

Desenvolvimento de novos materiais biomiméticos utilizando tecnologia de impressão molecular para o reconhecimento seletivo da albumina do soro bovino

Rui Ferreira Figueiredo

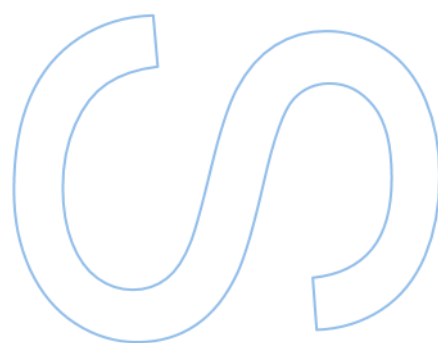
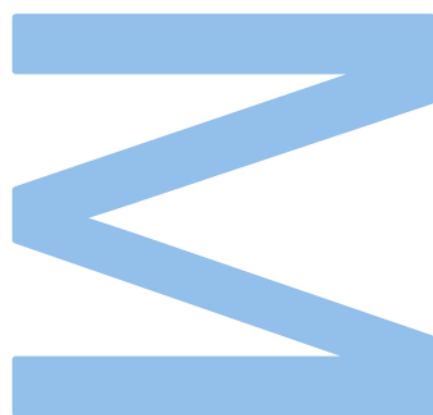
Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química
Departamento Química e Bioquímica
2º ano

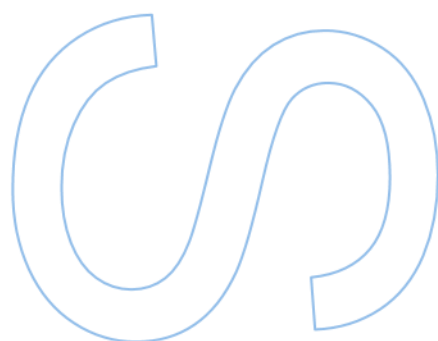
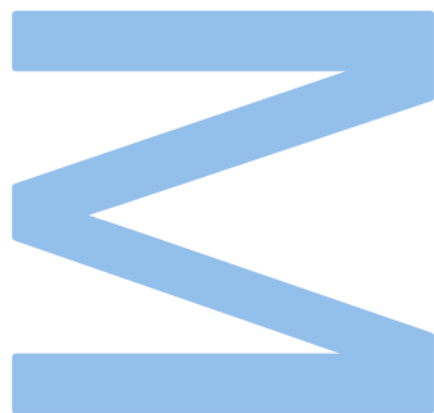
Orientador

Doutor José Adolfo Oliveira Ribeiro, Doutorado de Nível Inicial,
FCUP

Coorientador

Professor Doutor Carlos Manuel de Melo Pereira, Professor
Associado, FCUP





Ao meu avô, Anselmo.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Carlos Pereira, não só por ter proporcionado todas as condições essenciais para a execução deste trabalho, como também com o seu contributo para o meu desenvolvimento como profissional.

Ao Doutor José Ribeiro, por toda ajuda incansável e disponibilidade, partilha de conhecimento e paciência durante este último ano, foi sem dúvida uma peça fundamental para a realização desta dissertação. Além de ser uma fonte constante de motivação diária, contribuiu significativamente para o meu crescimento tanto no contexto profissional como pessoal.

Ao Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto (CIQUP), e às pessoas envolvidas, quero expressar a minha gratidão pela cordialidade e pela receção acolhedora.

Aos colegas da Química Analítica, Rui, Rodrigo e Inês pela disponibilidade e ajuda com a utilização da centrífuga a vácuo.

À FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), gostaria de agradecer pelo financiamento e pela bolsa de investigação no âmbito do projeto MyTag - PTDC/EEI-EEE/4832/2021.

Agradeço também a todos os professores que tive durante o mestrado, que de uma maneira ou outra ajudaram-me a crescer e a melhorar como pessoa.

