

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/06/2022.

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:



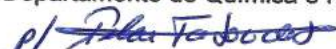
Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



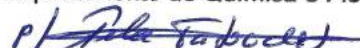
Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



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 imunoensaios 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 hidrociorada

v: 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)

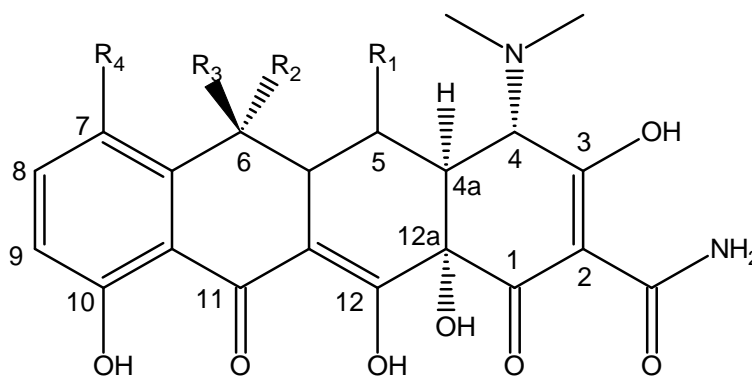
Na classe dos contaminantes emergentes são incluídos fármacos, hormônios, retardantes de chama, nanomateriais, compostos perfluorados, microplásticos, entre outros. Dentre esses, os fármacos são amplamente pesquisados devido à importância que apresentam na manutenção da saúde do ser humano e, ao mesmo 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-enólico (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 $1,0 \times 10^{-10} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 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 R^2) 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.

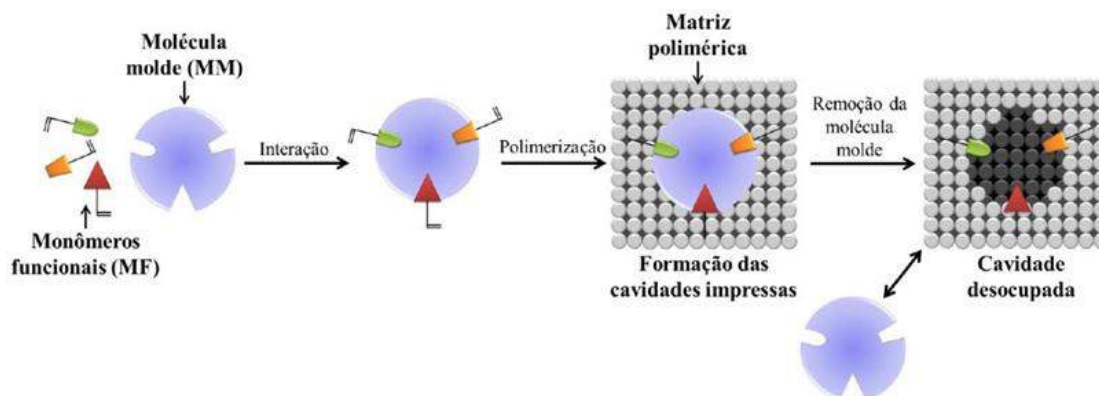


Figura 2 – Esquema de moldagem molecular na formação do MIP resumindo as etapas de reação e componentes da síntese.

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 rodionato 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.

