposição ($1\text{--}50\text{ mg mL}^{-1}$), a quantidade de ciclos de deposição (uma, duas ou três deposições) e o efeito da solução tampão de corrida na linha.

Para imobilização da tetraciclina na superfície das SiO_2 NP duas metodologias foram avaliadas: adsorção e ligação utilizando reagente acoplante. Foram utilizadas tanto as NP tradicionais (contendo grupos OH livres) quanto modificadas com grupo NH_2 ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ NP). Em todas as metodologias, as soluções empregadas foram glutaraldeído 1% v/v preparado em solução aquosa de ácido acético 2% v/v e tetraciclina ($4,2\text{ mmol L}^{-1}$ em solução aquosa de ácido acético 2% v/v).

Pelo método de adsorção, 100 mg de SiO_2 NP/ $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ NP foram colocadas em contato com 1,5 mL de solução de tetraciclina. O sistema foi mantido sob agitação por 2 h em temperatura ambiente e, logo após, as nanopartículas foram limpas com excesso de água ultrapura e separadas por centrifugação.

Para a reação de acoplamento utilizando glutaraldeído, três métodos diferentes foram avaliados e adaptados a partir de procedimentos semelhantes. (119,120)

Método 1: 0,150 g de SiO₂ NP foram colocadas em contato com 15,0 mL de solução de tetraciclina sob agitação em temperatura ambiente por 15 min. A seguir, adicionou-se 15,0 mL de glutaraldeído. A temperatura foi elevada a 70 °C e o sistema mantido sob agitação por 2 h. Após esse período, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente e iniciou-se o processo de limpeza.

Método 2: 0,150 g de SiO₂ NP foram colocadas em contato com 15,0 mL de solução de glutaraldeído sob agitação a 70 °C por 2 h. A seguir adicionou-se 15,0 mL de solução de tetraciclina e o sistema mantido sob agitação por mais 2 h. Por fim, o sistema foi levado para resfriar até temperatura ambiente e iniciou-se o processo de limpeza.

Método 3: 0,300 g de NH₂-SiO₂ NP foram colocadas em contato com 15,0 mL de solução de glutaraldeído e mantidas sob fluxo constante de N₂ e agitação por 1 h em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada para remoção do sobrenadante e limpa uma vez com água ultrapura. As NP foram ressuspensas em 15,0 mL de água ultrapura e levadas para banho de gelo. No momento em que a temperatura atingiu próximo de zero graus, adicionou-se 0,150 g de NaBH₄ e o sistema agitado por 15 min. A seguir adicionou-se 20,0 mL de água ultrapura e o sistema levado para centrifugação e remoção do sobrenadante. Em sequência adicionou-se 15 mL da solução de tetraciclina e o sistema foi mantido sob agitação a 70 °C por 2h. Finalizado o tempo iniciou-se o processo de limpeza.

Para todos os métodos acima descritos, o processo de limpeza consistiu em enxague com excesso de água ultrapura (8 vezes) e separação das NPs por centrifugação.

4.3.4.6 Estrutura do ensaio competitivo :construção das linhas de teste e controle

A linha de teste do ensaio competitivo foi composta pelas SiO₂ NP modificadas com tetraciclina em sua superfície. A linha de controle foi composta pela sequência complementar de aptâmero, denominada de c-APT. A eficiência dos diferentes materiais foi avaliada verificando-se o sinal colorimétrico gerado pela eluição das Au-APT NPs.

A Figura 29 exhibe os componentes depositados e avaliados na construção de cada parte do teste, o qual foi construído no formato competitivo.

Tabela 12 – Soluções tampão corrida avaliadas para hibridização entre as fitas de APT e c-APT.

TRIS (mmol L ⁻¹)	Tween (% v/v)	Sacarose (% m/v)	MgCl ₂ (mmol L ⁻¹)
50	0,50	-	50
50	0,50	1,0	50
100	0,50	-	50
100	0,50	1,0	50

Fonte: autor do trabalho.

4.4 Resultados e discussão

As tiras de fluxo lateral são compostas por diferentes seções: tira de amostra, tira conjugada, membrana de nitrocelulose e tira adsorvente. Na tira conjugada encontra-se a biomolécula e nanopartícula (marcadas ou não) que são responsáveis pela reação colorimétrica que gera o resultado (positivo ou negativo) do sistema.

Os sistemas de fluxo lateral para identificação da tetraciclina foram construídos de duas formas diferentes: utilizando MIP para identificação da tetraciclina e reação de complexação com Fe³⁺ para resposta colorimétrica; ou utilizando aptâmeros para identificação da tetraciclina e nanopartículas de Au para obtenção do sinal colorimétrico.

Desse modo, os resultados obtidos nos sistemas de fluxo lateral serão discutidos em dois tópicos separados, com subtópicos dispostos conforme os resultados obtidos de caracterizações e estudos de otimização.

4.4.1 Sistema contendo MIP como material de reconhecimento seletivo

4.4.1.1 Caracterização da linha de teste

A deposição dos polímeros na membrana de nitrocelulose e a ligação da tetraciclina nesses materiais foram caracterizadas por microscopia confocal, conforme as imagens exibidas pelas Figura 30 e Figura 31.

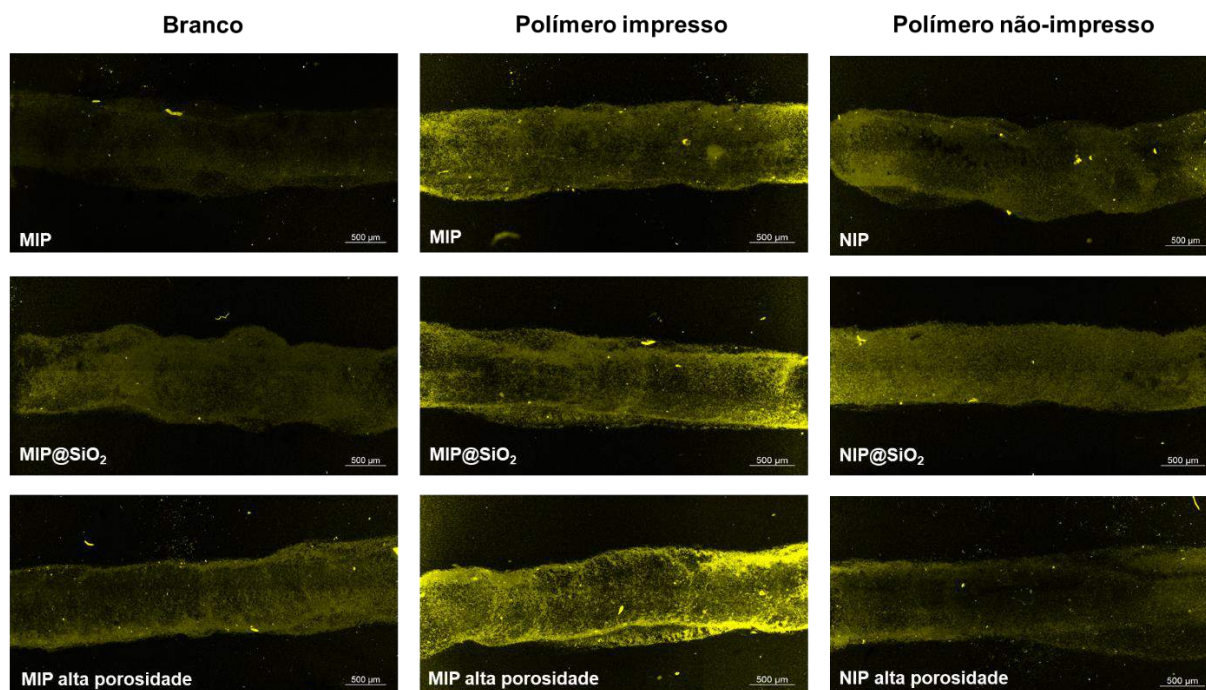


Figura 30 – Imagens de microscopia confocal exibindo a ligação da tetraciclina nos polímeros depositados na membrana de nitrocelulose. Condições de análise: eluição de tetraciclina 25,0 mg L⁻¹ com solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ a pH 7,4. para as membranas com os polímeros impresso e não-impresso. Branco: eluição somente da solução tampão.

Fonte: autor do trabalho.

A microscopia confocal permitiu, por meio da medida de fluorescência proveniente da estrutura da tetraciclina, identificar diretamente o analito ligado nos polímeros impressos. Conforme exibe a Figura 30, a ligação do analito foi diferente para cada tipo de material.

Todos os polímeros impressos apresentaram fluorescência muito mais intensa do que seus respectivos polímeros não-impressos. Entre os materiais impressos, o MIP oco de alta porosidade apresentou o maior sinal de fluorescência, indicando que houve retenção de maior quantidade de tetraciclina.

Deste modo, comparando a diferença de sinal entre os MIPs, os NIPs e os brancos, é possível concluir que a tetraciclina se ligou seletivamente às cavidades dos polímeros e não ocorreu retenção física (pelo tamanho ou quantidade de polímero depositado) ou interações inespecíficas.

Para ilustrar a capacidade de ligação do MIP de alta porosidade, o qual foi escolhido como modelo para linha de teste, diferentes concentrações de tetraciclina foram eluidas pela tira contendo esse material, conforme exibe a Figura 31.

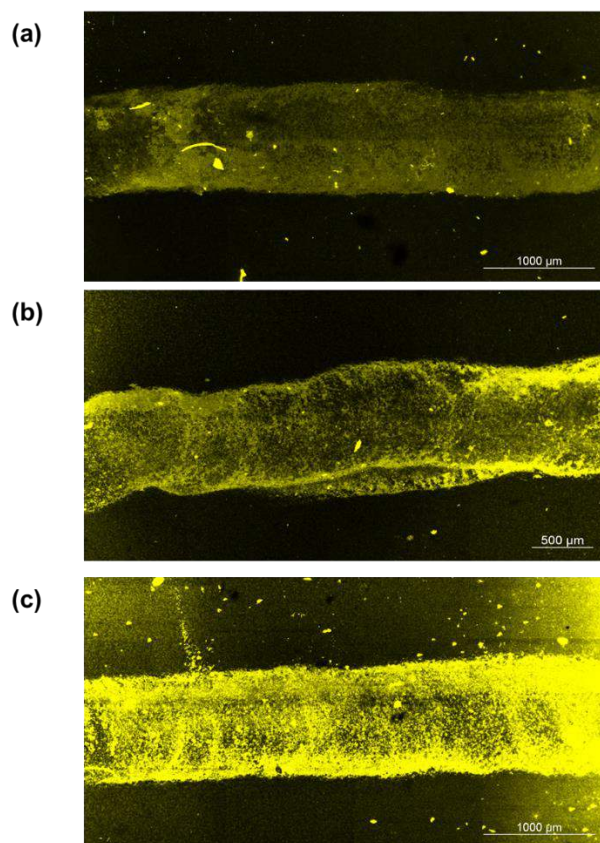


Figura 31 – Imagens de microscopia confocal de tiras de fluxo lateral após eluição de concentrações de tetraciclina (a) 10 mg L⁻¹; (b) 25 mg L⁻¹ e (c) 90 mg L⁻¹ para linha de teste contendo MIP de alta porosidade.

Fonte: autor do trabalho.

A eluição de diferentes concentrações de tetraciclina (10, 25 e 90 mg L⁻¹) exibiu um aumento na fluorescência da linha de teste com o aumento da concentração; ilustrando assim a capacidade de ligação do MIP pela tetraciclina e viabilidade da quantificação nesses sistemas.

4.4.1.2 Reação colorimétrica para determinação de tetraciclina

A tetraciclina apresenta alta afinidade por cátions metálicos, formando complexos cuja estabilidade e coloração que variam de acordo com o metal. (121) Os estudos iniciais basearam-se em reações qualitativas da tetraciclina com os seguintes metais (em ordem decrescente de afinidade): Fe³⁺, Al³⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Sn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺.

Avaliando soluções de tetraciclina e dos metais preparadas em água, na concentração inicial de 5,6×10⁻⁵ mol L⁻¹, apenas com o Fe³⁺ observou-se a formação de um complexo de coloração amarelo âmbar intenso, como exibe a Figura 32.

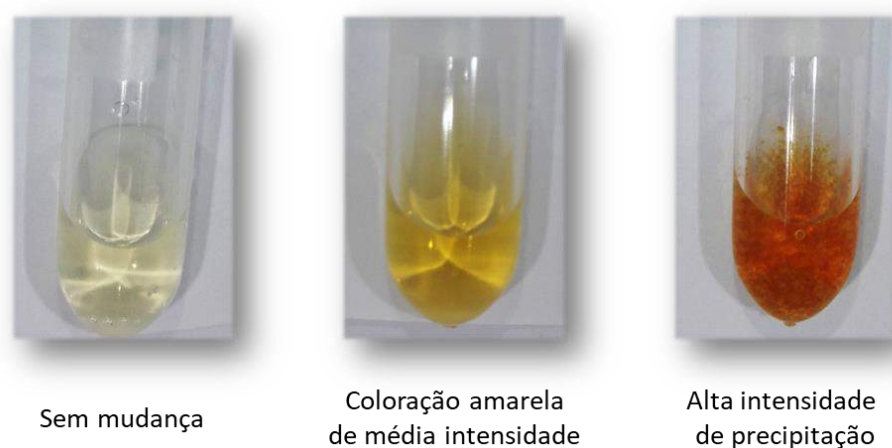


Figura 32 – Ensaio qualitativo exibindo a formação do complexo entre tetraciclina e Fe^{3+} . Mantendo-se o volume de tetraciclina ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) constante, gotas de FeCl_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionadas. Da esquerda para a direita, ausência de reação (sem mudança), complexo formado (coloração amarela) e excesso de reagentes (alta intensidade de precipitação).

Fonte: autor do trabalho.

Conforme exibidas nas soluções apresentadas na Figura 32, ao atingir a proporção ideal entre tetraciclina e Fe^{3+} , observa-se o complexo amarelo cuja intensidade vai aumentando até que, ao atingir o excesso de reagentes, começa a ocorrer precipitação do complexo formado.

Para os outros metais avaliados nada foi observado e, com o intuito de verificar se esse fenômeno dependia de fatores como concentração ou proporção dos reagentes, soluções saturadas de tetraciclina e dos metais foram preparadas e avaliadas em diferentes proporções.

Para o Cu^{2+} foi obtido um complexo verde-água após alguns minutos de interação. Possivelmente as águas de hidratação características da estrutura do sal de cobre influenciaram na reação, fazendo com que o tempo de formação do complexo fosse mais longo quando comparado com o complexo de ferro. Para o Sn^{2+} observou-se precipitação; e, para os demais metais avaliados, nada ocorreu. Portanto, optou-se por seguir o trabalho com Fe^{3+} , cuja complexação com a tetraciclina ocorreu em baixas concentrações, tempo mais rápido e com uma boa intensidade de cor quando comparado com o complexo de cobre.

Considerando um equilíbrio no qual vários complexos podem ser formados, a estequiometria do complexo foi determinada por meio de medidas de absorvância de soluções contendo diferentes proporções molares de metal (Fe^{3+}) e ligante (tetraciclina), conforme exibido pela Figura 33 a seguir.

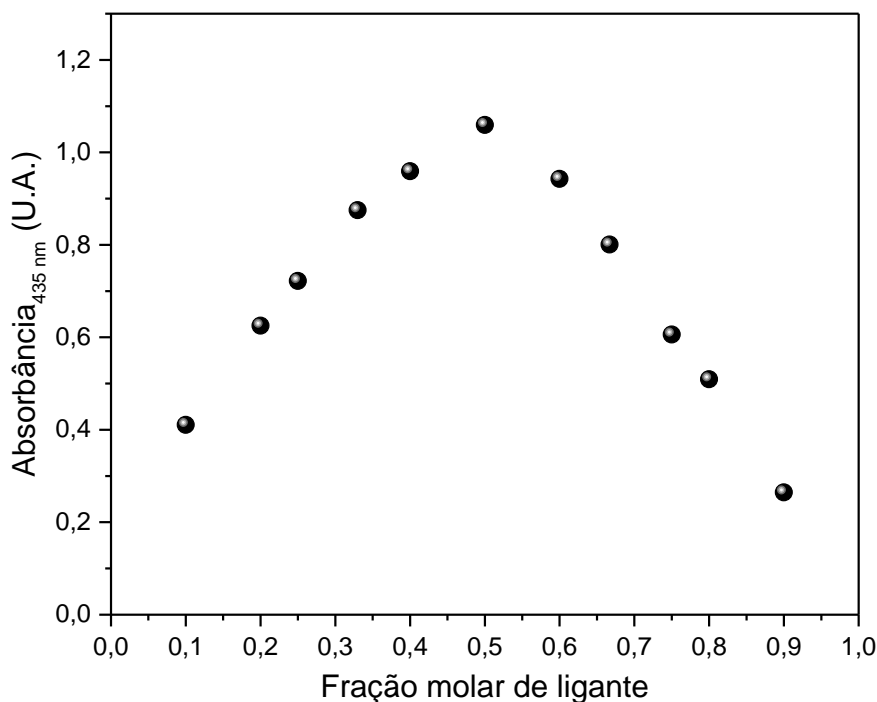


Figura 33 – Absorbância do complexo formado em função de diferentes proporções de tetraciclina e Fe^{3+} (representadas como fração molar da tetraciclina) para determinação da estequiometria da reação.

Fonte: autor do trabalho.

Como exibido pelo gráfico da Figura 33, a absorbância máxima foi obtida para fração molar de ligante igual a 0,5; ou seja, a proporção é 1 metal: 1 ligante (complexo do tipo ML). Esse resultado é condizente com estudos mostraram que a tetraciclina atua como um ligante polidentado com metais na proporção 1:1 e que, em pH elevados, pode formar complexos do tipo ML_2 . (121)

A estrutura da tetraciclina contém alguns sítios nos quais pode ocorrer a quelação com cátions metálicos, sendo o mais importante no nível inferior da molécula que contém duas 1,3-dicetonas. (121) Outros experimentos envolvendo a síntese de complexos entre tetraciclina e metais mostraram que o sítio de ligação entre tetraciclina e Fe^{3+} pode variar de acordo com a condição experimental; sendo reportados como sítios possíveis $\text{O}_3\text{-N}_4$, $\text{O}_3\text{-O}_{\text{amida}}$ e $\text{O}_3\text{-N}_{\text{amida}}$ (conforme posições especificadas na Figura 1). (11) A Figura 34 destaca essa região de possível interação.

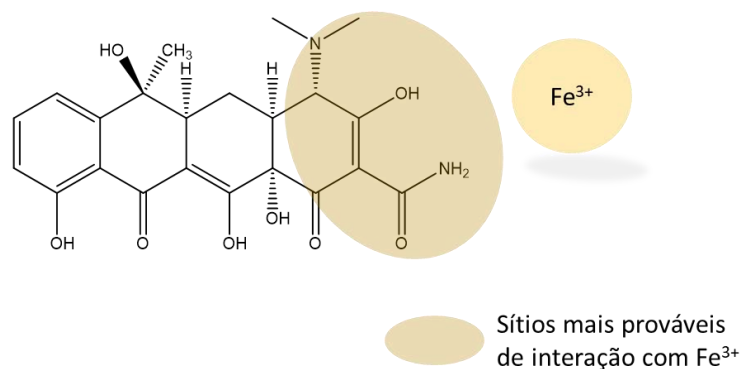


Figura 34 – Representação esquemática da reação de complexação, com destaque na fórmula estrutural da tetraciclina para os sítios mais prováveis de interação com o Fe³⁺.

Fonte: autor do trabalho.

A tetraciclina possui três pKa diferentes: 3,3; 7,7 e 9,7. Abaixo de pH 3,3 a molécula possui carga positiva (amina terciária protonada); se $3,3 < \text{pH} < 7,7$ a tetraciclina está na forma zwitteriônica (grupo OH entre a amina e a amida está desprotonado) e acima de pH 7,7 a molécula possui carga negativa (amina fica desprotonada e os grupos OH de C₁₀ e C₁₁ são desprotonados). (122)

A região da tetraciclina destacada na Figura 34 corresponde ao sítio mais provável uma vez que no pH de trabalho (pH 7,4) o grupo OH dessa região está desprotonado; e, deste modo, essa região de alta densidade eletrônica torna-se facilmente disponível para o Fe³⁺. Portanto, também é possível inferir que o pH da solução influencia na reação de complexação, de acordo com a protonação/desprotonação da molécula. Ademais, esse fato experimental observado condiz com dados reportados em outros trabalhos. (11)

Também foi avaliado o tempo de reação para formação do complexo conforme a proporção obtida anteriormente de 1 metal : 1 ligante, como exhibe a Figura 35.