A toda a comissão científica do mestrado MA3Q, o meu obrigado por me ouvirem e ajudarem sempre que foi necessário.

Aos meus pais e irmã, por todo o esforço e dedicação que tiveram que fazer para que eu pudesse estar aqui hoje a cumprir mais um objetivo com sucesso, sem dúvida que ficarei eternamente grato.

À minha namorada por todo o apoio e motivação que me dá diariamente e que está sempre lá quando é preciso, o meu muito obrigado.

Aos meus avós, obrigado por me mostrarem que a família é a base de todo o nosso sucesso.

À minha família, em especial aos meus tios e primo que me acolheram como se fosse um filho e irmão e que também contribuíram para que tudo isto fosse possível.

A todos os meus amigos que me acompanharam, obrigado por terem partilhado comigo momentos incríveis e por me mostrarem que os bons amigos estão lá sempre que é preciso. É certo que levarei sempre comigo todas as memórias que partilhamos.

Resumo

A albumina do soro bovino (BSA) tem sido utilizada como um indicador da saúde da glândula mamária da vaca e da qualidade do leite. Contudo, têm sido reportadas reações alergénicas a esta proteína por parte de consumidores, além de algumas doenças, tais como a *diabetes mellitus*, a nefropatia membranosa e a “doença das vacas loucas”, poderem estar associadas com a exposição à BSA. Assim sendo, atualmente, é importante o desenvolvimento de novos métodos para a sua deteção e quantificação de forma rápida, barata, simples e com elevada seletividade, principalmente em produtos lácteos.

Neste contexto, os polímeros de impressão molecular foram utilizados neste trabalho como uma abordagem inovadora e promissora para o desenvolvimento de recetores sintéticos como alternativa aos anticorpos naturais, oferecendo elevada seletividade, estabilidade e reduzidos custos de produção.

Este trabalho teve início com a produção de polímeros de impressão molecular à escala nanométrica (nanoMIPs), através de dois métodos de síntese, a polimerização por precipitação e síntese em fase sólida. Após a caracterização dos nanoMIPs pela técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), verificou-se que os materiais obtidos pelo método de síntese de polimerização por precipitação, foram aqueles que apresentaram melhores propriedades (menor tamanho, maior potencial zeta e menor índice de polidispersão) a nível de tamanho (entre 60 e 110 nm), potencial zeta ($> +30$ mV) e índice de polidispersão ($PDI < 0,3$). Os materiais obtidos pela síntese em fase sólida não foram utilizados para a construção do sensor, devido à formação de agregados, tendo apresentado um tamanho maior e um potencial zeta abaixo dos valores de referência para se considerar uma boa estabilidade coloidal.

Na impressão molecular de proteínas, são inúmeras as vantagens da utilização de um epítipo como molécula molde (em vez da proteína inteira), em termos de afinidade, desempenho e/ou custos de produção dos MIPs. Neste trabalho, produziu-se nanoMIPs utilizando um epítipo da BSA (E-nanoMIPs), e os resultados foram comparados com os obtidos com a utilização da BSA como molécula molde (nanoMIPs).

De modo a estudar a afinidade dos recetores sintetizados (nanoMIPs, E-nanoMIPs e nanoNIPs - sintetizados na ausência da molécula molde - para a deteção BSA foram realizados estudos utilizando a técnica de ressonância de plasmão de superfície (SPR). Para comparação dos resultados obtidos, utilizou-se um anticorpo monoclonal com afinidade para a BSA. Após o passo da imobilização dos recetores nos substratos de SPR, foi possível determinar o valor da constante de afinidade (K_D) para cada um dos recetores através do modelo de Langmuir. Os E-nanoMIPs obtidos

demonstraram uma boa afinidade de ligação à BSA ($K_D = 7,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), relativamente próxima à do anticorpo ($K_D = 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). O anticorpo natural apresentou maior afinidade para a BSA, com um valor de K_D cerca de uma ordem de grandeza superior à dos nanoMIPs ($1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e nanoNIPs ($1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Contudo é importante considerar as desvantagens associadas à sua utilização. O anticorpo natural é mais caro, apresenta uma baixa estabilidade em certas condições (pH, temperatura, etc) e requer cuidados especiais de utilização e armazenamento. Assim sendo, os E-nanoMIPs foram utilizados neste trabalho na construção de para a deteção da BSA.