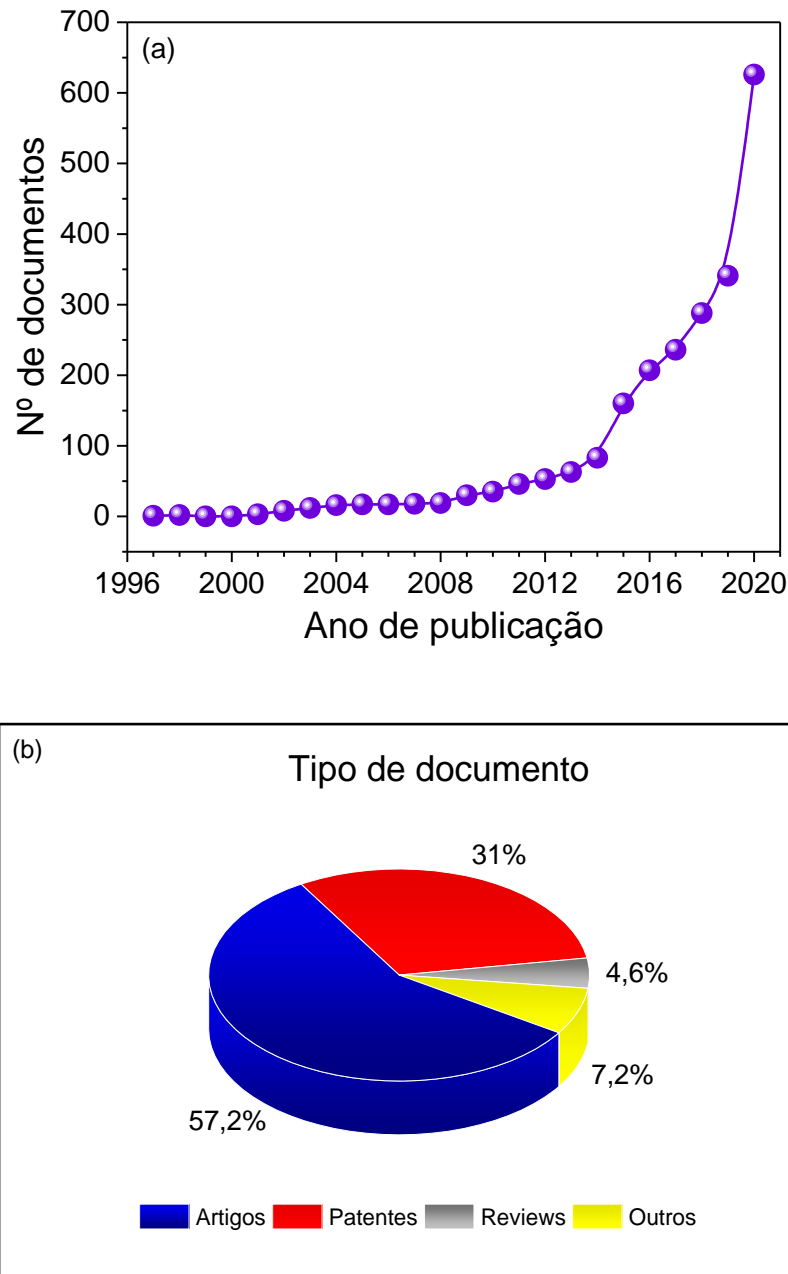


Figura 3 – (a) Levantamento anual do número de publicações utilizando o conceito *Lateral Flow Immunoassay* no intervalo de 1997 até 2020. (b) Distribuição das publicações em função do tipo de documento; na qual a categoria “outros” engloba “estudo de avaliação, estudo de comparação, ensaios clínicos, 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)

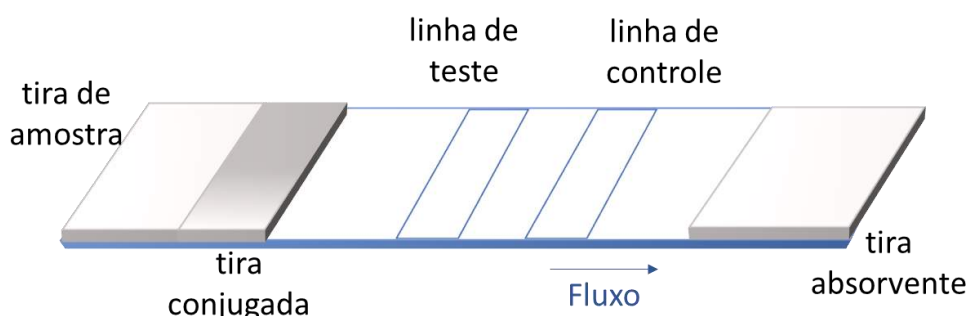


Figura 4 – Representação esquemática da tira de ensaio do tipo fluxo lateral com visão geral dos seus componentes e sentido do fluxo de solvente.

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.

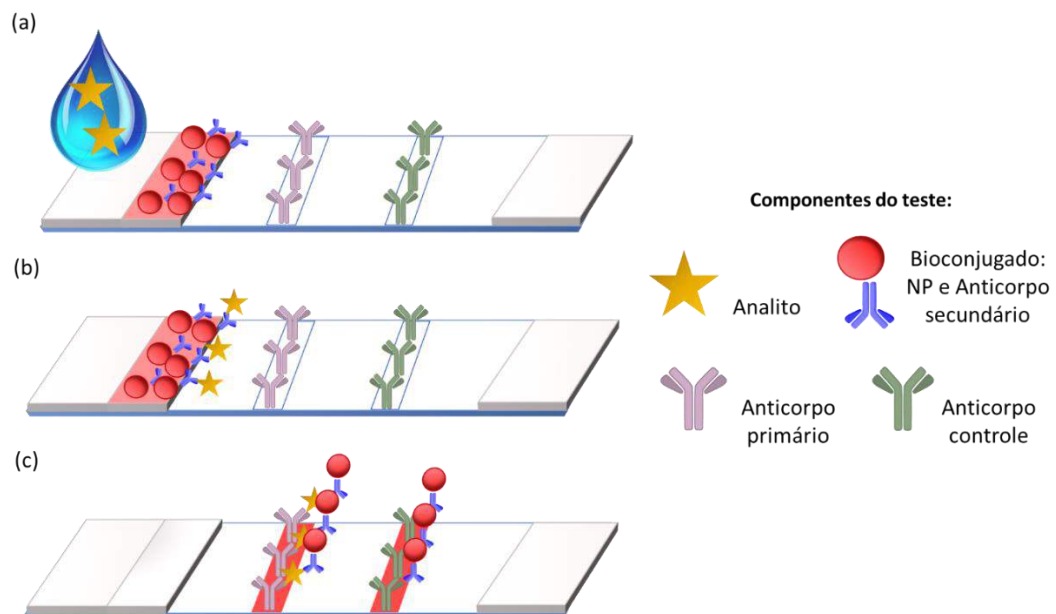


Figura 5 – Representação esquemática de funcionamento do imunoensaio não-competitivo de fluxo lateral com resposta positiva e dos componentes do teste. (a) Adição da amostra. (b) Eluição pelo sistema. (c) Resposta colorimétrica nas linhas de teste e controle.

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.

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.* Tetraciclinas e glicilciclinas: 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 tetraciclinas 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 for 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 SELLERGRÉN, B., HALL, A. J. Fundamental aspects on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers. In: SELLERGRÉN, 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.