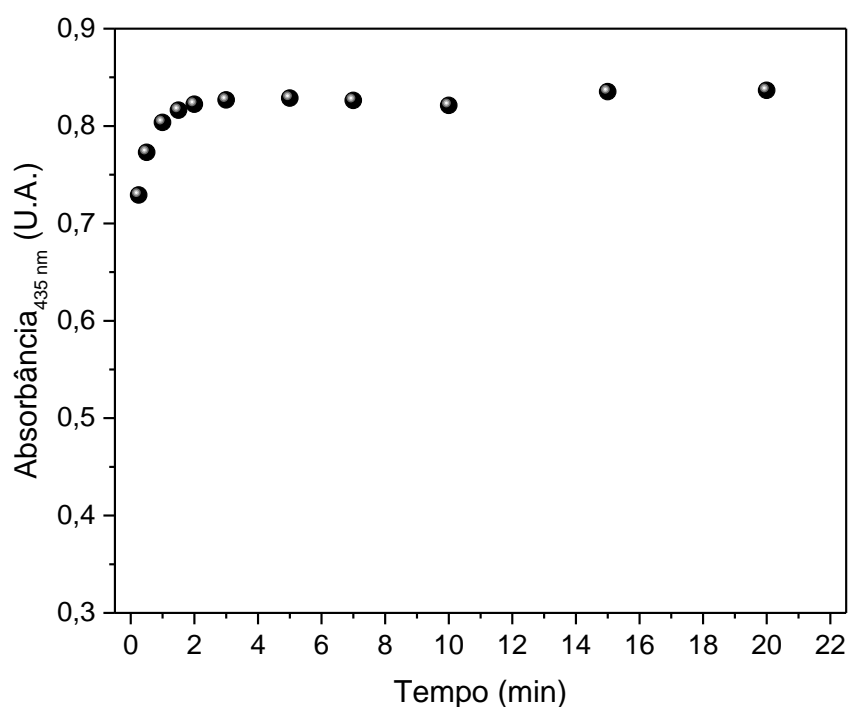


Figura 35 – Estudo cinético (de 15 s até 20 min) da reação de complexação entre tetraciclina e Fe³⁺. Mistura preparada em água ultrapura na proporção 1 tetraciclina : 1 Fe³⁺ (v/v).

Fonte: autor do trabalho.

O ensaio cinético mostrou que a reação de complexação ocorre rapidamente, sendo que a partir de dois minutos não se verifica mais mudanças nos valores de absorvância. Ademais, é importante notar que, a partir de 1 min, a diferença de valores de absorvância para o tempo de equilíbrio em 2 min é praticamente constante; respectivamente 0,80 e 0,82 U.A.

Dessa forma, o estudo mostra que a reação colorimétrica é viável para ser utilizada no sistema de fluxo lateral; uma vez que as corridas duram ao redor de 5 min e, até que os reagentes cheguem na linha de teste, o tempo varia em torno de 1 a 2 min dependendo da porosidade da membrana de nitrocelulose utilizada.

Previamente ao início da avaliação da influência dos diferentes parâmetros, a reação de complexação foi realizada no sistema de fluxo lateral para avaliar sua viabilidade e o efeito dos reagentes nas membranas (celulose, fibra de vidro e nitrocelulose) que compõe o sistema; conforme a Figura 36.

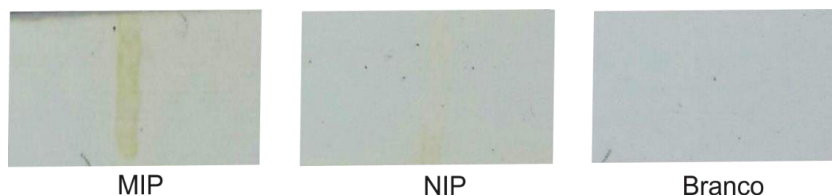


Figura 36 – Eluição de tetraciclina ($0,22 \text{ mol L}^{-1}$ em água) utilizando solução tampão de corrida na tira de fluxo lateral contendo MIP e NIP de alta porosidade depositados e posterior reação colorimétrica com FeCl_3 ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em água). O branco consiste em MIP depositado na membrana após a eluição de todos os reagentes exceto o analito.

Fonte: autor do trabalho.

Pela Figura 36 acima é possível observar que a reação colorimétrica ocorreu conforme o esperado, sem que a eluição dos reagentes causasse algum tipo de dano nas membranas. Nas membranas de nitrocelulose foram imobilizados MIP e NIP e para o branco foi depositada uma linha de MIP. Após a eluição da tetraciclina realizou-se a eluição do FeCl_3 ; gerando o complexo de coloração amarelo âmbar. Também é possível visualizar, pela comparação das intensidades da coloração gerada, que o MIP reteve a tetraciclina e que no NIP ela foi muito menos significativa. O branco mostra que tanto a solução tampão de corrida quanto o Fe^{3+} não interagem com o MIP, não sendo observada nenhuma resposta colorimétrica.

4.4.1.3 Quantificação no sistema de fluxo lateral

As quantificações da resposta colorimétrica (mensuradas em absorbância) foram realizadas pela obtenção de imagens utilizando um smartphone e posterior tratamento delas utilizando o software livre *ImageJ* para obter as intensidades de cor do canal RGB, como detalhado no procedimento experimental (item 4.3.3.3). Para o sistema proposto, o canal azul (B) foi escolhido por fornecer a maior intensidade de cor para o analito (cor complementar mais próxima à do composto de coordenação).

Os parâmetros como tempo de obtenção da imagem e intensidade da iluminação foram estudados em simultâneo, conforme exhibe a Figura 37.

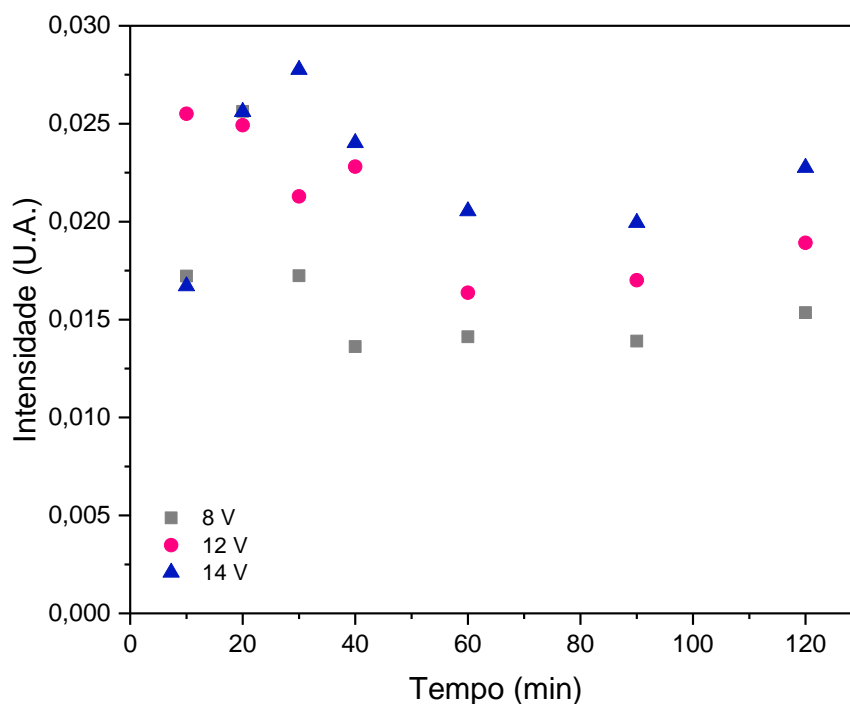


Figura 37 – Intensidade do sinal colorimétrico em função da intensidade de iluminação (8 – 14 V) e do tempo de obtenção da imagem após o início da reação (10 – 120 min). Eluição de FeCl_3 0,6% (m/v) e tetraciclina $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: autor do trabalho.

Na avaliação inicial de quantificação o tempo de obtenção da imagem foi cronometrado logo após a adição do FeCl_3 e início da reação colorimétrica. A intensidade de iluminação foi avaliada de acordo com o potencial (de 8, 12 ou 14 V) aplicado nas lâmpadas de LED.

A quantificação das tiras mostrou influência tanto do tempo quanto da iluminação no sinal obtido. Experimentalmente, observou-se que até 30 min as tiras encontravam-se muito úmidas, ou seja, finalizando a eluição de todos os reagentes e solução de corrida. Essa variação da composição da tira se reflete nos valores obtidos que variam para todas as iluminações avaliadas. Experimentalmente observou-se que a partir de 50 min a membrana de nitrocelulose já estava seca e, para a quantificação, a partir de 60 min os valores de intensidade, embora ligeiramente menores, se mantiveram praticamente constantes até 120 min.

Considerando que para maior intensidade de iluminação (14 V) obteve-se sinais mais intensos e que o tempo de secagem maior garante que todas as tiras estejam nas mesmas condições no momento da quantificação, optou-se por realizar a obtenção das imagens em 60 min e sob aplicação de 14 V na iluminação dos LEDs.

4.4.1.4 Avaliações iniciais no sistema de fluxo lateral

Nos ensaios prévios de viabilidade do sistema, foi realizada a tentativa de depositar o Fe^{3+} na tira conjugada, conforme a estrutura clássica do fluxo lateral. No entanto, isso não foi possível uma vez que, após seco, o FeCl_3 não eluiu mais.

Foram realizados diversos testes variando bloqueio prévio da tira conjugada, tempo de secagem, quantidade de FeCl_3 depositada, etc. Nenhum dos parâmetros variados e avaliados funcionou. O Fe^{3+} não eluiu ou, quando eluiu, foi de maneira não uniforme e manchando toda membrana de nitrocelulose.

Deste modo, optou-se por realizar o teste de modo diferente. Primeiro foi eluído o analito com excesso de solução de corrida e, logo após, adicionou-se FeCl_3 logo no início da membrana, para eluir até chegar na linha de teste. Esse procedimento apresentou bons resultados e que foram reprodutíveis nos testes de triagem realizados; e, portanto, foi adotado como modo de eluição para esse sistema.

A primeira quantificação realizada, como mostra a Figura 38, foi o comportamento da reação colorimétrica e do Fe^{3+} frente à um MIP seletivo para biotina e para o MIP oco de alta porosidade seletivo à tetraciclina; bem como a influência da forma da tetraciclina (estrutura nativa ou forma de sal, o cloridrato de tetraciclina) no sistema.

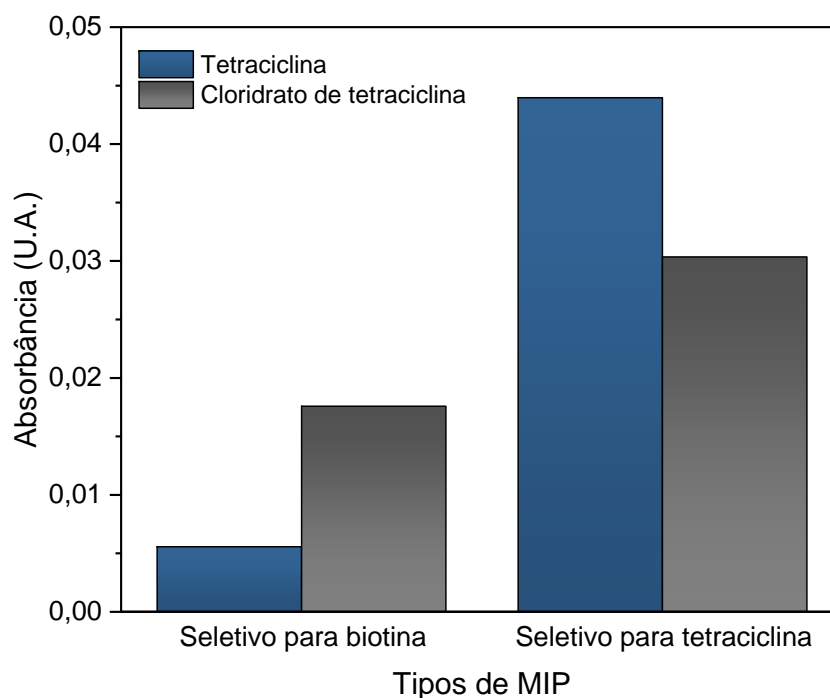


Figura 38 – Avaliação da seletividade da reação colorimétrica frente à um MIP para tetraciclina e para outro analito (MIP para biotina) - 0,05 mg de MIP depositado - e comparação simultânea entre os diferentes tipos de tetraciclina. Condições: eluição de tetraciclina ($5,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e reação colorimétrica com FeCl₃ 0,6% (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

Pela Figura 38 acima é possível observar que, após a reação de complexação que acontece durante o fluxo dos reagentes, a tetraciclina continua se ligando preferencialmente ao MIP e gera o sinal colorimétrico mais intenso (0,045 U.A.). Quando colocada em contato com outro MIP (seletivo para biotina) o sinal obtido foi nove vezes menor, indicando que a seletividade do MIP e a preferência da tetraciclina em se ligar ao material permanece após a reação colorimétrica.

Avaliando o MIP para tetraciclina, é possível observar que a estrutura da tetraciclina (tetraciclina ou cloridrato de tetraciclina) influencia na formação do complexo e, conseqüentemente, no sinal obtido. Uma das condições que influencia na formação do complexo é o pH e, possivelmente, o cloridrato de tetraciclina, por ser um sal ácido, está alterando a proporção do complexo formado; sendo obtido assim um sinal menos intenso do que para a tetraciclina.

A seguir foi avaliada a influência do tipo de solvente de corrida utilizado no sinal colorimétrico obtido, como exibe a Figura 39.

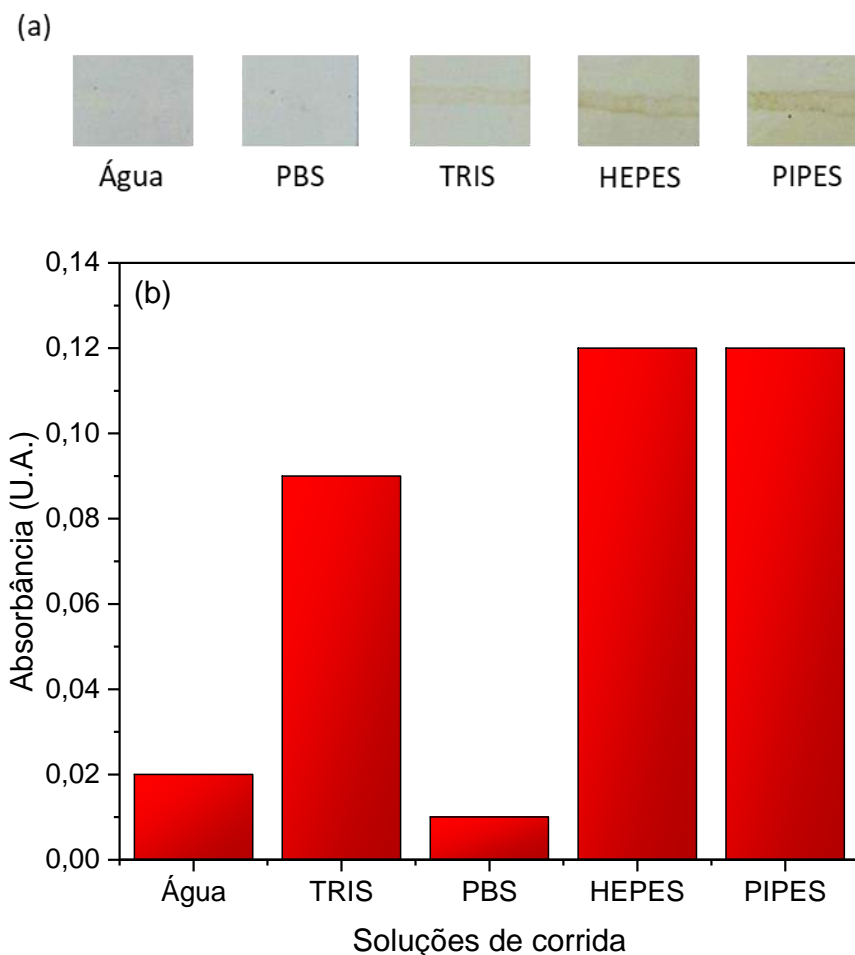


Figura 39 – Avaliação do efeito da composição da solução de corrida no sinal colorimétrico comparando água ou diferentes soluções tampão. (a) Identificação qualitativa e (b) Quantificação das respostas colorimétricas. Todas as soluções tampão na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4. Eluição de tetraciclina ($5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e FeCl_3 0,6 % (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

Como exibido na Figura 39 acima, água e solução tampão fosfato apresentaram o pior desempenho. Qualitativamente não foi observado o surgimento da linha utilizando nenhuma dessas duas soluções.

As soluções HEPES e PIPES apresentaram maior intensidade de sinal e com valores semelhantes; ao redor de 0,12 U.A. No entanto, a solução tampão PIPES eluiu com dificuldade pela tira de fluxo lateral, sendo necessário adicionar quantidades muito maiores de solvente e com um tempo maior de eluição. Deste modo, a solução tampão HEPES foi adotada para os ensaios posteriores.

Em todos os ensaios realizados até então observou-se um sinal de fundo intenso referente ao complexo formado durante a eluição pela tira. O excesso de reagentes acaba ficando na membrana e, ao interagirem, geram resposta colorimétrica que não se restringe somente à linha de teste.

Com o intuito de tentar minimizar o sinal de fundo gerado na reação colorimétrica, um ensaio qualitativo para avaliação do bloqueio da membrana de nitrocelulose utilizando dois diferentes agentes foi realizado, como mostra a Figura 40.

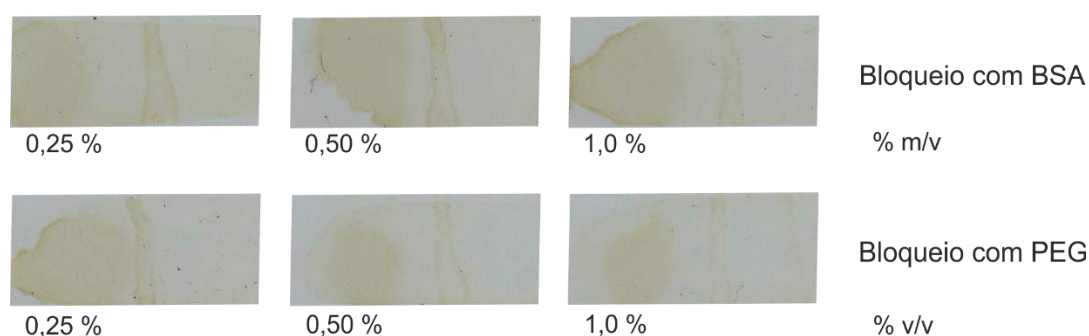


Figura 40 – Bloqueio da membrana de nitrocelulose utilizando diferentes proporções de BSA e PEG. Eluição com solução tampão de corrida HEPES, tetraciclina $5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e FeCl_3 0,6 % (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 40 acima exhibe os resultados de bloqueio após a reação colorimétrica utilizando albumina do soro bovino (BSA) e polietileno glicol (PEG) como agentes de bloqueio. Para nenhum dos dois reagentes, independente da proporção avaliada, o bloqueio foi efetivo. Também foi possível observar uma mancha intensa no local onde o Fe^{3+} foi adicionado, o que não ocorre com tanta intensidade na membrana sem bloqueio.

Além disso, o bloqueio da membrana causou dificuldade na deposição do MIP. Com os poros da membrana menos disponíveis as linhas de MIP depositadas ficaram muito irregulares, fato não observado na deposição com a nitrocelulose sem bloqueio.

Deste modo, utilizando solução tampão HEPES como eluente, optou-se por seguir os ensaios sem realizar o bloqueio da membrana. Para minimizar o sinal de fundo gerado, foram avaliados parâmetros como concentração de FeCl_3 e de tetraciclina.

4.4.1.5 Otimização dos parâmetros do ensaio

Após o estudo da reação colorimétrica, os parâmetros que influenciam o sinal obtido tanto qualitativa quanto quantitativamente como concentração dos reagentes, composição da solução tampão, MIP etc. foram avaliados.

Inicialmente avaliou-se a concentração de FeCl_3 para a resposta colorimétrica. Em função dos resultados obtidos anteriormente que mostraram sinal de fundo

intenso, concentrações menores de Fe^{3+} foram avaliadas em relação à utilizada nos ensaios preliminares (0,6% m/v). Para as concentrações avaliadas de 0,1 e 0,25% m/v não foi apresentado sinal visual, apenas para 0,5% e 0,6% m/v.

Como não foi possível diminuir muito a concentração do FeCl_3 , avaliou-se as menores concentrações com resposta visual sem gerar sinal de fundo intenso.