O sensor ótico para deteção e quantificação da BSA foi construído através da imobilização covalente dos E-nanoMIPs nos substratos de SPR de ouro de acordo com as seguintes etapas:

- (i) formação de uma camada auto-montada (SAM) constituída pelo ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA);
- (ii) ativação dos grupos funcionais carboxílico ($-\text{COOH}$) com uma solução de 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)-carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS);
- (iii) imobilização covalente dos E-nanoMIPs;
- (iv) desativação dos ésteres reativos que não reagiram com uma solução de etanolamina.

Após a imobilização, as condições experimentais foram otimizadas de modo a aumentar a performance do sensor, nomeadamente através do tratamento da superfície para minimizar a adsorção não específica de moléculas. Após os estudos, foi possível concluir que a utilização do tiol hidrofílico 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) na superfície do sensor e a adição do Tween 20 às soluções padrão e amostras foram fundamentais para minimizar a adsorção não específica. A regeneração da superfície do sensor foi conseguida utilizando uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (m/v), preparada em tampão acetato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0.

Após a otimização das condições experimentais, foram realizados estudos de deteção da BSA em PB, tendo-se estimados os parâmetros analíticos do sensor, tais como a sensibilidade, a zona de resposta linear e os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ). A gama linear obtida foi no intervalo de concentrações entre $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O método apresentou uma sensibilidade de $4,27 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, um LOD de $1,02 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um LOQ de $3,39 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Uma vez que a quantidade de BSA no leite é normalmente superior a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o sensor ótico produzido permite a deteção da BSA em amostras de leite. Os valores de recuperação

obtidos encontram-se dentro do intervalo estabelecido (80-120%), variando de 97% a 103%, com um desvio padrão relativo (RSD) baixo (entre 1% e 4%).

Foram também realizados estudos de seletividade. A caseína e a vancomicina foram escolhidas como interferentes para este estudo. Apesar de o biossensor ter sido projetado para ser seletivo para a BSA, os resultados mostram que este também responde significativamente à caseína. Por outro lado, o sensor teve uma resposta pouco significativa à vancomicina.

De modo a testar a aplicabilidade do sensor, realizaram-se estudos preliminares para determinar a concentração de BSA em leite bovino. Após o pré-tratamento da amostra de leite, a concentração de BSA obtida pelo sensor ótico ($(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi próxima da obtida pelo teste de referência do ácido bicinconínico (BCA) ($(8,22 \pm 0,08) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), o que indica que o sensor ótico poderá vir a ser uma alternativa viável aos testes colorimétricos e cromatográficos atualmente utilizados para detetar a BSA no leite. Contudo, é necessário validar esses resultados repetindo e fazendo novas experiências em diferentes condições e tipos de amostras.

Palavras-Chave: polímeros de impressão molecular, materiais biomiméticos, nanogéis, polímeros de impressão molecular à escala nano (nanoMIPs), nanopartículas (NPs) de impressão molecular (nanoMIPs), sensor ótico, albumina do soro bovino (BSA), epítipo, polimerização por precipitação, síntese em fase sólida, ressonância de plasmão de superfície (SPR).

Abstract

Serum bovine albumin (BSA) has been used as an indicator of the health of the cow's mammary gland and milk quality. In terms of consumer, allergic reactions BSA have been reported, and some diseases such as diabetes mellitus, membranous nephropathy, and "mad cow disease" are being associated with BSA exposure. Therefore, it is important to develop new methods for its detection and quantification in a rapid, cost-effective, simple, and highly selective manner, especially in dairy products.