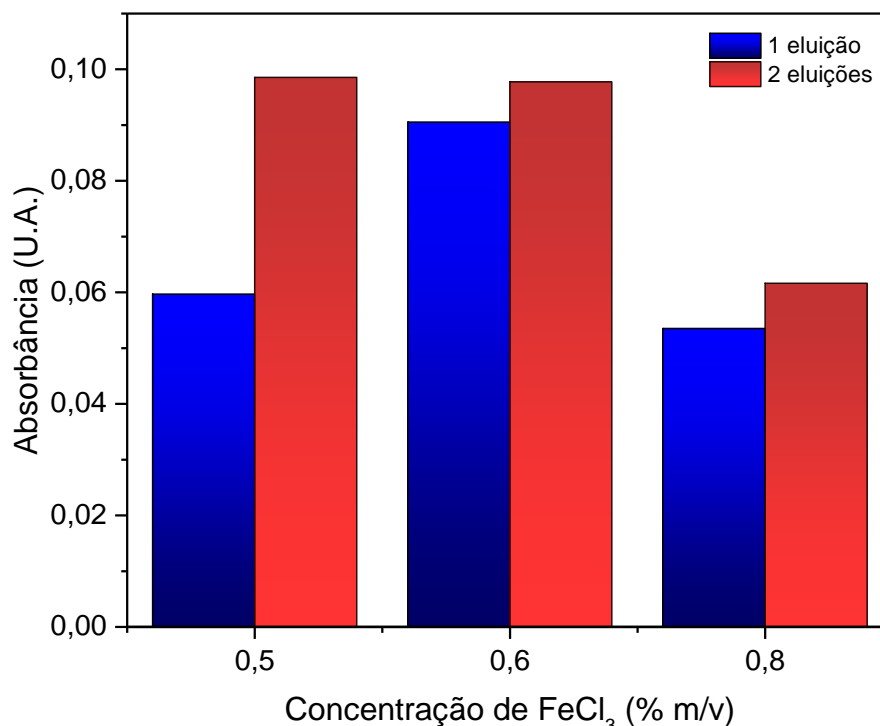


Figura 41 – Avaliação do efeito da concentração e da quantidade de eluições de FeCl_3 no sinal colorimétrico da reação de complexação. Eluição de tetraciclina $0,22 \text{ mol L}^{-1}$ com solução tampão HEPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4. O volume de FeCl_3 para cada eluição de $10,0 \mu\text{L}$.

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 41 exibe as concentrações de Fe^{3+} avaliadas e a quantidade de vezes que se adicionou o reagente na membrana. É possível observar que eluir duas vezes a concentração de 0,5 % (m/v) apresentou o mesmo sinal de que eluir uma vez a concentração de 0,6% (m/v).; cujos sinais foram os mais intensos. Considerando o modo de realização do teste, que consistiu em adicionar a tetraciclina primeiro e o FeCl_3 depois, optou-se por realizar duas adições da solução de 0,5% (m/v), de modo a garantir que o Fe^{3+} interaja com o máximo de tetraciclina que ainda possa estar eluindo pelo sistema ao mesmo tempo que já se ligue à tetraciclina retida no MIP.

Uma vez que já havia sido otimizada previamente a composição de solução tampão corrida, foi avaliada a concentração ideal e a intensidade do sinal colorimétrico gerado de acordo com o tipo de membrana, conforme exhibe a Figura 42.

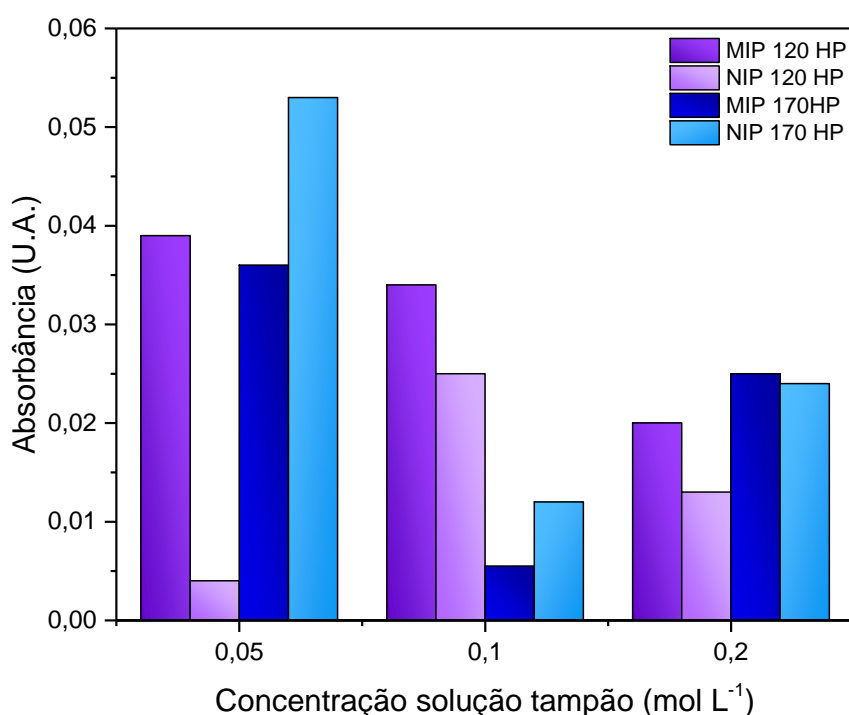


Figura 42 – Avaliação do efeito da concentração da solução tampão HEPES a pH 7,4 na intensidade do sinal colorimétrico nas membranas 120 HP e 170 HP. Tetraciclina $5,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e suspensão de polímeros depositados 5,0 mg mL⁻¹.

Fonte: autor do trabalho.

Entre as membranas comerciais disponíveis, a nitrocelulose 120 HP possui velocidade de ascensão capilar intermediária (90 – 150 s/4 cm), o que permite uma boa relação entre intensidade de sinal e velocidade de eluição. A membrana 170 HP possui ascensão capilar mais lenta (140- 200 s/4 cm), e conseqüentemente, maior tempo de interação entre analito e fase de reconhecimento. Como observado, ela permitiu maior tempo de contato entre tetraciclina e o NIP, aumentando assim as interações inespecíficas.

Comparando o comportamento do MIP e NIP nas duas membranas, para a membrana 120 HP obteve-se resultados satisfatórios para a intensidade do sinal e seletividade entre os polímeros. Para a concentração de 0,05 mol L⁻¹ de solução tampão HEPES foi obtido o sinal mais intenso para o MIP e com melhor diferenciação de sinal entre polímero impresso e não-impresso. Nas concentrações de 1,0 e 2,0 mol L⁻¹ os resultados de intensidade de sinal foram inferiores. Deste modo, os ensaios

posteriores foram realizados utilizando solução tampão HEPES $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4 como eluente e na membrana de nitrocelulose 120 HP.

Como discutido, todas as provas de conceito anteriores utilizando a reação de complexação foram realizadas com o MIP de alta porosidade; uma vez que nos estudos de otimização da eficiência desse polímero ele apresentou melhores resultados (como discutido no Capítulo 1). Com a intenção de verificar se o perfil de funcionamento para os diferentes polímeros sintetizados no fluxo lateral condiz com os obtidos por cromatografia, todos os materiais (tradicional, *core-shell* e alta porosidade) e seus respectivos controles foram depositados na membrana de nitrocelulose.

Em conjunto com os diferentes polímeros, avaliou-se a influência da diferença de porosidade da membrana de nitrocelulose no sinal colorimétrico obtido; conforme exibido pela Figura 43 a seguir.

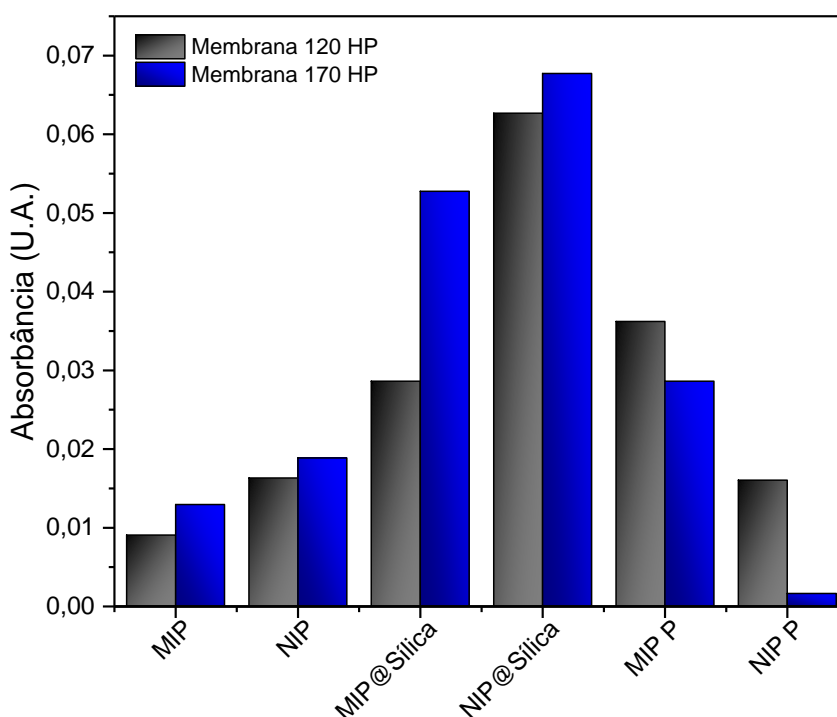


Figura 43 – Avaliação dos polímeros biomiméticos sintetizados: tradicional (MIP), core-shell contendo núcleo de sílica (MIP@Silica) e de alta porosidade (MIP P); e os respectivos controles (NIP). 120 HP corresponde à membrana de fluxo mais rápido e 170 HP à membrana de fluxo mais lento. Condições de eluição: tetraciclina $5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e FeCl_3 0,05% (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

Pelas quantificações exibidas na Figura 43 acima pode-se observar que os polímeros apresentaram diferentes comportamentos de retenção; tanto de acordo

com o tipo de MIP desenvolvido quanto a membrana de nitrocelulose na qual o material foi depositado.

O MIP tradicional apresentou a menor quantidade de tetraciclina retida em comparação com os outros dois tipos de MIP; além do NIP ter apresentado maior retenção. Além disso, independentemente do tipo de membrana de nitrocelulose utilizado, não houve variação significativa na capacidade de retenção ou diferenciação entre MIP e NIP.

O MIP do tipo *core-shell* (MIP@SiO₂) foi o que apresentou maior retenção pela tetraciclina, sendo que a diferença entre as membranas alterou a capacidade de retenção do material. Na membrana com fluxo mais lento (170HP) o polímero impresso reteve mais tetraciclina, possivelmente pelo fato de que analito e polímero tiveram maior tempo de contato. No entanto, para as duas membranas de nitrocelulose avaliadas, o NIP@SiO₂ apresentou maior capacidade de retenção; indicando que houve interação não seletiva.

O MIP de alta porosidade apresentou os melhores resultados de retenção, com diferenciação entre o polímero impresso e o controle independente do fluxo do solvente ser mais lento ou mais rápido. Em fluxo mais rápido (membrana 120 HP) o MIP de alta porosidade apresentou a melhor capacidade de retenção quando comparado aos outros dois tipos de MIP e NIP com menor retenção da tetraciclina. Ademais, no fluxo mais lento houve melhor diferenciação entre MIP e NIP de alta porosidade.

Deste modo, é possível observar que o comportamento dos polímeros (principalmente na membrana de fluxo rápido) foi muito semelhante aos resultados dos ensaios e otimizações realizados anteriormente por cromatografia líquida. Portanto, optou-se por seguir aplicando o MIP de alta porosidade nas tiras de fluxo lateral.

Para verificar a quantidade ideal de MIP a ser depositada na membrana, suspensões de MIP de diferentes concentrações foram preparadas e avaliadas na reação colorimétrica, conforme a Figura 44 a seguir.

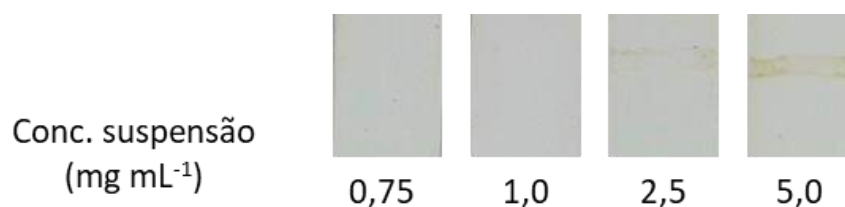


Figura 44 – Resposta colorimétrica para eluição de tetraciclina ($5,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) nas tiras de fluxo lateral contendo diferentes concentrações (0,75 – 5,0 mg mL⁻¹) de MIP de alta porosidade depositado. Eluente: solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ a pH 7,4.

Fonte: autor do trabalho.

Como exibe a Figura 44, a partir de 2,5 mg mL⁻¹ de suspensão depositada que se pode observar uma resposta colorimétrica de baixa intensidade. Para 5,0 mg mL⁻¹ de MIP o sinal foi mais intenso, formando uma linha visível com boa intensidade. Também foram avaliadas concentrações de 7,5 e 10,0 mg mL⁻¹ e, embora obtido sinal colorimétrico, a quantidade de polímero depositada foi muito elevada, formando uma linha branca visível após a deposição. Portanto, como as concentrações mais elevadas se tornaram inviáveis, a deposição de 5,0 mg mL⁻¹ foi adotada como ideal.

Deste modo, com a caracterização e otimizações da linha de teste concluídas, iniciou-se o desenvolvimento da linha de controle.

4.4.1.6 Construção da linha de controle

A linha de controle nos testes de fluxo lateral tradicionais é construída para verificar o funcionamento e efetividade da biomolécula conjugada à NP responsável pela resposta colorimétrica visual.

Como o teste proposto utilizando MIP possui estrutura diferente da tradicional, a linha de controle foi baseada na verificação do cátion Fe³⁺, o qual é responsável pela resposta visual ao interagir com a tetraciclina. Para tanto, foi utilizado como controle o ferrocianeto de potássio.

O ferrocianeto possui seletividade pelo Fe³⁺ e, ao interagirem, formam um composto de coloração azul intensa, o hexacianoferrato (II) de ferro (III), conhecido também como azul da prússia. A reação da formação do composto de coordenação é dada por: $4 \text{Fe}^{3+} + 3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \rightleftharpoons \text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$.

Deste modo, foi avaliada inicialmente a deposição do ferrocianeto e depois a resposta da linha de controle, como exibe a Figura 45.

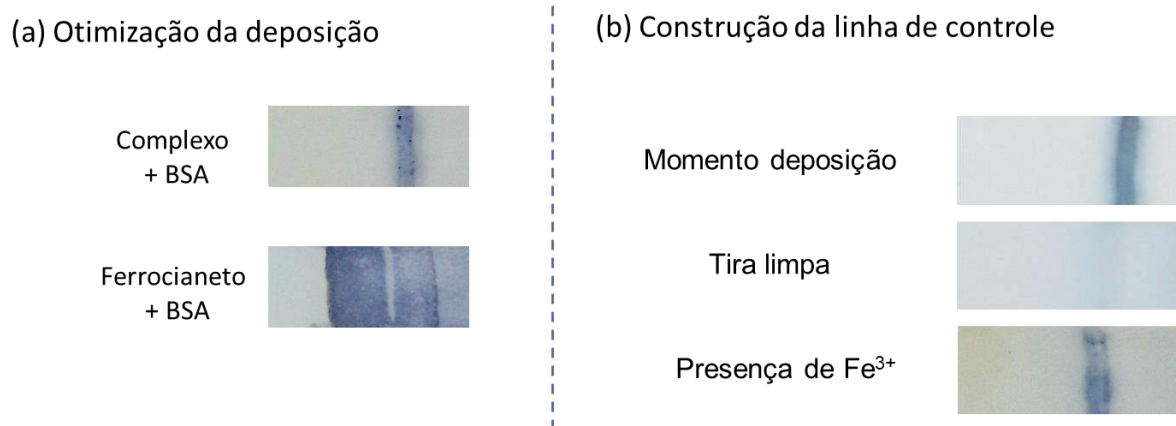


Figura 45 – (a) Avaliação do modo de deposição do ferrocianeto livre e na forma de complexo com o Fe^{3+} , tanto na presença quanto na ausência de BSA. (b) Construção da linha de controle pela deposição do complexo azul da prússia+BSA, seguida pela limpeza para remover o excesso de reagentes e a eluição de Fe^{3+} que exibe o retorno da coloração azul da linha de controle.

Fonte: autor do trabalho.

Inicialmente foi avaliada a deposição direta do ferrocianeto na membrana de nitrocelulose, alternando entre diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 mg mL^{-1}) e volumes (1, 2 e 4 μL) depositados. Nenhuma tentativa funcionou, uma vez que ao eluir o Fe^{3+} a membrana se manchou de azul e nenhuma linha foi formada. Uma nova tentativa foi avaliada pela mistura entre ferrocianeto e BSA.

Pela Figura 45a é possível observar que a interação esperada entre ferrocianeto e BSA para formar uma linha não ocorreu, sendo observada a mancha azul na tira. Uma alternativa encontrada foi preparar o complexo azul da prússia primeiro, depositá-lo diretamente formando uma linha, limpar a tira e depois eluir o Fe^{3+} . Como pode ser observado, formou-se uma linha azul de boa intensidade.

Deste modo, a construção da linha foi realizada conforme as imagens da Figura 45b. No momento da deposição observa-se a linha azul referente ao complexo. Após 30 min de secagem, a tira é lavada com solução tampão e a linha azul desaparece. Por fim, no momento da corrida do teste, quando o Fe^{3+} é eluído, a coloração azul aparece, indicando que há ferrocianeto depositado e livre para interagir com o Fe^{3+} .

Por fim, verificou-se se a presença do analito no teste positivo influenciaria o sinal da linha de controle, conforme exibe a Figura 46.

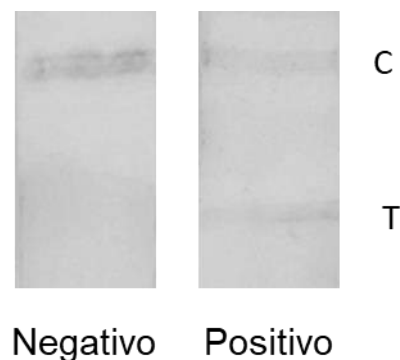


Figura 46 – Avaliação do sistema de fluxo lateral contendo as linhas de teste (MIP de alta porosidade) e controle (ferrocianeto de potássio). Eluente: solução tampão HEPES $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4 , FeCl_3 0,05 % (m/v) e no teste positivo adição de tetraciclina $20,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Fonte: autor do trabalho.

Como apresentado na Figura 46, a intensidade do sinal da linha de controle diminuiu ligeiramente no teste positivo em comparação com o negativo. Esse fenômeno era esperado uma vez que, como em todo teste, a presença do analito consome parte do reagente colorimétrico disponível para reação. No entanto, a mudança da intensidade de sinal não gera problemas, uma vez que a linha controle serve apenas para validação e não é quantificada.

4.4.1.7 Obtenção da curva analítica

O sistema de fluxo lateral permitiu tanto a avaliação qualitativa quanto quantitativa da tetraciclina.

O valor de corte (*cutoff*), definido como a concentração limiar a partir da qual a linha de teste apresentou coloração observada a olho nu, foi definida como o LOD visual. O valor de *cutoff* experimental obtido foi de $34 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tetraciclina para as tiras contendo MIP depositado.

A resposta visual e a curva analítica obtida para o sistema de fluxo lateral contendo MIP na linha de teste são exibidas pela Figura 47.

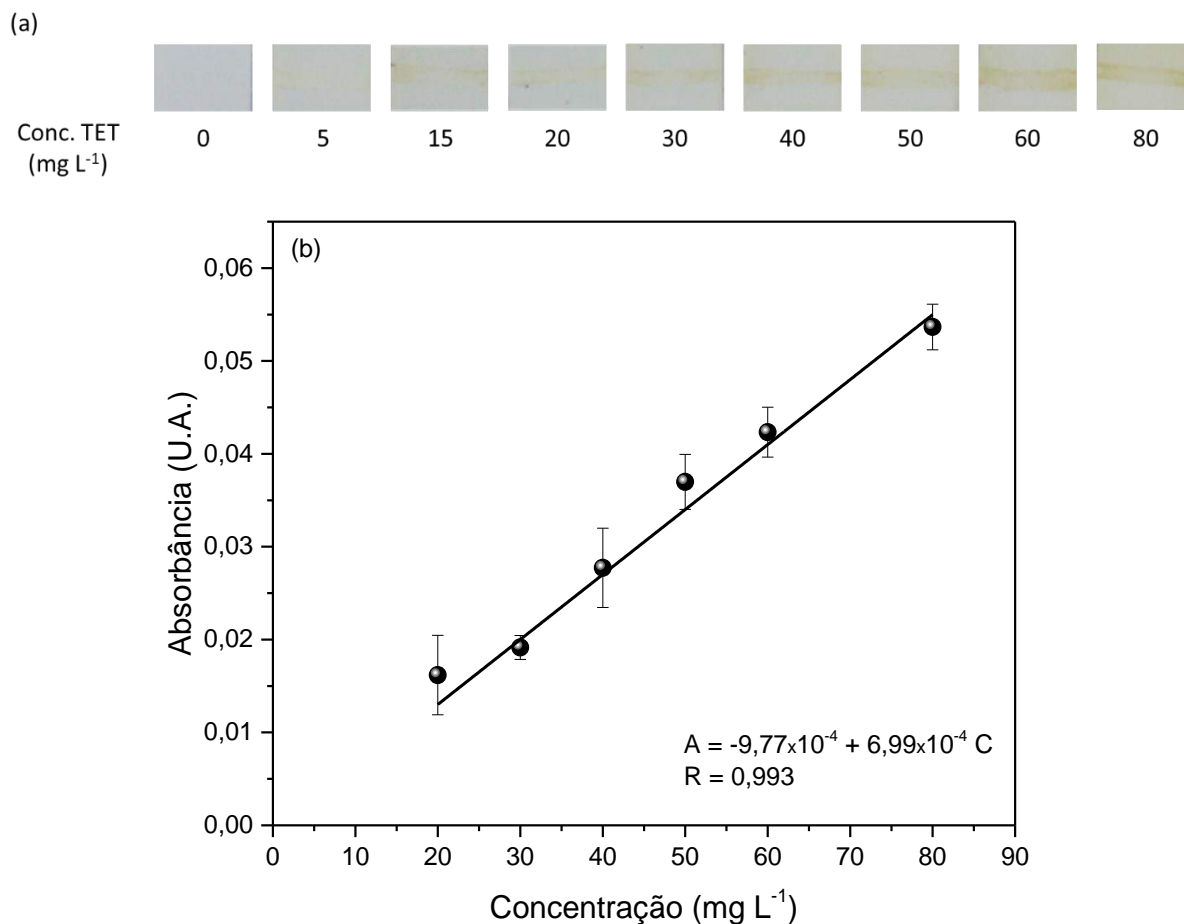


Figura 47 – (a) Resposta visual das membranas de fluxo lateral contendo MIP após eluição de diferentes concentrações de tetraciclina. (b) Curva analítica com região linear de 20 – 80 mg L⁻¹ para o sistema de fluxo lateral otimizado contendo MIP depositado. Medidas realizadas em triplicata.

Fonte: autor do trabalho.

A Figura 47a exibe a resposta visual das membranas de fluxo lateral para o intervalo de concentração de tetraciclina avaliado. A intensidade da resposta vai aumentando com o aumento da concentração do analito. A partir da quantificação dessas linhas obteve-se a curva analítica para o sistema, a qual é exibida pela Figura 47b.

Para construção da curva analítica foi avaliado o intervalo de concentrações de tetraciclina de 2 a 80 mg L⁻¹; com intervalo linear determinado de 20 a 80 mg L⁻¹ e coeficiente de correlação igual a 0,993. Os valores de LOD e LOQ obtidos, respectivamente, foram 17 μmol L⁻¹ e 45 μmo L⁻¹.

Para comparação da resposta entre MIP e NIP também foi construída uma curva analítica para o NIP, conforme exibe a Figura 48.

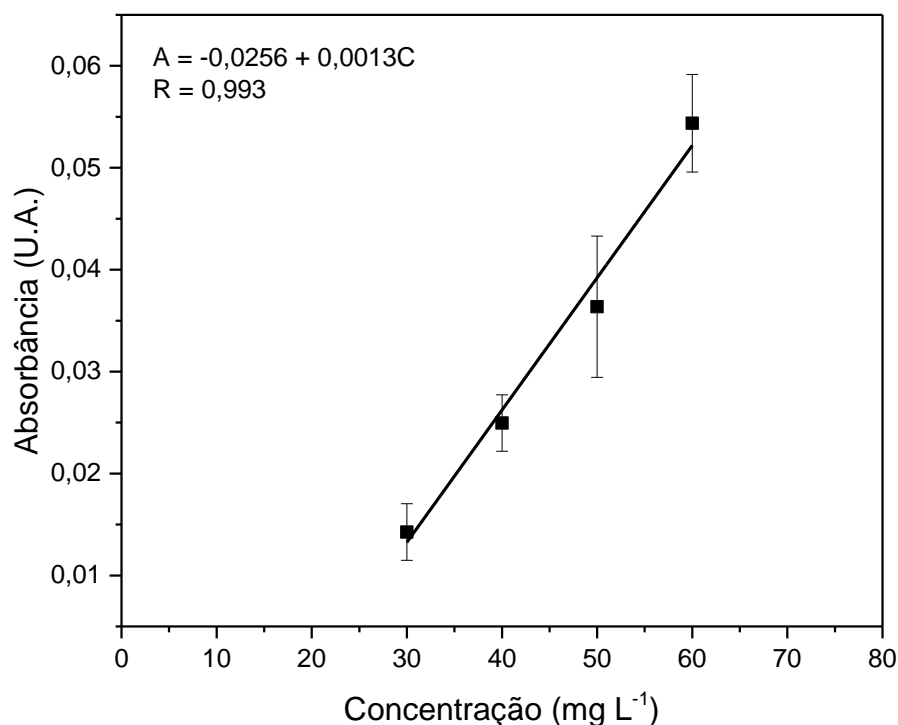


Figura 48 – Região linear da curva analítica (30 – 60 mg L⁻¹) para o sistema de fluxo lateral otimizado contendo NIP depositado. Medidas realizadas em triplicata.

Fonte: autor do trabalho.

Para o sistema controle de NIP, obteve-se uma curva analítica com intervalo linear determinado de 30 a 60 mg L⁻¹. A equação da reta obtida foi $A = -0,0256 + 0,0013C$ e coeficiente de correlação igual a 0,993. Os valores de LOD e LOQ obtidos, respectivamente, foram 24 μmol L⁻¹ e 68 μmo L⁻¹.

Comparando as curvas para o MIP e NIP é possível avaliar que, embora a sensibilidade do sinal da curva para o NIP seja superior, os pontos avaliados na curva apresentam valores de desvio elevados, indicando que a adsorção da tetraciclina no polímero controle apresenta variação significativa e não é homogênea. Já o sistema contendo MIP apresentou faixa linear de trabalho mais ampla e com valores de LOD e LOQ menores e, portanto, as tiras de fluxo lateral contendo MIP são mais sensíveis para determinação de tetraciclina.

4.4.1.8 Avaliação da seletividade e interferência

Os ensaios de seletividade e interferência (ensaio competitivo) foram realizados frente aos mesmos compostos avaliados na otimização do MIP disperso em solução: tetraciclina, minociclina, doxiciclina, norfloxacina, penicilina G, diclofenaco e biotina.

Uma vez que a resposta visual da reação colorimétrica é específica para o analito, a quantificação do ensaio de seletividade foi possível somente para a tetraciclina e seus análogos, conforme exhibe a Figura 49.

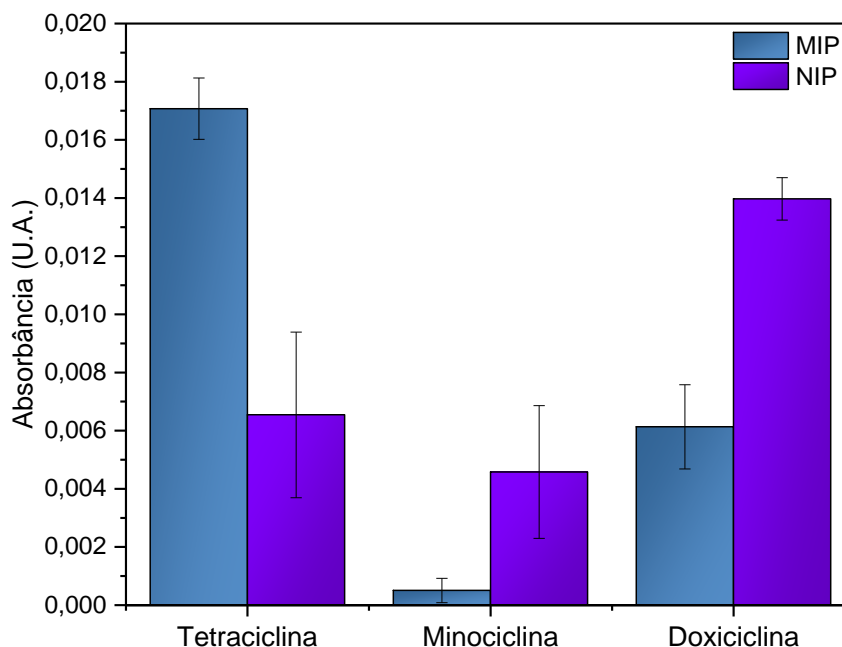


Figura 49 – Ensaio de seletividade para o sistema de fluxo lateral contendo MIP e NIP de alta porosidade depositados. Condições de eluição: tetraciclina, minociclina e doxiciclina na concentração de 50,0 mg L⁻¹; FeCl₃ 0,5% (m/v) e solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ a pH 7,4. Medidas em triplicata.
Fonte: autor do trabalho.

Para os compostos norfloxaxina, penicilina G, diclofenaco e biotina nenhuma tira (MIP/NIP) apresentou sinal visual. Para os análogos estruturais, o ensaio de seletividade exhibe que a minociclina não se ligou ao MIP e a doxiciclina foi retida, mas em quantidade aproximadamente três vezes menor que a tetraciclina. Além disso, a ligação da doxiciclina foi inespecífica, uma vez que o NIP apresenta maior retenção do que o MIP e, indicando assim, que a interação ocorre nos grupos funcionais livres e não na cavidade seletiva. O perfil obtido para a quantificação de ambos os análogos estruturais foi muito semelhante ao observado na avaliação de seletividade do MIP disperso em solução (Capítulo 1).

A visualização qualitativa dos MIPs mostrou um sinal fraco para doxiciclina e ausente para a minociclina e os outros compostos. O NIP do teste para doxiciclina apresentou sinal intenso, enquanto para a tetraciclina o sinal qualitativo foi pouco intenso.

O ensaio competitivo permitiu verificar se a presença de outros compostos interferiram no sinal colorimétrico gerado pela tetraciclina. Para esse ensaio, foi eluída em cada tira uma mistura de TET mais uma molécula interferente, sendo quantificado apenas o sinal da TET, conforme a Figura 50.

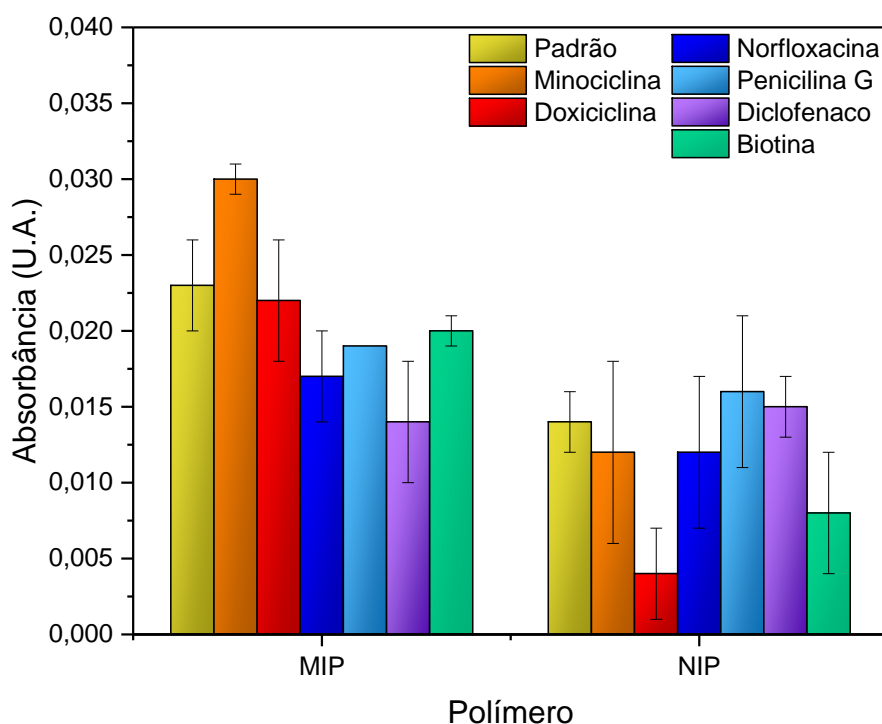


Figura 50 – Ensaio de interferência no fluxo lateral contendo MIP e NIP de alta porosidade depositados. Todas as quantificações para os interferentes correspondem ao sinal gerado pela tetraciclina na mistura. Todos os analitos na concentração de 50,0 mg L⁻¹; FeCl₃ 0,05% (m/v) e solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ a pH 7,4 como eluente. Medidas em triplicata.

Fonte: autor do trabalho.

Na imagem exibida pela Figura 50, no ensaio competitivo, a absorbância corresponde à da TET, sendo exibido o nome do interferente que foi eluído em concomitante com o analito. Como controle, foi eluída uma solução contendo somente TET (denominada de solução padrão).

Como pode ser observado no ensaio competitivo, as misturas contendo diferentes moléculas não interferiram no sinal colorimétrico obtido de modo significativo. Comparando com a solução padrão de tetraciclina, na mistura com minociclina ocorreu ligeiro aumento no sinal e nas outras misturas uma discreta queda. As variações no sinal ocorrem pela possível ocupação não específica das moléculas na cavidade do MIP e, assim, por efeito competitivo, a quantidade de tetraciclina ligada é menor.

Em todos os casos foi possível quantificar a tetraciclina e, além disso, o MIP continuou apresentando maior seletividade que o NIP; exceto na mistura contendo diclofenaco. No caso dos NIPs as ligações inespecíficas acabam variando muito, o que é confirmado pelos valores de desvio relativamente altos nas medidas do polímero não-impreso.

Deste modo, com todas as otimizações realizadas e o bom desempenho apresentado pelo sistema de fluxo lateral, foram realizados testes em matrizes complexas.

4.4.1.9 Aplicação em amostras

A aplicação final das tiras de fluxo lateral foi na identificação de tetraciclina em diferentes tipos de amostra: água de rio, água mineral, urina sintética e leite semidesnatado.

Previamente à análise, cada amostra foi submetida à avaliação por CLAE e, em nenhuma delas, foi detectada tetraciclina naturalmente.

As amostras foram fortificadas com tetraciclina ($50,0 \text{ mg L}^{-1}$) e com o intuito de comparar a eficiência da capacidade de ligação e extração da tetraciclina das amostras pelo MIP, foi preparada uma solução padrão de tetraciclina na mesma concentração da fortificação das amostras.

As medidas foram realizadas em triplicata e para comparação os polímeros não impressos também foram avaliados nas diferentes amostras. Uma vez que os MIPs possuem uma capacidade de carga máxima de analito, a partir do valor real de extração foram obtidos os valores normalizados para cada amostra. A Tabela 13 resume os principais resultados de recuperação.

Tabela 13 – Valores de recuperação relativa (n=3) da tetraciclina em diferentes tipos de amostra aplicadas nas tiras de fluxo lateral.

Amostra	Polímero	Recuperação relativa* (%)	RSD (%)
Leite semidesnatado	MIP	ND.	-
	NIP	ND.	-
Urina sintética	MIP	73 ± 1	1,3
	NIP	65 ± 3	4,6
Água mineral	MIP**	104 ± 1	1,0
	NIP	84 ± 10	12,0
Água de rio	MIP**	92 ± 1	1,1
	NIP	41 ± 5	12,2

* Os valores reais de extração na solução padrão de tetraciclina para o MIP e NIP foram de 86,2% e 78,8%, respectivamente.

** Medidas realizadas em duplicata.

ND: não detectado.

Fonte: autor do trabalho.

Para todas as amostras, o leite foi a única que não pôde ter a eficiência de recuperação avaliada, uma vez que não foi obtido sinal colorimétrico. O ácido tricloroacético utilizado no preparo da amostra, por estar em excesso, impediu a reação de complexação, uma vez que o pH é um dos fatores importantes que interfere na formação do complexo (conforme discutido previamente na avaliação da reação de complexação entre TET e Fe³⁺, no item 4.4.1.2).

No caso das outras amostras avaliadas, todas elas apresentaram bons intervalos de recuperação, na faixa de 73 – 104%. Na amostra de urina o MIP apresentou a menor porcentagem de recuperação; possivelmente pela complexidade da amostra (composta por proteínas, sais, etc.) pode ter ocorrido interação do analito com algum composto da matriz ou até mesmo o excesso de componentes da amostra ter dificultado a interação entre MIP e analito. Para as amostras de água não houve problemas, uma vez que a porcentagem de recuperação foi superior a 90%.

Em todas as amostras o MIP apresentou valores de recuperação da tetraciclina superiores ao NIP, indicando que sua capacidade seletiva foi eficiente quando aplicado em matrizes complexas. As medidas para o MIP também apresentaram boa precisão, com desvios relativos menores que 5%.

4.4.2 Sistema contendo aptâmero como fase de reconhecimento seletivo

Os testes de fluxo lateral contendo materiais biológicos podem ser estruturados de duas formas diferentes: competitivo ou não-competitivo; de acordo com o tipo ou tamanho do analito. A resposta colorimétrica para cada teste é diferente em função de sua montagem, conforme exibido pela Figura 51 a seguir.

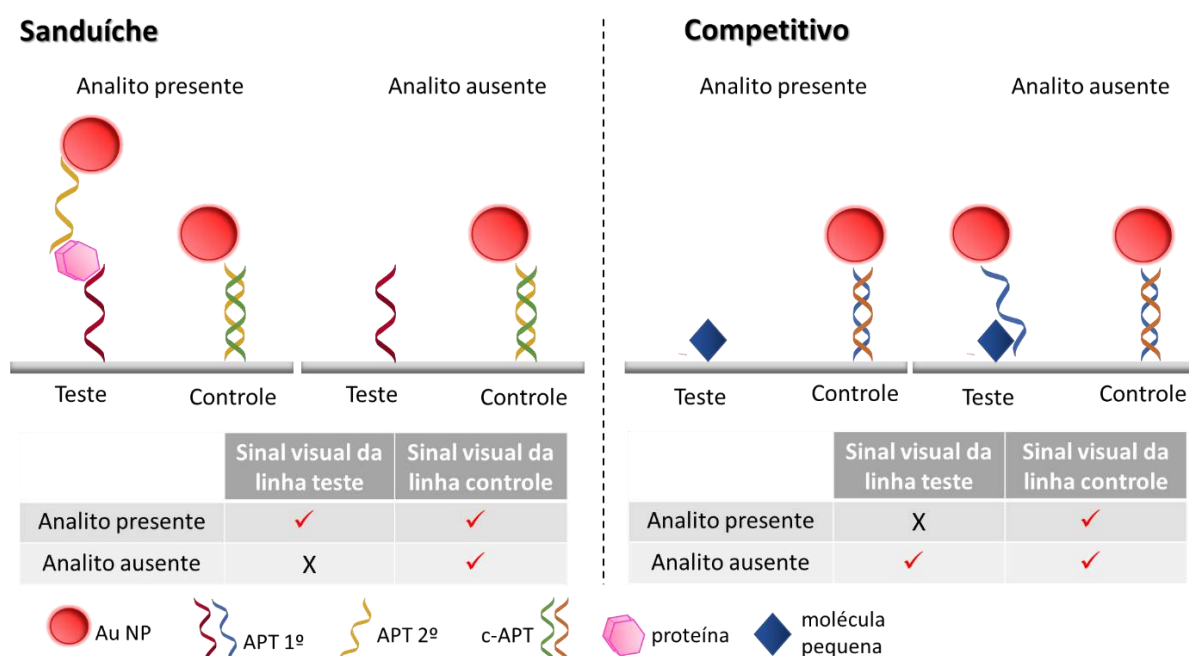


Figura 51 – Representação esquemática dos formatos de teste tipo sanduíche (não-competitivo) e competitivo nos testes de fluxo lateral contendo aptâmeros como fase de reconhecimento, além das tabelas de correlação do sinal colorimétrico (X: sem resposta colorimétrica, ✓: resposta colorimétrica) em função da presença ou ausência do analito na amostra. Au NP: nanopartícula de ouro; APT 1º: aptâmero de ligação primário; APT 2º: aptâmero de ligação secundário; c-APT: aptâmero complementar.

Fonte: autor do trabalho.

No ensaio sanduíche (não-competitivo) as fases de reconhecimento são depositadas diretamente na membrana, compondo as linhas de teste e controle. Esse ensaio é utilizado para moléculas de alta massa molecular e que possuem mais de um sítio de ligação disponível, sendo o sinal colorimétrico proporcional à concentração do analito presente. Esse ensaio foi amplamente discutido conforme exibem as Figura 5 e Figura 6.

No ensaio competitivo apenas a fase de reconhecimento controle (específica ao bioconjugado) é depositada compondo a linha de controle. Esse ensaio é utilizado para moléculas de baixa massa molecular ou que possuem apenas um sítio de ligação

disponível. Deste modo, o próprio analito é depositado para formar a linha de teste e o sinal colorimétrico é inversamente proporcional à concentração do analito; uma vez que se o analito está presente na amostra, o conjugado Au-APT NP se liga ao analito disponível em solução e não ao que está imobilizado na linha de teste.

Portanto, no ensaio sanduíche o sinal colorimétrico aumenta de intensidade conforme a presença e aumento de concentração do analito. No ensaio competitivo, o sinal colorimétrico diminui de intensidade conforme a presença e aumento da concentração do analito.

Como a tetraciclina é uma molécula pequena, o formato escolhido foi do tipo competitivo e consistiu em etapas distintas: imobilização da tetraciclina como componente da linha de teste, imobilização do aptâmero complementar (c-APT) como linha de controle, síntese e caracterização das nanopartículas de ouro (Au NP) e conjugação das NPs com o APT de ligação à tetraciclina.

4.4.2.1 Síntese e caracterização das Au NPs

As nanopartículas de ouro foram obtidas conforme descrito no procedimento experimental segundo procedimento desenvolvido por Turkevich *et al.* (118) utilizando citrato como agente redutor. Tal método é amplamente utilizado até os dias atuais devido sua simplicidade, capacidade de variar o tamanho das partículas e alta homogeneidade do produto. (123)

Como as propriedades ópticas das Au NP mudam de acordo com seu tamanho e formato, foi obtido seu espectro de absorção na região do UV-Vis (exibido na Figura 52) e os dados obtidos comparados com a literatura. Haiss *et al.* (124) sintetizaram nanopartículas de diferentes tamanhos e, por meio de cálculos, relacionaram suas propriedades de absorção com o tamanho.

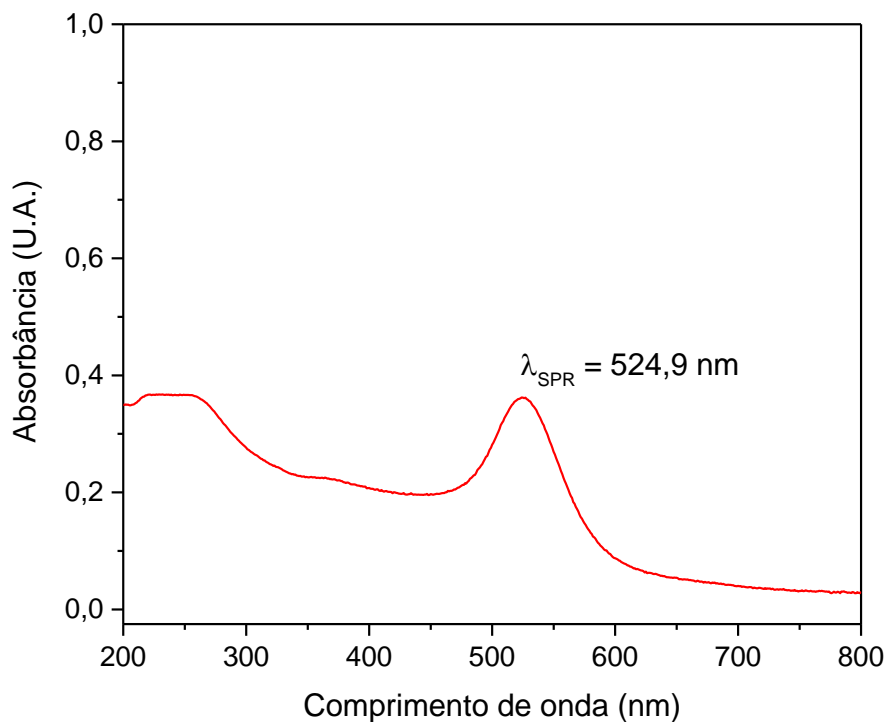


Figura 52 – Espectro de absorção no UV-Vis para as Au NP ressuspensas em água.
Fonte: autor do trabalho.

Utilizando a relação proposta $\frac{A_{SPR}}{A_{450}}$, na qual A_{SPR} é a absorbância máxima da banda plasmônica da Au NP sintetizada e A_{450} a absorbância em 450 nm, obteve-se que: experimentalmente $\frac{A_{SPR}}{A_{450}} = 1,84$ e na literatura o valor mais próximo dessa relação é $\frac{A_{SPR}}{A_{450}} = 1,86$, o qual corresponde à nanopartículas com diâmetro de 30 nm.

Também foi possível calcular a concentração das NP em solução; sendo:

$$c = \frac{A_{450}}{\epsilon_{450}} = \frac{0,19718}{1,96 \times 10^9} = 0,102 \text{ nmol } L^{-1}.$$

As Au NP foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 53a) e de transmissão (Figura 53b). É possível observar em ambas as imagens de microscopia que as nanopartículas apresentam um formato esférico homogêneo e boa dispersão.

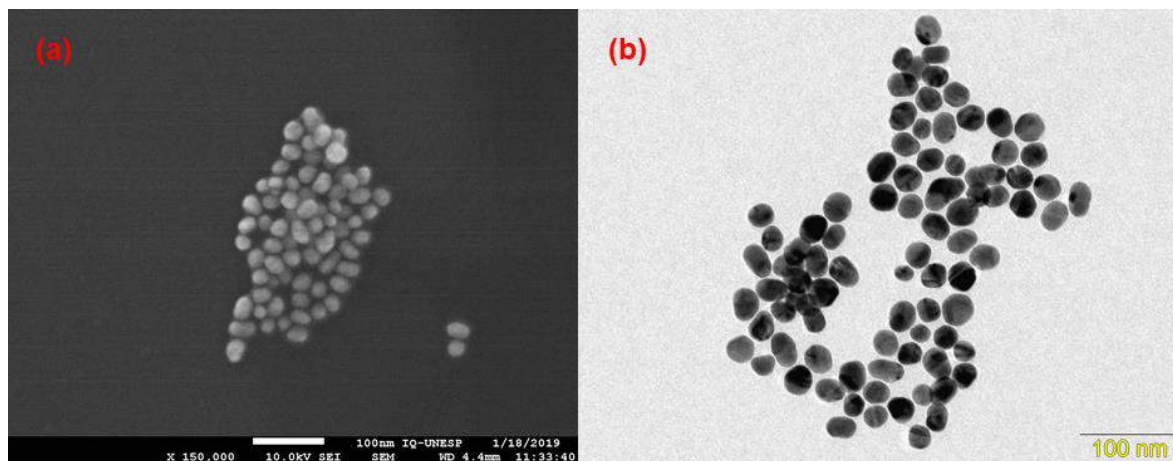


Figura 53 – Imagens de (a) MEV-FEG e (b) MET para as Au-NP sintetizadas.

Fonte: autor do trabalho.

Pelo MEV e pelo MET foi possível calcular o tamanho médio das partículas, obtendo valor de $29,0 \pm 2,8$ nm, o qual condiz com os cálculos realizados anteriormente. O tamanho das partículas sintetizadas é próximo das que são obtidas comercialmente, sendo que para as nanopartículas de ouro recobertas com estreptavidina (Au Estrept NP) o tamanho é de 40 nm. Em sistemas de fluxo lateral, as NP com até 200 nm conseguem fluir sem problemas pela membrana de nitrocelulose.

Para avaliar a eluição das Au NP sintetizadas elas foram depositadas na tira conjugada e, no entanto, não eluíram. O Au sem modificações na sua superfície tende a ficar retido em superfícies como celulose ou fibra de vidro. Utilizando um bloqueio composto por BSA 1% (m/v), sacarose 10% (m/v) e ácido bórico 10 mmol L^{-1} , as tiras conjugadas foram imersas com a solução de bloqueio, secas em temperatura ambiente por 3 h e, por fim, as nanopartículas de Au foram adicionadas, com a tira conjugada pronta posta sob secagem em temperatura ambiente por mais 2 h.

Para os ensaios iniciais, optou-se por montar uma linha de controle temporária que em sua composição contivesse grupos tióis livres, a fim de verificar a eluição do ouro pela nitrocelulose e as posteriores modificações em sua superfície – grupos tióis possuem alta afinidade pelo ouro.

A linha de controle foi formada por diferentes quantidades de (3-mercaptopropil) trimetoxisilano, como exibido na Figura 54.

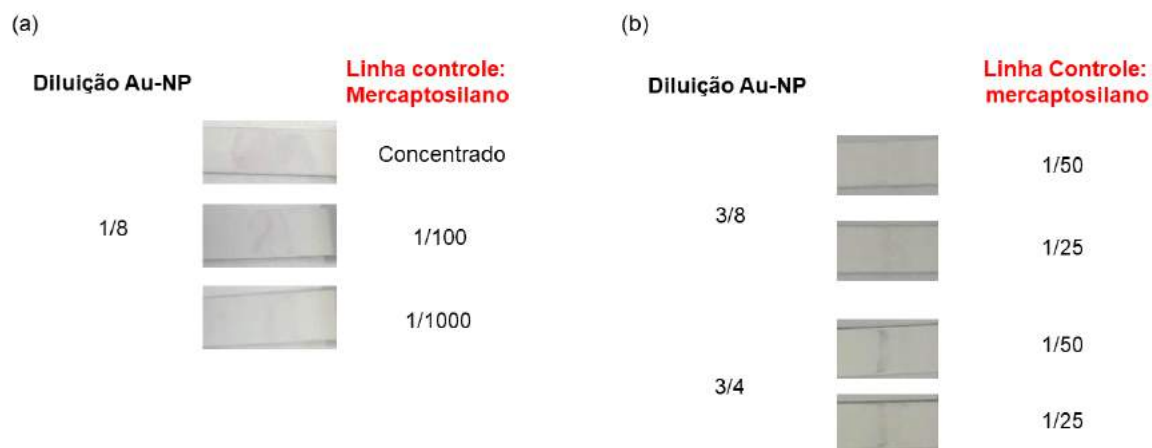


Figura 54 – Aplicação de diferentes proporções de mercaptosilano como linha de controle para o sistema de marcação utilizando Au NP, em (a) deposições mais diluídas e (b) deposições concentradas.

Fonte: autor do trabalho.

Foi observada o surgimento de coloração, indicando que as Au NPs estavam sendo reconhecidas e retidas pelo mercaptosilano. No entanto, devido à ausência de homogeneidade e intensidade da cor, as quantidades de Au NP e silano foram modificadas, conforme mostra a Figura 54b. Os melhores resultados foram obtidos para a diluição em 3/4 das NP; sendo observadas coloração para as duas diluições de silano que foram estudadas.

No entanto, é possível observar que a coloração das NPs, ao serem eluídas, mudou de vermelho-vinho para roxo escuro. Esse fenômeno de mudança de cor ocorre pela agregação das nanopartículas, sendo que diferentes fatores do meio (como força iônica, por exemplo) influenciam nesse efeito. (125,126)

Para verificar se a aglomeração das NP ocorreu em função do seu tamanho ou das condições de eluição, nanopartículas de ouro foram sintetizadas em diferentes tamanhos e as condições de eluição e da linha de controle foram variadas, conforme mostram respectivamente a Figura 55 e Figura 56 a seguir.

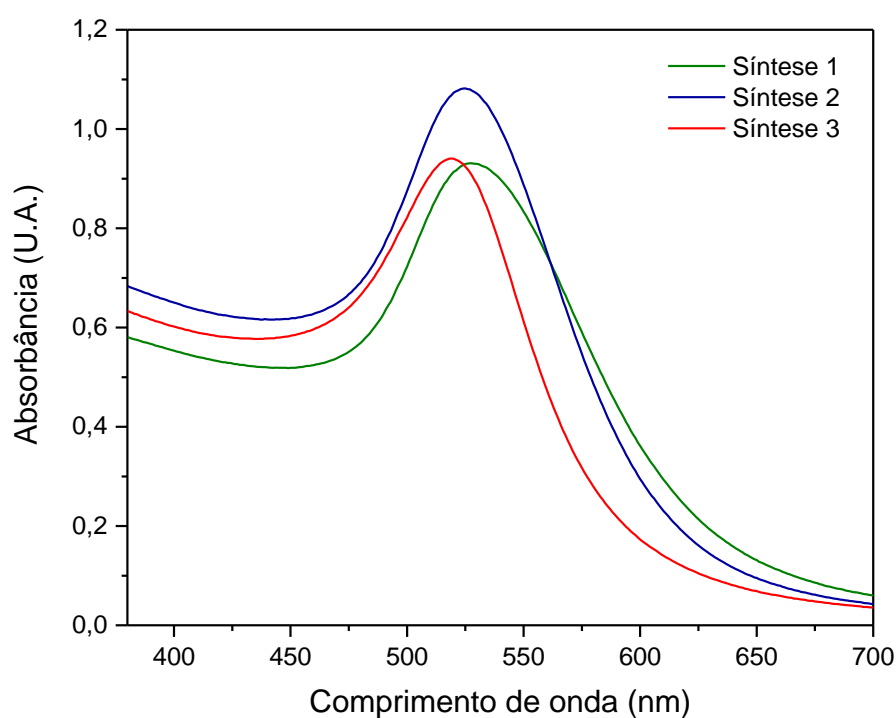


Figura 55 – Espectros de absorção na região do visível para as três sínteses de Au NP em diferentes tamanhos.

Fonte: autor do trabalho.

Conforme os espectros de absorção exibidos na Figura 55, a banda máxima de absorção (λ_{SPR}) se deslocou e variou em intensidade, o que é característico pela mudança de tamanho das NP. Utilizando os mesmos cálculos apresentados anteriormente, foi determinado o tamanho e concentração das partículas obtidas.

Tabela 14 – Tamanho e concentração das três sínteses realizadas para obtenção das Au NPs.

Síntese	λ_{SPR} (nm)	Diâmetro (nm)	Concentração (nmol L ⁻¹)
1	526,9	38	0,12
2	525,0	32	0,25
3	519,0	15	2,6

Fonte: autor do trabalho.

As nanopartículas com diâmetro de 15 e 38 nm foram escolhidas para os ensaios posteriores, uma vez que as NP de 32 nm apresentam tamanho próximo à primeira síntese realizada.

Além de ser avaliado a eluição das NP com diferentes tamanhos, outro composto além do mercaptosilano foi avaliado como candidato à linha de controle, sendo este o ácido tioglicólico. Também foi avaliado o efeito de diferentes soluções tampão de corrida na eluição das NP, conforme exhibe a Figura 56.

Linha de controle	Au NP	Solução tampão				
		Fosfato	Citrato	TRIS	HEPES	PIPES
Mercaptosilano	38 nm					
	15 nm					
Ác. tioglicólico	38 nm					
	15 nm					

Figura 56 – Avaliação da eluição de Au NP em dois tamanhos diferentes em tiras de fluxo lateral contendo ou mercaptosilano (20% v/v) ou ácido tioglicólico (40% v/v) imobilizados. Todas as soluções tampão corrida avaliadas como eluentes foram compostas por $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do respectivo sal, a pH 7,4 e contendo 0,05% (v/v) de Tween 20.

Fonte: autor do trabalho.

É possível observar que as NP de 15 nm apresentaram sinal mais definido para ambos os componentes depositados como controle. As concentrações dos controles foram otimizadas em ensaio separado: para o mercaptosilano no intervalo de 10 – 50% (v/v) e intervalo de 1 – 50 % (v/v) para o ácido tioglicólico.

Para o ácido tioglicólico observa-se que as NP se tornaram escuras, ou seja, se aglomeraram quando em contato com o composto, o que não é desejado. No caso do mercaptosilano as NP de 15 nm aglomeraram ligeiramente, mas ainda mantiveram sua coloração roxa e formaram as linhas mais definidas.

O efeito da solução tampão também se torna evidente; em vários casos são vistas machas que indicam que as NP não foram totalmente eluídas, possivelmente pelo tampão não ter força de arraste o suficiente.

Em função dos perfis obtidos, optou-se por trabalhar com as NP de 15 nm e mercaptosilano como controle temporário para avaliar as modificações nas NP, sendo a solução tampão fosfato o eluente.

4.4.2.2 Imobilização do APT de ligação nas Au NPs (Au-APT NP)

A modificação inicial nas Au NPs foi com a imobilização do APT de ligação para tetraciclina por adsorção. Para verificar se a adsorção foi efetiva e se ocorreu ligação gerando sinal colorimétrico, foi estruturada uma linha de teste temporária para prova de conceito.

Geralmente nos ensaios competitivos, as moléculas pequenas são acopladas a BSA ou outras proteínas para serem depositadas na membrana como linha de teste. No entanto, esse processo demanda etapa de síntese e purificação. Deste modo, por questão de simplicidade experimental, optou-se por depositar diretamente a tetraciclina na membrana de nitrocelulose.

Para tanto, inicialmente tetraciclina e cloridrato de tetraciclina foram solubilizadas em diferentes solventes (água, solução tampão TRIS e solução tampão HEPES) e depositadas diretamente sob a membrana de nitrocelulose, com secagem em temperatura ambiente. A verificação da deposição foi observada utilizando a formação do complexo amarelo pela reação entre tetraciclina (TET) e o cátion Fe^{3+} , conforme exibido na Figura 57 a seguir.

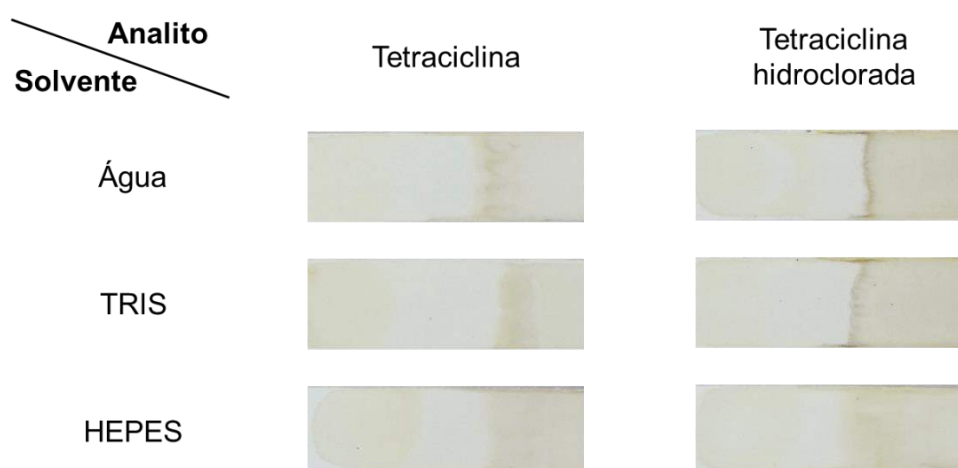


Figura 57 – Construção da linha de teste (1 deposição de 1,0 μ L) contendo tetraciclina ou tetraciclina hidroclorada (60 mg mL^{-1}) preparada em diferentes solventes (água ultrapura e solução tampão TRIS e HEPES; ambas $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4). Sinal colorimétrico obtido pela eluição de $10,0 \mu\text{L}$ de $FeCl_3$ $0,05 \%$ (m/v).

Fonte: autor do trabalho.

Como observado na Figura 57 acima, o cloridrato de tetraciclina (TET-HCl) apresentou a linha mais definida e uma deposição mais homogênea do que a TET molecular; tanto para solubilização em TRIS quanto em água ultrapura. Em solução tampão HEPES nenhuma das duas deposições foi adequada. Ao preparar as tetraciclinas nas soluções tampão, houve dificuldade de solubilização dos analitos e também ocorreu uma rápida precipitação deles no meio. Deste modo, optou-se por preparar a TET-HCl em água ultrapura.

Embora também seja observado que uma parte da tetraciclina elui, uma vez que ocorrem manchas na parte final após a reação colorimétrica, para o teste proposto a linha que é formada já apresentou definição suficiente.

Desse modo, as Au-APT NP foram eluídas nas tiras de fluxo lateral contendo o mercaptosilano como controle e TET na linha de teste, conforme as imagens das tiras exibidas na Figura 58.



Figura 58 – Verificação do funcionamento das linhas de (a) controle: mercaptosilano (20% v/v), (b) teste: tetraciclina 15 mg mL⁻¹ e (c) linhas teste e controle em simultâneo.

Fonte: autor do trabalho

Diferente do previsto, nenhum sinal colorimétrico foi obtido. Como anteriormente tanto a linha de controle quanto teste apresentaram sinal, possivelmente a estrutura do teste com a inserção dos APT não foi adequada. Pode ter ocorrido desprendimento do aptâmero da NP, ou então o DNA não se ligou à TET, ou mesmo a TET eluiu completamente da membrana.

Um experimento similar foi conduzido de modo que a sequência de aptâmero biotinizado (b-APT) interagiu com nanopartículas de ouro recobertas com estreptavidina (Au-STA NP); conforme exhibe a Figura 59.

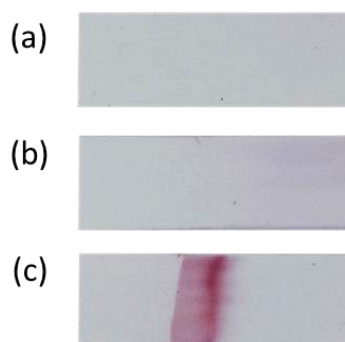


Figura 59 – Eluição de Au-APT-STA NP sendo a (a) teste: tetraciclina 15 mg mL⁻¹ e (b) controle: biotina-HRP 2,5 mg mL⁻¹. (c) Eluição de Au-STA NP em linha de controle biotina-HRP 2,5 mg mL⁻¹.

No caso da imobilização utilizando o b-APT também não foi observada coloração na linha de teste (Figura 59a). Possivelmente toda tetraciclina eluiu da tira durante a passagem da solução tampão corrida, indicando que a linha de teste temporária composta por tetraciclina não foi efetiva.

Já a imobilização do b-APT nas Au-STA NPs foi efetiva, como exibido pela Figura 59b e Figura 59c, uma vez que a nanopartícula modificada não apresenta sinal e apenas as Au-STA NP apresentam um sinal intenso de ligação à biotina-HRP. Nesse caso a imobilização é garantida pela alta afinidade de ligação entre biotina e estreptavidina.

Assim, de modo a reestruturar o teste, a verificação inicial foi da efetividade de ligação do APT à TET.

4.4.2.3 Verificação da capacidade de ligação dos APT pela tetraciclina

Para esse ensaio, a capacidade de reconhecimento seletivo do APT pela TET foi medida indiretamente utilizando o corante laranja de tiazol (LT). Esse corante é extensivamente utilizado para detecção de diferentes estruturas de DNA e RNA; visto que o LT se intercala entre os pares de bases ou associando-se com o esqueleto fosfato negativamente carregado. Na presença do analito, o APT muda sua conformação adquirindo a estrutura secundária mais estável para ligação do analito e assim, liberando o LT. (127)

Quando o LT se liga ao DNA, ele apresenta alta emissão de fluorescência. No experimento realizado, contudo, foi suficiente medir a absorbância do LT após ser liberado em solução. A Figura 60 a seguir exibe os espectros de absorção obtidos.

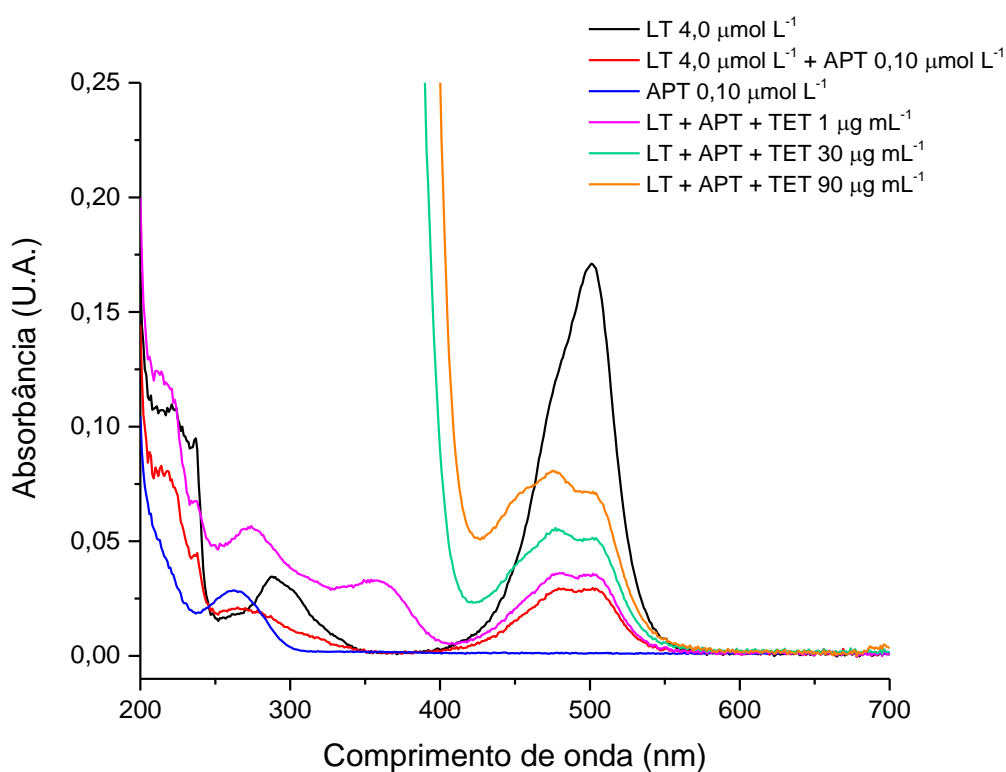


Figura 60 – Verificação da atividade seletiva dos aptâmeros (APT) quando colocados em contato com tetraciclina (TET), com monitoramento indireto por meio da banda de absorção na região do UV-Vis em 500 nm do corante laranja de tiazol (LT). Nas misturas foram variadas as concentrações de TET (1,30 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$); mantendo-se constante as concentrações de LT e APT em 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Fonte: autor do trabalho.

Como exibido acima, foi escolhido o monitoramento da banda do LT (500 nm) e não do APT ou TET uma vez que não houve sobreposição de bandas e boa intensidade no sinal nessa região. É possível observar a diferença de comportamento do sistema: na mistura equimolar de APT e LT, o sinal do LT diminui em aproximadamente 80% comparado com o LT puro na mesma concentração da mistura.

Conforme adicionou-se TET no meio o sinal do LT foi aumentando, indicando que houve maior quantidade dele livre em solução; sendo que esse sinal aumentou conforme a concentração de TET foi crescente. Isso ocorreu porque, quando o APT se liga ao analito, ele muda sua estrutura secundária para adquirir sua conformação ideal; liberando assim o corante da sua estrutura.

O mesmo ensaio foi realizado para o APT biotilado (b-APT) e o resultado foi idêntico. Portanto, é possível concluir que os APT estavam viáveis e com capacidade de reconhecimento para a tetraciclina.

4.4.2.4 Imobilização do APT marcado com tiol (SH-APT) nas Au NP

Com o intuito de garantir uma melhor imobilização dos aptâmeros na superfície das nanopartículas, foi utilizada uma sequência de DNA marcada com grupo tiol na sua terminação 5' e, como a ligação entre tiol e ouro possui alta afinidade, a estabilidade da imobilização do DNA é maior.

Após a reação de imobilização, as NPs foram centrifugadas e ressuspensas em solução tampão TRIS 50 mmol L⁻¹ a pH 7,4. Não foi observada mudança de coloração nas NPs, indicando que não ocorreu nenhuma reação que alterou a sua dispersão.

Ao realizar a caracterização das NPs por absorção na região do UV-Vis (Figura 61), nenhuma mudança na banda de absorção foi observada ao comparar as Au NPs originais e as modificadas com APT em sua superfície, tanto por adsorção quanto por interação com o grupo tiol.

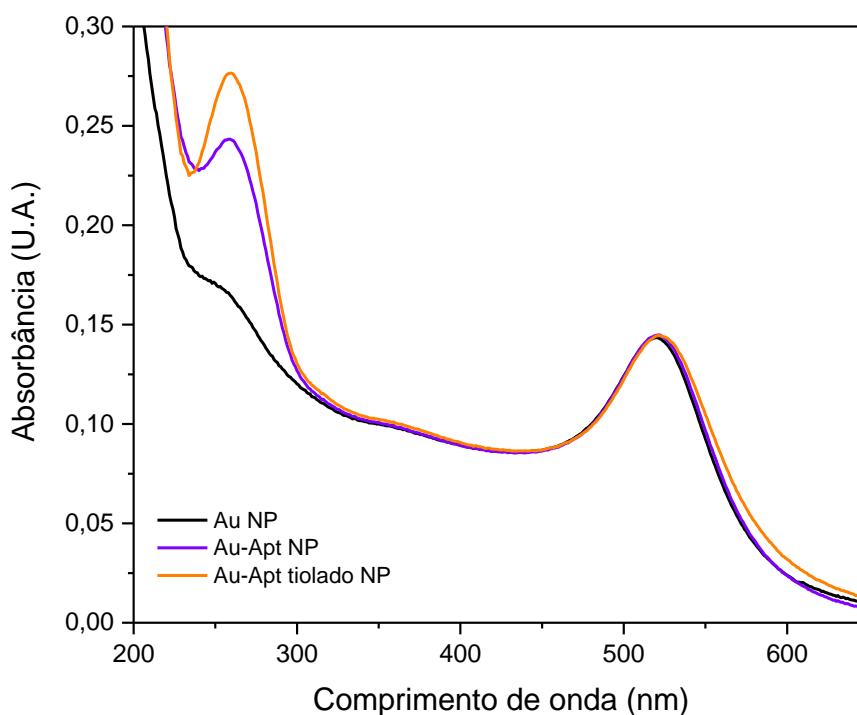


Figura 61 – Espectros de absorção na região do UV-Vis para as nanopartículas sem modificação (Au NP), modificadas com APT por adsorção (Au-APT NP) e modificadas com APT por interação química (Au-SH-APT NP).

Fonte: autor do trabalho.

Era esperado observar nos espectros de absorção um deslocamento no comprimento de onda da banda do ouro modificado com APT. Por questões de

sensibilidade da técnica e em função das concentrações utilizadas, a espectrofotometria não apresentou nenhuma mudança indicativa da imobilização do APT nas Au NPs. Desse modo, optou-se por realizar a caracterização por meio de medida eletroquímica, conforme exhibe a Figura 62 a seguir.

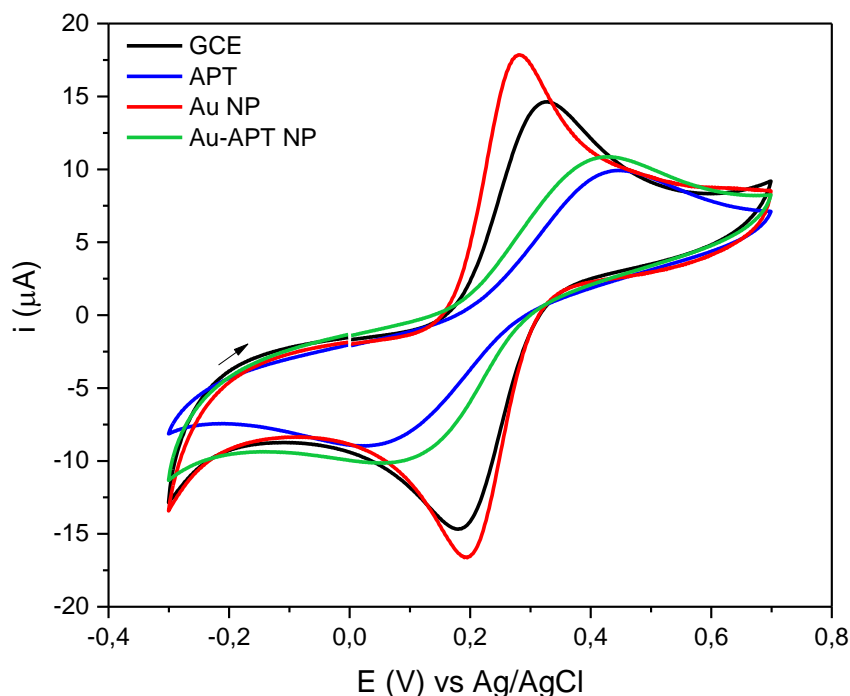


Figura 62 – Voltamogramas cíclicos obtidos para nanopartículas de ouro (Au NP) e nanopartículas modificadas com APT por interação com grupo tiol (Au-SH-APT NP) depositadas em eletrodo de carbono vítreo (GCE). Eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência: Ag|AgCl|KCl_(sat); medidas realizadas em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo Fe(CN)₆^{3-/4-} 1×10⁻³ mol L⁻¹; v: 100 mV s⁻¹.

Fonte: autor do trabalho.

Como observado nos voltamogramas cíclicos, ao depositar as Au NP na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE), ocorreu um aumento da corrente de pico anódica (i_{pa}) quando comparado com o GCE livre; uma vez que as nanopartículas aumentam a condutividade e área superficial do eletrodo. Para as nanopartículas Au-SH-APT NP a intensidade da corrente diminui, uma vez que a área superficial disponível das NP para transferência eletrônica é menor em função da modificação; indicando assim que a imobilização do aptâmero foi realizada com sucesso

Ao eluir as nanopartículas pelas tiras de fluxo lateral, foi observada a efetividade da modificação com os APT e o efeito na resposta colorimétrica, como exhibe a Figura 63.

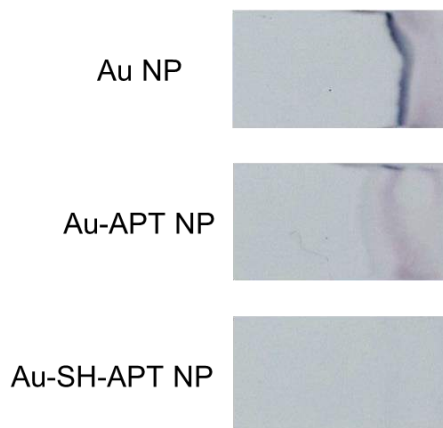


Figura 63 – Eluição das nanopartículas sem modificação (Au NP), modificadas com APT por adsorção (Au-APT NP) e modificadas com APT por interação química (Au-SH-APT NP). Na membrana de nitrocelulose linha de controle mercaptosilano 20% (v/v) e solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4 contendo 0,05% de Tween como eluente.

Fonte: autor do trabalho.

Na eluição das Au NP é possível notar um sinal intenso e de coloração roxa, indicando que as NP estão agregando ao se ligarem ao mercaptosilano na linha de controle. No caso da imobilização por adsorção, é possível notar que não ocorre agregação e a intensidade do sinal diminui, uma vez que o DNA na superfície diminui a área disponível para interação com o mercaptosilano. A imobilização por interação entre Au NP e ATP tiolado se mostrou efetiva, uma vez que há supressão total do sinal colorimétrico.

Como os resultados obtidos até então para as Au-APT NP pelo método de adsorção foram inferiores, adotou-se a eluição das Au-SH-APT para as eluições futuras e avaliação das linhas de teste e controle, sendo as Au NP utilizadas como comparação.

4.4.2.5 Construção da linha de teste

Conforme resultados exibidos anteriormente, a deposição direta da tetraciclina na nitrocelulose como linha de teste se torna inviável. Geralmente os haptenos são acoplados a proteínas e, por impossibilidade experimental, uma rota alternativa adotada foi acoplar à tetraciclina na superfície de materiais funcionalizados como as nanopartículas de SiO_2

As nanopartículas de SiO_2 não possuem coloração e são facilmente modificáveis com a inserção de grupos funcionais em sua superfície. Com base nos

métodos reportados na literatura e descritos previamente (item 4.3.4.5), avaliou-se a imobilização utilizando os grupos OH das nanopartículas com os grupos OH disponíveis na estrutura da tetraciclina e outra utilizando nanopartículas de sílica funcionalizadas com grupo NH_2 ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ NP) e os grupos OH do analito.

Para verificar a eficiência das modificações, foi feita uma triagem depositando suspensões das NP na tira de fluxo lateral e eluindo FeCl_3 ; sendo a presença da TET detectada pela reação de complexação com o Fe^{3+} . De todos os materiais sintetizados, as modificações do método 1 e 2 que envolviam os grupos hidroxila (tanto da NP quanto da TET) não funcionaram.

Apenas as modificações envolvendo a funcionalização das NP com grupo NH_2 apresentaram resposta. Esses materiais foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, cujos espectros são exibidos na Figura 64.

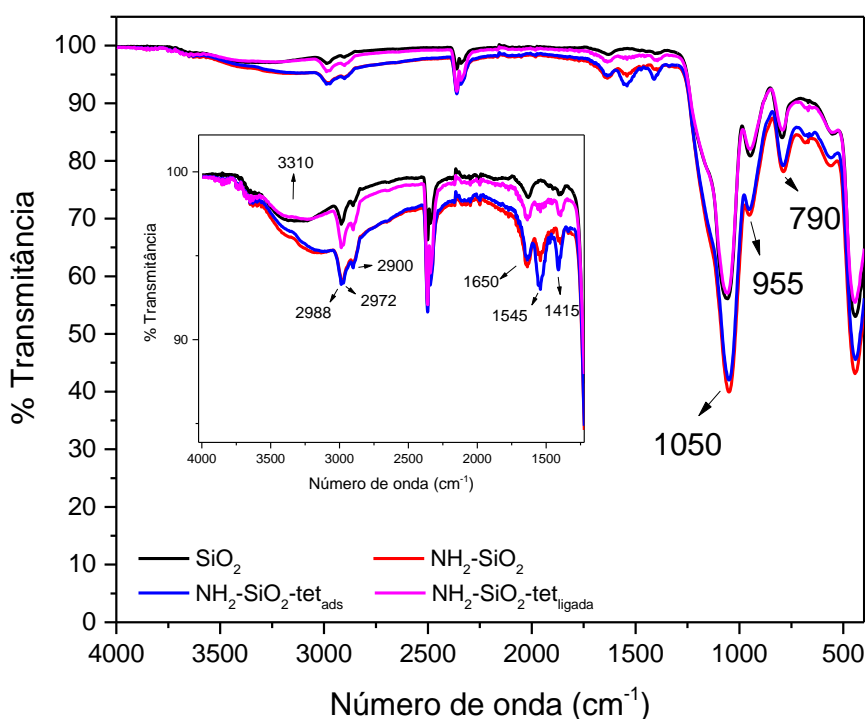


Figura 64 – Espectros na região do IV com designação das principais bandas para comparação entre as nanopartículas de sílica (SiO_2) e modificadas com grupo amina ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$), com tetraciclina adsorvida ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$) e tetraciclina ligada ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ligada}}$). *Inset*: ampliação da região acima de 1400 cm^{-1} com atribuição das principais bandas.

Fonte: autor do trabalho.

Em comum para todos os materiais é observada a banda de estiramento assimétrico em 1050 cm^{-1} referente à ligação Si-O-Si que forma a NP e os grupos

silanóis que apresentam banda de dobramento em 955 e 790 cm^{-1} . A Tabela 15 atribui as principais bandas para identificação das modificações realizadas.

Tabela 15 – Atribuição das bandas designadas no espectro de IV da Figura 64 para as nanopartículas de SiO_2 e as respectivas modificações.

Banda (cm^{-1})	3310	2988	2972	2900	1650	1545	1415
Atribuição	ν OH	ν_{assim} CH_3	ν_{sim} CH_3	δ OH	δ NH	δ_{assim} CH_3	

Fonte: autor do trabalho.

É possível observar no espectro das $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ NP a banda em 1545 cm^{-1} referente às amins primárias e que é ausente no espectro das SiO_2 NP; sendo confirmada a modificação com o aminopropiltrimetoxisilano. Essa mesma banda não é observada no espectro da tetraciclina ligada às NP, uma vez que a reação de acoplamento com glutaraldeído utiliza os grupos amino disponíveis. Para a TET imobilizada por adsorção ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ NP), o espectro de IV não mostra diferença em relação ao padrão; possivelmente em função da concentração de TET que é imobilizada e possivelmente abaixo da capacidade de detecção do equipamento.

No caso das $\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ligada}}$ NP, a imobilização da TET acabou gerando coloração amarela para o material, o que inviabilizou sua deposição na membrana de nitrocelulose. Desse modo, optou-se por utilizar as NP com tetraciclina adsorvida na superfície como material para a linha de teste.

A verificação da eficiência das $\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ NPs depositadas foi avaliada comparando a resposta colorimétrica da reação de complexação com o padrão $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ NP.

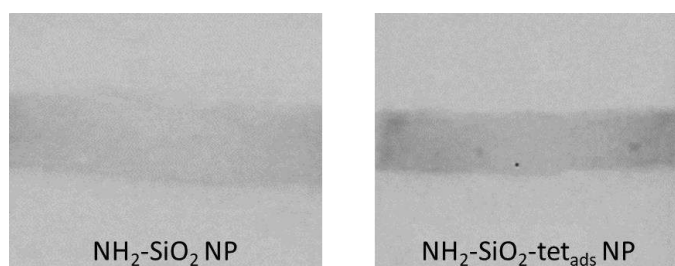


Figura 65 – Verificação colorimétrica da imobilização da tetraciclina na superfície das nanopartículas de sílica modificadas com grupo amino ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$) e NP contendo tetraciclina adsorvida, utilizando Fe^{3+} como agente complexante. Volume de suspensão depositada: 2,0 μL ; volume de FeCl_3 0,5% (m/v) adicionado: 10,0 μL ; eluente: solução tampão HEPES 0,1 mol L^{-1} a pH 7,4.

Fonte: autor do trabalho.

Pelas imagens das tiras apresentadas na Figura 65 é possível notar a diferença na intensidade do sinal obtido: a NP de $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ apresenta o sinal apenas dos reagentes eluidos pela tira e para as $\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ a maior intensidade do sinal indica a reação da TET com o Fe^{3+} . Uma vez que a reação de complexação é seletiva, o aumento da intensidade do sinal é atribuído à presença da TET adsorvida.

Para verificar a eficiência da linha teste frente ao bioconjugado seletivo, as Au-APT NPs, realizou-se diferentes eluições conforme exibe a Figura 66.

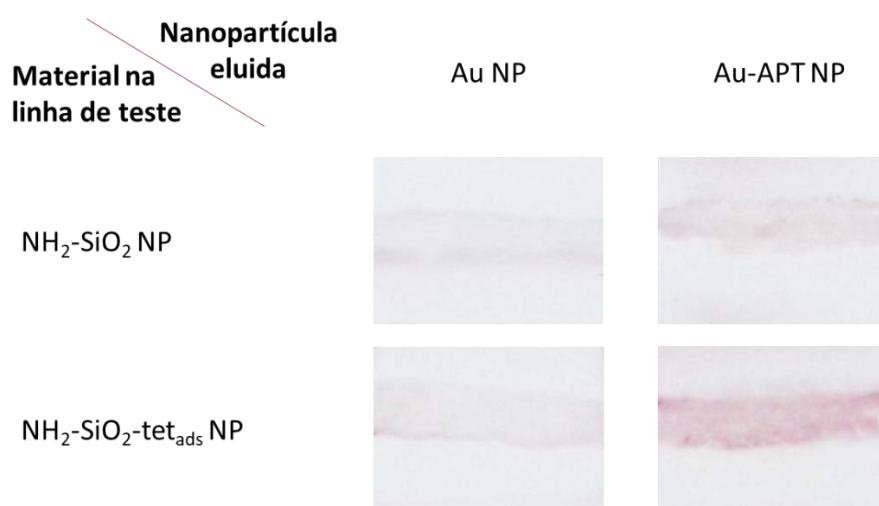


Figura 66 – Eluição das Au-APT NP em membranas de nitrocelulose comparando o sinal gerado em linhas de teste composta pelas nanopartículas sem modificação ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$) e com tetraciclina adsorvida na superfície ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ NP). Branco: eluição de Au NP; volume de suspensão depositada: 2,0 μL ; eluente: solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7,4 contendo Tween 0,05% (v/v).

Fonte: autor do trabalho.

As Au NPs foram eluidas também, conforme exibe a Figura 66, servindo como branco em comparação com as Au-APT NPs, à medida que na linha de teste as $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ atuaram como branco para a $\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$.

A eluição das Au NPs apresentou um sinal muito pouco intenso para ambas as linhas avaliadas. De fato, considerando apenas a resposta visual, o sinal colorimétrico foi quase imperceptível. Mesmo após a captura das imagens no sistema para quantificação foi observado um sinal pouco intenso.

Todavia, ao eluir as Au-APT NPs foi possível observar que o sistema funcionou seletivamente, uma vez que a maior intensidade de sinal foi obtida para a linha de teste composta por $\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$. Para a linha contendo $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ NP foi observado

um sinal de baixa intensidade, eventualmente pelas interações entre os grupos amino disponíveis na superfície das NP e as bases nitrogenadas da fita de DNA.

Também foi estudado o efeito de diferentes concentrações da solução tampão fosfato de corrida no sinal colorimétrico. Foram depositadas as $\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ e avaliou-se as concentrações de solução tampão de 0,01; 0,05 e 0,1 mol L^{-1} , cujas intensidades de sinal obtidas foram, respectivamente, 0,62; 0,63 e 0,98 (U.A.). Deste modo, a concentração de 0,1 mol L^{-1} apresentou sinal mais intenso, se mostrando mais adequada para uso como eluente.

Por fim, foi realizada a eluição de tetraciclina na tira de fluxo lateral contendo a linha de teste, para verificar o sinal obtido e o efeito competitivo esperado.

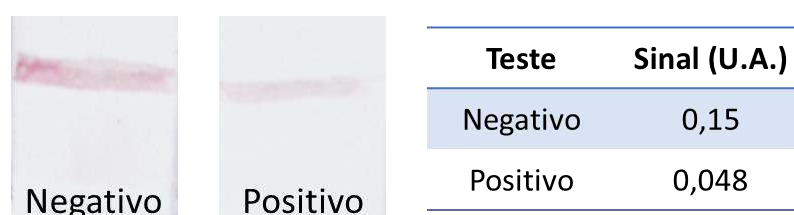


Figura 67 – Sinal colorimétrico obtido no ensaio competitivo em tiras de fluxo lateral sem a adição do analito (negativo) e com adição de tetraciclina (positivo) para a linha de teste ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-tet}_{\text{ads}}$ NP). Volume de suspensão depositada: 2,0 μL ; eluente: solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7,4 contendo Tween 0,05% (v/v); volume solução de tetraciclina 50 mg L^{-1} adicionada: 40,0 μL .

Fonte: autor do trabalho.

Conforme exibe a Figura 67, o formato competitivo proposto funcionou. Na tira considerada como branco, o sinal foi três vezes mais intenso do que na tira onde foi eluída solução padrão de TET. Isso indica que parte das Au-APT NP se ligaram a TET da solução padrão, competindo pela ligação com a TET depositada na linha de controle. Visualmente também é possível observar diferença colorimétrica significativa.

Portanto, a deposição de TET adsorvida na superfície de nanopartículas de SiO_2 modificadas apresentou viabilidade, sendo necessária a otimização de outros parâmetros, como a concentração de suspensão de NP depositada e verificar o sinal obtido para eluição de diferentes concentrações de TET.

4.4.2.6 Construção da linha de controle

No sistema de fluxo lateral, a linha de controle deve ser composta por componente que seja seletivo ao conjugado da Au NP. Deste modo, após os ensaios iniciais para validação das Au NPs terem sido realizados com o mercaptosilano e mostraram que a inserção do APT na NP foi realizada com sucesso, o controle para o teste foi composto pela fita de aptâmero complementar (c-APT) à fita que é imobilizada na Au NP.

Os testes iniciais consistiram em depositar uma concentração fixa de c-APT e verificar o sinal colorimétrico obtido. Duas concentrações de solução tampão TRIS foram estudadas (50 e 100 mmol L⁻¹), variando-se a presença do surfactante Tween 0,5% (v/v) e da sacarose 1% (m/v), que auxiliam no arraste nas NP. Também foi estudado o efeito da presença e concentração de NaCl e MgCl₂ (no intervalo de 25 a 75 mmol L⁻¹), uma vez que os cátions são necessários para hibridização e estabilidade da fita de DNA. (128)

Após triagem realizando a eluição nas diferentes condições, algumas constatações foram realizadas:

- A concentração de TRIS não influenciou nas tiras onde se obteve sinal colorimétrico;
- A presença de Tween no eluente foi essencial para eluição das NPs, uma vez que nos testes onde o surfactante esteve ausente as NP eluíram pouco ou com dificuldade;
- A sacarose no eluente não se faz necessária. Não foi observada diferença na força de eluição das NP comparando a presença ou ausência do açúcar.
- O NaCl interferiu em todos os testes em que esteve presente, independente da concentração avaliada. Nas concentrações inferiores de NaCl as NPs aglomeraram e nas concentrações superiores elas desagregaram, perdendo sua resposta colorimétrica.
- O MgCl₂ foi suficiente para garantir a estabilidade da fita dupla formada na hibridização entre as fitas de APT e c-APT; visto que foi observada formação do sinal colorimétrico.

A Figura 68 a seguir mostra a melhor condição de eluição obtida.

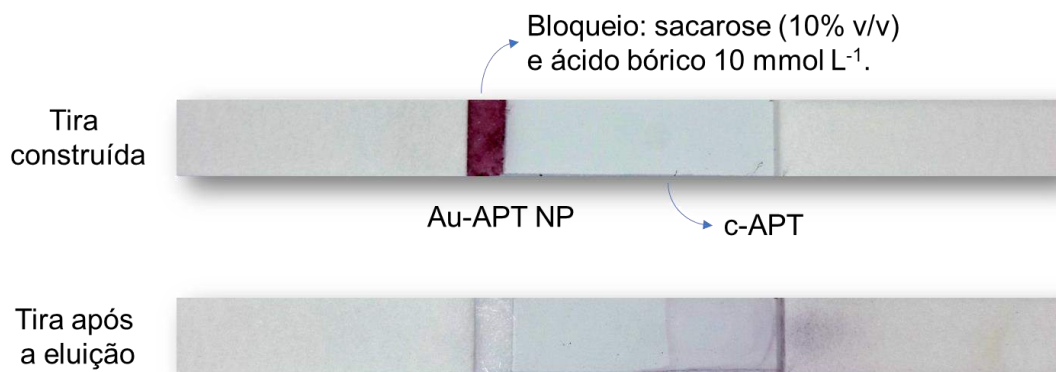


Figura 68 – Tiras de fluxo lateral contendo c-APT ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) como linha de controle antes da eluição (tira superior) e depois da eluição (tira inferior) das Au-APT NP immobilizadas na tira conjugada. Testes do tipo negativo e eluente solução tampão TRIS 50 mmol L^{-1} a pH 7,4 contendo MgCl_2 50 mmol L^{-1} e Tween 0,5 % (v/v).

Fonte: autor do trabalho.

É possível notar na tira inferior que a eluição das Au-APT NPs da tira conjugada foi completa e observa-se um sinal sutil indicando a linha de controle. De modo a aumentar a intensidade do sinal, um estudo da concentração de c-APT foi realizado, conforme exhibe a Figura 69 a seguir.

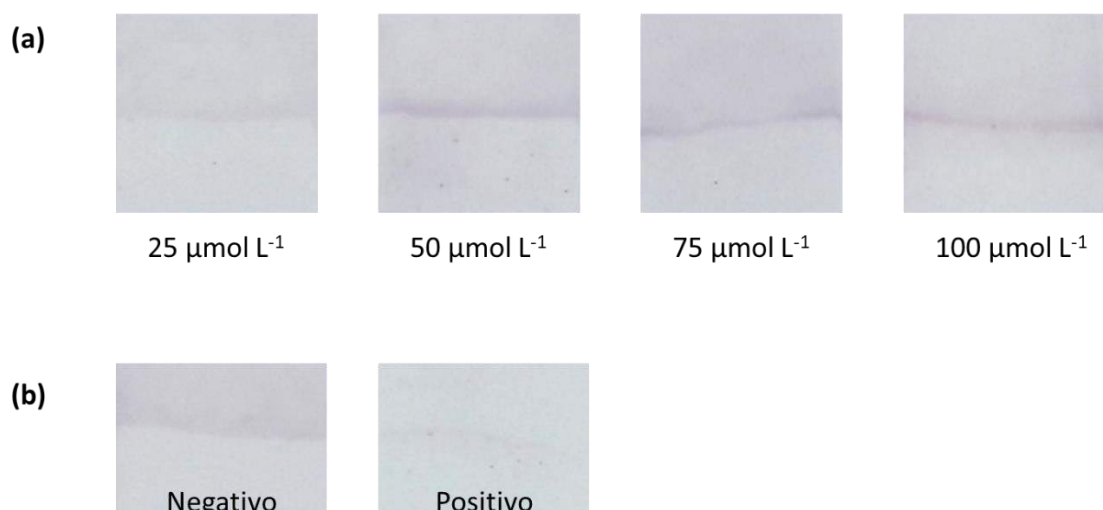


Figura 69 – (a) Avaliação da concentração de c-APT depositado como linha de controle, no intervalo de $25 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Sinal colorimétrico obtido no ensaio competitivo sem a adição do analito (negativo) e com adição de tetraciclina (positivo) para a linha de controle (c-APT $50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eluente: solução tampão TRIS 50 mmol L^{-1} a pH 7,4 contendo MgCl_2 50 mmol L^{-1} e Tween 0,5 % (v/v). Volume solução de tetraciclina 50 mg L^{-1} adicionada: $40,0 \mu\text{L}$.

Fonte: autor do trabalho.

É possível observar que a partir de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de c-APT (Figura 69a) a intensidade do sinal não variou significativamente. Deste modo, essa concentração para deposição foi ideal.

Ao realizar um teste positivo de eluição (Figura 69b) é possível notar que a intensidade da linha de controle diminuiu. Como as Au-APT NP capturaram parte da tetraciclina em solução, menos quantidade de bioconjugado ficou disponível para se ligar ao c-APT na linha de controle.

Deste modo é possível concluir que a linha de teste funcionou com os parâmetros iniciais avaliados, sendo necessária a otimização das concentrações do APT imobilizado na Au NP, de modo a garantir o equilíbrio de sinal nas linhas de teste e controle quando é eluída TET na amostra.

O desenvolvimento deste trabalho de doutorado foi finalizado na etapa acima descrita. Em função da pandemia de Covid-19 que se iniciou no começo de 2020 e se espalhou por todos os países, todas as atividades presenciais de trabalho foram interrompidas, sendo retomadas de modo restritivo após meses de paralisação. A retomada gradual das atividades coincidiu com as etapas finais para conclusão da tese de doutorado, não havendo tempo hábil para obtenção de outros resultados experimentais.

4.5 Considerações finais

Os sistemas de fluxo lateral propostos para identificação da tetraciclina são inéditos e, portanto, exigiram avaliação e estudo minucioso de cada parâmetro do teste: desde a estruturação da tira até a disposição e otimização dos reagentes utilizados.

Tanto para o sistema competitivo utilizando os aptâmeros quanto para o sistema contendo MIP foi observado que a menor variação ou mudança de um dos parâmetros avaliados poderia causar uma alteração significativa na resposta do sistema.

O sistema aplicando MIP como fase de reconhecimento permitiu a identificação direta da tetraciclina por meio da formação de um composto de coordenação com o cátion Fe^{3+} . Os estudos iniciais envolveram avaliar as condições de formação do composto de coordenação obtido.

Em seguida foi avaliada a viabilidade da reação de complexação no fluxo lateral e da resposta colorimétrica gerada, além da deposição do MIP. As melhores condições de análise foram obtidas: solução tampão HEPES como melhor eluente, FeCl_3 (0,05% m/v) adicionado direto na membrana após a eluição do analito e o MIP de alta porosidade depositado como linha de teste por apresentar melhor desempenho em comparação com o tradicional e com núcleo de sílica.

O sistema desenvolvido, além da resposta qualitativa, também apresentou resposta quantitativa; cuja quantificação foi realizada pelo tratamento das imagens obtidas por um smartphone. Por meio da construção de curva analítica foi possível quantificar a tetraciclina ligada à linha de teste. Os sistemas apresentaram bons resultados de seletividade e quando aplicados em amostra permitiram valores de recuperação da tetraciclina na faixa de 73 a 104%.

Para o sistema contendo aptâmeros, as etapas iniciais envolveram a síntese, caracterização e avaliação da eluição das nanopartículas de ouro. A seguinte etapa foi a modificação das nanopartículas com o aptâmero de ligação à tetraciclina, a qual foi realizada com sucesso por meio da interação entre ouro e aptâmero marcado com tiol. Todos os materiais sintetizados e modificados foram devidamente caracterizados.

Embora esse sistema não tenha sido finalizado e sejam necessárias otimizações para sua avaliação final, o teste competitivo contendo aptâmero se mostrou viável quando avaliado tanto pela linha de teste e controle que foram construídas. A nanopartícula de sílica com tetraciclina adsorvida se mostrou um candidato alternativo para deposição do analito na membrana. A linha de controle composta pela fita de aptâmero complementar ao de ligação também apresentou resultado positivo, uma vez que após a hibridização do DNA foi observada a resposta colorimétrica.

5 DISCUSSÃO

O Capítulo 1 apresentou o desenvolvimento de novos tipos de polímeros molecularmente impressos para determinação da tetraciclina. Inicialmente foi sintetizado um MIP tradicional, e baseando-se nesse material, foi sintetizado um MIP *core-shell* com núcleo composto por SiO₂. Por fim, pela remoção do núcleo de SiO₂, foi obtido um MIP oco de alta porosidade.

Todos os polímeros sintetizados tiveram sua eficiência avaliada e comparada e o MIP de alta porosidade apresentou melhor capacidade de adsorção pelo analito, com capacidade de carga máxima de tetraciclina duas vezes superior em comparação com o MIP sem modificação e o MIP *core-shell*. Quando aplicado em diferentes tipos de amostras (água, fluido biológico e alimento) o MIP de alta porosidade apresentou faixa de recuperação para o analito entre 74 – 96%, indicando que o material consegue ser seletivo mesmo em soluções de composição complexa.

O Capítulo 2 abordou a aplicação do MIP de alta porosidade sintetizado previamente como fase de reconhecimento em sistemas de fluxo lateral. Foram estudados os principais parâmetros para construir um teste rápido para identificação da tetraciclina contendo MIP como linha de teste. A resposta colorimétrica do teste foi fornecida pela formação de um composto de coordenação de coloração marrom-amarelada entre a tetraciclina e o Fe³⁺.

Com base nos ensaios de otimização abordados nos dois capítulos, foi possível propor os sítios de interação da tetraciclina na formação da cavidade seletiva do MIP e na reação de coordenação com o Fe³⁺. A Figura 70 representa o esquema de interação proposto.

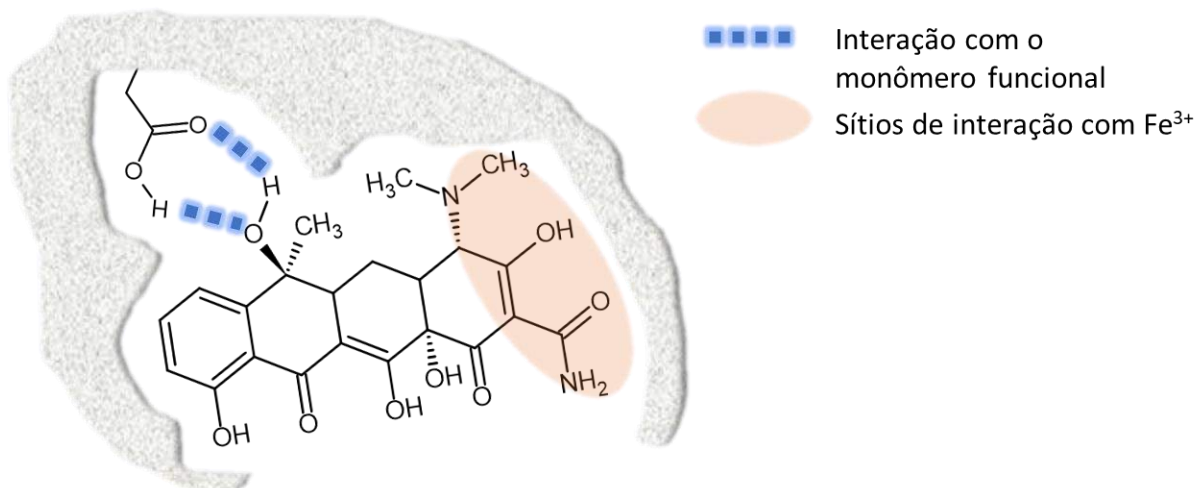


Figura 70 – Representação esquemática da cavidade seletiva do MIP, com exibição da interação mais provável entre tetraciclina e ácido acrílico. A região sombreada de laranja abrange os possíveis sítios de coordenação entre analito e Fe^{3+} .

Fonte: autor do trabalho.

Com base no ensaio competitivo e de seletividade durante a otimização do MIP oco, a possibilidade mais provável de interação entre o monômero funcional (ácido acrílico) e tetraciclina se encontra no grupo funcional do C_6 . Para confirmação total da proposição se faz necessário análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono. Já a reação de complexação pode ocorrer em um dos sítios disponíveis (não sendo possível determinar com precisão) da região sombreada.

A Tabela 16 a seguir resume as figuras de méritos obtidas para as aplicações descritas nos capítulos 1 e 2 com os MIP de alta porosidade.

Tabela 16 – Resumo das figuras de mérito obtidas para as duas aplicações dadas ao MIP de alta porosidade.

Aplicação	Deteção	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação amostra (%)	Tempo análise (min)
SPE	CLAE	4,5 – 155	4	13	74 – 96	110
Fluxo Lateral	Colorimetria	45 – 180	17	45	73 – 104	60

Fonte: autor do trabalho.

Na primeira parte do trabalho o MIP foi aplicado no modo clássico de extração em fase sólida (SPE) e a quantificação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Pela sensibilidade da CLAE, foi possível obter faixa de trabalho mais ampla e detecção de menores concentrações de tetraciclina, no intervalo linear de 4,5 – 155 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Na segunda parte o MIP foi aplicado no sistema de fluxo lateral e a quantificação realizada por medidas da intensidade do sinal colorimétrico obtido. Em função da sensibilidade do método usado, o valor de *cutoff* foi de 34 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a faixa linear de trabalho foi de 45 – 180 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os métodos colorimétricos geralmente possuem valores de LOD e LOQ superiores a outros métodos (como a fluorescência, por exemplo) devido ao limite de sensibilidade intrínseco à técnica. Contudo, os valores das figuras de mérito obtidas para o sistema de fluxo lateral foram próximas à quantificação realizada por CLAE. Por conseguinte, o método colorimétrico e a obtenção de imagens utilizando um smartphone se mostrou simples e eficaz, permitindo sua aplicação como alternativa viável aos leitores tradicionais de bancada.

No quesito de tempo de análise, o sistema de fluxo lateral apresentou vantagem. Após adicionada a amostra, em 10 min a resposta colorimétrica já pôde ser observada e em 60 min a imagem obtida para quantificação. Por conseguinte, o teste de fluxo lateral desenvolvido foi rápido no tempo para análise qualitativa e intermediário no tempo de quantificação. Contudo, mesmo com o tempo intermediário de quantificação, ainda assim o fluxo lateral foi mais rápido do que os testes que necessitaram de análise cromatográfica.

Na aplicação em SPE o MIP inicialmente interagiu por 90 min com a amostra e, após etapa de centrifugação e filtração (aproximadamente 15 min), foi para análise cromatográfica (corrida de 5 min), totalizando 110 min de análise.

Além disso, no teste de fluxo lateral, a tetraciclina pode ser avaliada diretamente ao ser adicionada na tira. Na aplicação em SPE era exigido as etapas iniciais de interação entre MIP e analito, centrifugação e filtração. Portanto, o teste de fluxo lateral dispensou a etapa de interação e separação da amostra, apresentando maior simplicidade.

Embora o teste de estabilidade não tenha sido avaliado para o fluxo lateral desenvolvido neste trabalho, acredita-se que ele possa ser armazenado por meses sem perder sua eficiência. Uma mesma suspensão de MIP foi utilizada por aproximadamente 6 meses consecutivos para construção dos testes nos ensaios de otimização; e o MIP sempre apresentou resposta para o analito.

Mais ainda, o desenvolvimento de testes de fluxo lateral contendo MIP apresentam a vantagem de o polímero possuir alta estabilidade por longo tempo quando secos e dispersos em fase sólida na membrana de nitrocelulose. Assim, é

possível que os testes fiquem armazenados em temperatura ambiente sem perder a sua eficiência. Estudos similares chegaram à essas conclusões ao comparar a reutilização (129) e a armazenagem por seis meses (130) do MIP.

Os MIPs apresentam essa vantagem frente aos materiais biológicos, que necessitam de armazenagem e transporte sob refrigeração. Além disso, mesmo após imobilizados ou suportados em algum material, os componentes biológicos ainda necessitam de refrigeração. Smolinska-Kempisty e colaboradores (131) compararam a estabilidade dos polímeros substituindo anticorpos em ensaios do tipo ELISA e concluíram que as placas contendo MIPs puderam ser armazenadas por 1 mês em temperatura ambiente sem perder a eficiência.

Deste modo, teste de fluxo lateral desenvolvido permitiu mostrar a viabilidade da aplicação dos polímeros impressos nesse tipo de dispositivo; abrindo para a possibilidade de aplicação de diferentes tipos de MIP e configurações do sistema para análise dos mais variados analitos.

Por fim, em função da pandemia de Covid-19 e consequente paralisação das atividades presenciais, o desenvolvimento do teste de fluxo lateral contendo aptâmero foi interrompido. Embora necessite de outros estudos, o teste mostrou grande possibilidade de funcionamento em função dos resultados preliminares obtidos; tanto na linha de teste quanto de controle.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novos tipos de MIP para determinação de tetraciclina foi realizado com sucesso. Por meio de todas as etapas de síntese, caracterização e otimização da eficiência, o MIP oco pode ser aplicado com sucesso no desenvolvimento de um teste de fluxo lateral inédito para determinação de tetraciclina.

Considerando a estrutura do trabalho para o teste de fluxo lateral contendo aptâmero como fase de reconhecimento seletivo, as etapas que foram executadas exibiram a viabilidade do teste, permitindo perspectivas para o avanço da pesquisa nessa área.

REFERÊNCIAS

- 1 RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. **Environmental Technology and Innovation**, v. 8, p. 40–56, 2017.
- 2 NOGUERA-OVIEDO, K.; AGA, D. S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 242–251, 2016.
- 3 AGÜERA, A. *et al.* New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 6, p. 3496–3515, 2013.
- 4 JAKIMSKA, A. *et al.* The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 277–298, 2014.
- 5 SALTHAMMER, T. Emerging indoor pollutants. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 224, p. 1–12, 2020.
- 6 GOGOI, A. *et al.* Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Water Environment: A Review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 169–180, 2018.
- 7 CHATURVEDI, P. *et al.* Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. **Environmental Research**, v. 194, 2021. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110664.
- 8 PEREIRA-MAIA, E. C. *et al.* Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.
- 9 PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. **Talanta**, v. 182, p. 1–21, 2018.
- 10 FUOCO, D. Classification framework and chemical biology of Tetracycline-structure-based drugs. **Antibiotics**, v. 1, 2012. DOI: 10.3390/antibiotics1010001.
- 11 GUERRA, W. *et al.* Impact of metal coordination on the antibiotic and non-antibiotic activities of tetracycline-based drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327–328, p. 188–199, 2016.
- 12 PULICHARLA, R. *et al.* Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 1–14, 2017.
- 13 PRADO, C.; MACHINSKI-JUNIOR, M. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 448–456, 2011.

- 14 XU, L. *et al.* Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 753. 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141975.
- 15 EBELE, A.J. *et al.* Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017.
- 16 BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: Production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 25–40, 2014.
- 17 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa sda nº 11**. Brasília: Diário Oficial da União. 2004.
- 18 COLAÇO, R. *et al.* Poluição por resíduos contendo compostos farmacologicamente ativos: Aspectos ambientais, geração a partir dos esgotos domésticos e a situação do Brasil. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 539–548, 2014.
- 19 LIMA, D. R. S. *et al.* Fármacos e desreguladores endócrinos em águas Brasileiras: Ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1043–1054, 2017.
- 20 LIU, X. *et al.* Recent advances in sensors for tetracycline antibiotics and their applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 260–274, 2018.
- 21 TASCI, F. *et al.* Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Food Control**, v. 127. 2021. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108147.
- 22 SONG, J. *et al.* Novel Fe-based metal–organic framework (MOF) modified carbon nanofiber as a highly selective and sensitive electrochemical sensor for tetracycline detection. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, 2022. DOI: 10.1016/j.cej.2021.130913.
- 23 YUE, Y. *et al.* Biochar accelerates the removal of tetracyclines and their intermediates by altering soil properties. **Journal of Hazardous Materials**, v. 380, 2019. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.120821.
- 24 EHTESABI, H. *et al.* Carbon dots-Sodium alginate hydrogel: A novel tetracycline fluorescent sensor and adsorber. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, 2019. DOI: 10.1016/j.jece.2019.103419.
- 25 SANJUÁN, A. M. *et al.* Recent developments in sensing devices based on polymeric systems. **Reactive and Functional Polymers**, v. 133, p. 103–125, 2018.
- 26 BELBRUNO, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. **Chemical Reviews**, v. 119, p. 94–119, 2018.

- 27 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.
- 28 PUPIN, R. R. *et al.* Molecularly Imprinted Polymers (MIP): From the Bulk Synthesis to Hybrid Material to Classic and New Applications. *In*: T Quinn (Ed.); **Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Challenges, Uses and Prospects**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2016. Chap. 2, p. 46–118.
- 29 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087–1101, 2005.
- 30 WŁOCH, M.; DATTA, J. Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 86, p. 17–40, 2019.
- 31 MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1742–1778, 2005.
- 32 HASHIM, S. N. N. S. *et al.* A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmaterol imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 35–43, 2014.
- 33 DONG, C. *et al.* Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique. **European Polymer Journal**, v. 145, 2021. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110231.
- 34 LÓPEZ, F. L. M. *et al.* Systematic study on the synthesis of novel ion-imprinted polymers based on rhodizonate for the highly selective removal of Pb(II). **Reactive and Functional Polymers**, v. 159, 2021. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104805.
- 35 QUINTO, M. L. *et al.* Synthesis, characterization, and evaluation of a selective molecularly imprinted polymer for quantification of the textile dye acid violet 19 in real water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121374
- 36 KHAN, S. *et al.* Synthesis and characterization of magnetic-molecularly imprinted polymers for the HPLC-UV analysis of ametryn. **Reactive and Functional Polymers**, v. 122, p. 175–182, 2018.
- 37 GENG, Y. *et al.* The fabrication of highly ordered fluorescent molecularly imprinted mesoporous microspheres for the selective sensing of sparfloxacin in biological samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 281, p. 821–829, 2019.
- 38 ANSARI, S.; MASOUM, S. Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: Current progress and future implications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 114, p. 29–47, 2019.

39 DINC, M. *et al.* Recent advances on core–shell magnetic molecularly imprinted polymers for biomacromolecules. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 114, p. 202–217, 2019.

40 WANG, S. *et al.* Dual-template imprinted polymers for class-selective solid-phase extraction of seventeen triazine herbicides and metabolites in agro-products. **Journal of Hazardous Materials**, v. 367, p. 686–693, 2019.

41 DINALI, L. A. F. *et al.* Mesoporous molecularly imprinted polymer core@shell hybrid silica nanoparticles as adsorbent in microextraction by packed sorbent for multiresidue determination of pesticides in apple juice. **Food Chemistry**, v. 345, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128745.

42 ZHANG, K. *et al.* Chromatographic separation of hemoglobin variants using robust molecularly imprinted polymers. **Talanta**, v. 199, p. 27–31, 2019.

43 LOWDON, J. W. *et al.* MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays – An overview of the current status quo. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 325, 2020. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128973.

44 WANG, G. N. *et al.* Application of molecularly imprinted polymer based matrix solid phase dispersion for determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in meat. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1065–1066, p. 104–111, 2017.

45 MORTARI, B. *et al.* A spot test for direct quantification of acid green 16 adsorbed on a molecularly imprinted polymer through diffuse reflectance measurements. **Analytical Methods**, v. 13, n. 4, p. 453–461, 2021.

46 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.

47 OSREDKAR, J. Point-of-Care testing in laboratory medicine. *In*: CHENG, C.M. (ed.). **Point-of-Care Diagnostics - New Progresses and Perspectives**. Croatia: IAPC Publishing, 2017. Chap.1, p. 1–28.

48 REPORTLINKER. **Point of Care/Rapid Diagnostics Market by Product, Platform, Mode of Purchase, Enduser - Global Forecast to 2025**. Disponível em: https://www.reportlinker.com/p03973710/Point-of-Care-Diagnostics-Market-by-Products-End-Users-Over-the-Counter-Prescription-Based-Global-Forecast-to.html?utm_source=GNW. Acesso em: 28 abr. 2021.

49 ERNST, E. *et al.* Technical considerations to development of serological tests for SARS-CoV-2. **Talanta**, v. 224, 2021. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121883.

50 BAUMERT, J. L., TRAN, D. H. Lateral flow devices fo detecting allergens in food. *In*: FLANAGAN, S. (ed.). **Handbook of Food Allergen Detection and Control**. Elsevier: Woodhead Publishing Limited, 2015. Chap. 11, p. 219–228.

51 PAROLO, C. *et al.* Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3788–3816, 2020.

52 MAHMOUDI, T. *et al.* Recent advancements in structural improvements of lateral flow assays towards point-of-care testing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 13–30, 2019.

53 MAHMOUDI, T. *et al.* Lateral flow assays towards point-of-care cancer detection: A review of current progress and future trends. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 125, 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115842.

54 TIAN, Y. *et al.* Metal-polydopamine framework based lateral flow assay for high sensitive detection of tetracycline in food samples. **Food Chemistry**, v. 339, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127854.

55 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.

56 QIAN, J. *et al.* Gold nanostars-enhanced Raman fingerprint strip for rapid detection of trace tetracycline in water samples. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 232, 2020. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118146.

57 CHEN, L. *et al.* Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2922–2942, 2011

58 HALHALLI, M. R. *et al.* Thin walled imprinted polymer beads featuring both uniform and accessible binding sites. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 15, p. 2909–2919, 2012.

59 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.

60 MADHURI, R. *et al.* Combination of Molecular Imprinting and Nanotechnology: Beginning of a New Horizon. **Advanced Biomaterials and Biodevices**, p. 367–422, 2014.

61 NIU, M. *et al.* Core-shell nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers: a review. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 10, p. 2677–2695, 2016.

62 BHOGAL, S. *et al.* Core-shell structured molecularly imprinted materials for sensing applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 133, p. 11–22, 2020.

63 KUDR, J. *et al.* Magnetic Nanoparticles : From Design and Synthesis to Real World Applications. **Nanomaterials**, v. 7, n. 9, 2017. DOI: 10.3390/nano7090243.

64 CAI, W.; GUPTA, R. B. Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding. **Separation and Purification Technology**, v. 35, n. 3, p. 215–221, 2004.

65 CHEN, L. *et al.* Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 18, p. 3710–3719, 2009.

66 ASHLEY, J. *et al.* A multifunctional molecularly imprinted polymer-based biosensor for direct detection of doxycycline in food samples. **Talanta**, v. 182, p. 49–54, 2018.

67 WANG, S. X. *et al.* Specific adsorption of tetracycline from milk by using biocompatible magnetic molecular imprinting material and evaluation by ECD. **Food Chemistry**, v. 326, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126969.

68 PIZAN-AQUINO, C. *et al.* Evaluation of the performance of selective M-MIP to tetracycline using electrochemical and HPLC-UV method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 245, 2020. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2020.122777.

69 HU, X. *et al.* A strong blue fluorescent nanoprobe based on Mg/N co-doped carbon dots coupled with molecularly imprinted polymer for ultrasensitive and highly selective detection of tetracycline in animal-derived foods. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 338, 2021. DOI: 10.1016/j.snb.2021.129809.

70 YU, J. *et al.* Fluorescent sensing system based on molecularly imprinted phase-change microcapsules and carbon quantum dots for high-efficient detection of tetracycline. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 599, p. 332–350, 2021.

71 FAN, D. *et al.* Hollow molecular imprinted polymers towards rapid , effective and selective extraction of caffeic acid from fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1470, p. 27–32, 2016.

72 PRASAD, B. B.; SINGH, K. Molecularly imprinted polymer-based core-shells (solid vs hollow) @ pencil graphite electrode for electrochemical sensing of certain anti-HIV drugs. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 167–174, 2017.

73 ZHAO, P. *et al.* One novel chemiluminescence sensor for determination of fenpropatrin based on molecularly imprinted porous hollow microspheres. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 166–172, 2012.

74 FAN, H. *et al.* Monodisperse hollow-shell structured molecularly imprinted polymers for photocontrolled extraction α -cyclodextrin from complex samples. **Food Chemistry**, v. 281, n. 1800, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.12.084.

75 FAN, D. *et al.* Synthesis and characterization of hollow porous molecular imprinted polymers for the selective extraction and determination of caffeic acid in fruit samples. **Food Chemistry**, v. 224, p. 32–36, 2017.

76 JI, S. *et al.* A hollow porous molecularly imprinted polymer as a sorbent for the extraction of 7 macrolide antibiotics prior to their determination by HPLC-MS/MS. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 3, 2018. DOI: 10.1007/s00604-018-2728-3.

77 ZHAO, X. *et al.* Hollow molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor for rapid detection of methimazole in food samples. **Food Chemistry**, v. 309, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125787.

78 JI, K. *et al.* Preparation of hollow magnetic molecularly imprinted polymer and its application in silybin recognition and controlled release. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 180, 2020. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.113036.

79 HUA, S. *et al.* Fabrication and evaluation of hollow surface molecularly imprinted polymer for rapid and selective adsorption of dibenzothiophene. **Chemical Engineering Journal**, v. 345, p. 414–424, 2018.

80 SHI, S. *et al.* Effective synthesis of magnetic porous molecularly imprinted polymers for efficient and selective extraction of cinnamic acid from apple juices. **Food Chemistry**, v. 237, p. 198–204, 2017.

81 CHEN, M. *et al.* A hollow visible-light-responsive surface molecularly imprinted polymer for the detection of chlorpyrifos in vegetables and fruits. **Food Chemistry**, v. 355, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129656.

82 ZHOU, J. *et al.* Surface molecularly imprinted thermo-sensitive polymers based on light-weight hollow magnetic microspheres for specific recognition of BSA. **Applied Surface Science**, v. 486, p. 265–273, 2019.

83 GONG, C. *et al.* Photoresponsive hollow molecularly imprinted polymer for trace triamterene in biological samples. **Materials Science & Engineering C**, v. 76, p. 568–578, 2017.

84 STOBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, p. 62–69, 1968.

85 DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 209–218, 2004.

86 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Determinação de Índice de CMP (caseinomacropéptido) em leite fluido e leite em pó por CLAE**. p. 1–10, 2013.

87 SELLERGREN, B., HALL, A. J. Fundamental aspects on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers. In: SELLERGREN, B. (ed.). **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**. 1 ed. Elsevier, 2000. V. 23, chap. 2, p. 21–57.

88 SILVA, C. R. *et al.* Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270–276, 2004.

89 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. The Column. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. Chap. 5, p. 200–253.

90 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.

91 XIANG, H. *et al.* Hollow porous molecularly imprinted polymers for rapid and selective extraction of cinnamic acid from juices. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1049–1050, p. 1–7, 2017.

92 HU, X. *et al.* Hydrophilic gallic acid-imprinted polymers over magnetic mesoporous silica microspheres with excellent molecular recognition ability in aqueous fruit juices. **Food Chemistry**, v. 179, p. 206–212, 2015.

93 SÁ DA ROCHA, O. R. *et al.* Avaliação do processo adsorptivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante cinza reativo BF-2R. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1369–1374, 2012.

94 VIDAL, C. B. *et al.* Cinética de adsorção. In: NASCIMENTO, R. F. (ed.). **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 1 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. Cap. 3, p. 51–72.

95 BOYD, G. E. *et al.* The Exchange Adsorption of Ions from Aqueous Solutions by Organic Zeolites. II. Kinetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 11, p. 2836–2848, 1947.

96 XIE, L. *et al.* Novel molecular imprinted polymers over magnetic mesoporous silica microspheres for selective and efficient determination of protocatechuic acid in *Syzygium aromaticum*. **Food Chemistry**, v. 178, p. 18–25, 2015.

97 BAGGIANI, C. *et al.* A Connection between the binding properties of imprinted and nonimprinted polymers: A change of perspective in molecular imprinting. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1513–1518, 2012.

98 ANSELL, R. J. Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers. In: MATTIASSON, B.; YE, L. (eds.) **Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology**. Springer International Publishing, 2015. p. 51 - 93.

99 REFAAT, D. *et al.* Strategies for molecular imprinting and the evolution of MIP nanoparticles as plastic antibodies—synthesis and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, 2019. DOI: 10.3390/ijms20246304.

100 MARESTONI, L. D. *et al.* Semi-Empirical Quantum Chemistry Method for Pre-Polymerization Rational Design of Ciprofloxacin Imprinted Polymer and Adsorption Studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 109–118, 2016.

101 LEANDRO-SILVA, E. *et al.* Application of Langmuir and Freundlich models in the study of banana peel as bioadsorbent of copper (II) in aqueous medium. **Revista Materia**, v. 25, n. 2, 2020. DOI: 10.1590/S1517-707620200002.1056.

102 OLIVEIRA, F. M. *et al.* Evaluation of the adsorption process using green coconut mesocarp for removal of methylene blue dye. **Revista Materia**, v. 23, n. 4, 2018. DOI: 10.1590/s1517-707620180004.0557.

103 CITARTAN, M.; TANG, T. H. Recent developments of aptasensors expedient for point-of-care (POC) diagnostics. **Talanta**, v. 199, p. 556–566, 2019.

104 HAN, M. *et al.* An octuplex lateral flow immunoassay for rapid detection of antibiotic residues, aflatoxin M1 and melamine in milk. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 292, p. 94–104, 2019.

105 BU, T. *et al.* Hierarchical molybdenum disulfide nanosheets based lateral flow immunoassay for highly sensitive detection of tetracycline in food samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 320, 2020. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128440.

106 BAI, F. *et al.* Rhombic-like Al nanosupporter-based fluorescent immunochromatographic assay for the sensitive detection of tetracycline. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 324, 2020. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128721.

107 CHEN, A.; YANG, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 71, p. 230–242, 2015.

108 RÖTHLISBERGER, P.; HOLLENSTEIN, M. Aptamer chemistry. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 134, p. 3–21, 2018.

109 DHIMAN, A. *et al.* Aptamer-based point-of-care diagnostic platforms. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 246, p. 535–553, 2017.

110 DAI, Y. *et al.* G-quadruplex specific thioflavin T-based label-free fluorescence aptasensor for rapid detection of tetracycline. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 238, 2020. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118406.

111 HUANG, Y. *et al.* An aptamer cocktail-based electrochemical aptasensor for direct capture and rapid detection of tetracycline in honey. **Microchemical Journal**, v. 150, 2019. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104179.

112 JALALIAN, S. H. *et al.* Electrochemical and optical aptamer-based sensors for detection of tetracyclines. **Trends in Food Science & Technology**, v. 73, p. 45–57, 2018.

113 BIRADER, K. *et al.* Colorimetric aptasensor for on-site detection of oxytetracycline antibiotic in milk. **Food Chemistry**, v. 356, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129659.

114 NGUYEN, V. T. *et al.* Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 152, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112015.

115 HE, Y. *et al.* Development of fluorescent lateral flow test strips based on an electrospun molecularly imprinted membrane for detection of triazophos residues in tap water. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 15, p. 6026–6036, 2020.

116 WANG, S. *et al.* A molecular recognition assisted colorimetric aptasensor for tetracycline. **RSC Advances**, v. 6, n. 51, p. 45645–45651, 2016.

117 LAMARCA, R. S. *et al.* Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader. **Analytical Methods**, v. 11, n. 29, p. 3697–3705, 2019.

118 TURKEVICH, J.; COOPER, P. H. J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 55, p. 55–75, 1951.

119 GADHAVE, R. V. *et al.* Effect of glutaraldehyde on thermal and mechanical properties of starch and polyvinyl alcohol blends. **Designed Monomers and Polymers**, v. 22, n. 1, p. 164–170, 2019.

120 BORAH, H. J. *et al.* Cyclodextrine-glutaraldehyde cross-linked nanofiltration membrane for recovery of resveratrol from plant extract. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 1, 2020. DOI: 10.1016/j.jece.2019.103620.

121 NEUVONEN, P. J. Interactions with the Absorption of Tetracyclines. **Drugs**, v. 11, n. 1, p. 45–54, 1976.

122 DAI, Y. *et al.* A review on pollution situation and treatment methods of tetracycline in groundwater. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 5, p. 1005–1021, 2020.

123 KIMLING, J. *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 32, p. 15700–15707, 2006.

124 HAISS, W. *et al.* Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 2007.

125 VILELA, D. *et al.* Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 751, p. 24–43, 2012.

126 SHRESTHA, S.; WANG, B.; DUTTA, P. Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 279, 2020. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102162.

127 SUN, C. *et al.* Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline. **Dyes and Pigments**, v. 149, p. 867–875, 2018.

128 OWCZARZY, R. *et al.* Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. **Biochemistry**, v. 47, n. 19, p. 5336–5353, 2008.

129 KUPAI, J. *et al.* Long-term stability and reusability of molecularly imprinted polymers. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 666–673, 2017.

130 VALERO-NAVARRO, A. *et al.* Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4520–4525, 2011.

131 SMOLINSKA-KEMPISTY, K. *et al.* A comparison of the performance of molecularly imprinted polymer nanoparticles for small molecule targets and antibodies in the ELISA format. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. DOI: 10.1038/srep37638.