In this context, molecular imprinting polymers has been employed in this study as an innovative and promising approach for the development of synthetic receptors as an alternative to natural antibodies, offering high selectivity, stability, and reduced production costs.

This work began with the production of nanoscale MIPs (nanoMIPs) using two synthesis methods, precipitation polymerization and solid-phase synthesis. After characterizing the nanoMIPs using dynamic light scattering (DLS) technique, it was found that materials obtained through precipitation polymerization exhibited better properties (smaller size, higher zeta potential and lower polydispersity index) in terms of size (between 60 and 110 nm), zeta potential ($> +30$ mV), and polydispersity index (PDI < 0.3). Materials obtained through solid-phase synthesis were not used for sensor construction due to the formation of large aggregates and a zeta potential below the reference values for good colloidal stability.

In protein molecular imprinting, there are numerous advantages to use the epitope region as the template molecule (instead of the whole protein) in terms of affinity, performance, and/or production costs of the MIPs. In this work, nanoMIPs were produced using a BSA epitope (E-nanoMIPs), and the results were compared with those obtained using BSA as the template molecule (nanoMIPs).

To study the affinity of the synthesized receptors (nanoMIPs, E-nanoMIPs, and non-imprinted polymers or nanoNIPs) for BSA, studies were conducted using surface plasmon resonance (SPR) technique. For comparison, a monoclonal antibody with affinity for BSA was used. After immobilizing the receptors on SPR substrates, the affinity constant (K_D) values for each receptor were determined using the Langmuir model. The obtained E-nanoMIPs demonstrated good binding affinity to BSA ($K_D = 7.1 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$), which was similar to that of the antibody ($K_D = 2.5 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$). The natural antibody exhibited higher affinity for BSA, with a K_D value approximately one order of magnitude higher than that of nanoMIPs (1.2×10^{-5} mol L $^{-1}$) and nanoNIPs (1.2×10^{-5} mol L $^{-1}$). However, it is essential to consider the disadvantages associated with natural antibodies. Natural antibodies are more expensive, have low stability under certain

conditions (pH, temperature, etc.), and require special handling and storage. Therefore, E-nanoMIPs were used in this work for BSA detection.

The optical sensor for BSA detection and quantification was constructed by covalently immobilizing E-nanoMIPs on gold SPR substrates following these steps:

- (i) Formation of a self-assembled monolayer (SAM) consisting of 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA).
- (ii) Activation of carboxyl functional group (-COOH) groups with a solution of 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS).
- (iii) Covalent immobilization of E-nanoMIPs.
- (iv) Deactivation of unreacted reactive esters with an ethanolamine solution.

After immobilization, experimental conditions were optimized to enhance sensor performance, especially by treating the surface to minimize nonspecific molecule adsorption. Surface treatment with hydrophilic thiol 6-mercapto-1-hexanol (MCH) and the addition of Tween 20 to standard and sample solutions were found to be essential to minimize nonspecific adsorption. Surface regeneration was achieved using a 0.1% (w/v) solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) prepared in 0.010 mol L⁻¹ acetate buffer at pH 4.0.

After optimizing the experimental conditions, BSA detection studies in phosphate buffer (PB) were conducted, and sensor analytical parameters such as sensitivity, linear response range, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) were estimated. The linear range obtained was between 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ and 1.5×10^{-5} mol L⁻¹. The method exhibited a sensitivity of 4.27×10^6 mol⁻¹ L, an LOD of 1.02×10^{-6} mol L⁻¹ and an LOQ of 3.39×10^{-6} mol L⁻¹. Since the BSA quantity in milk is typically higher than 1.5×10^{-6} mol L⁻¹, the optical sensor produced allows for BSA detection in milk samples. The recovery values obtained fell within the established range (80-120%), ranging from 97% to 103%, with a low relative standard deviation (RSD) of between 1% and 4%.

Selective studies were also conducted, with casein and vancomycin chosen as interferents for this study. Although the biosensor was designed to be selective for BSA, the results showed that it also responded significantly to casein. On the other hand, the sensor exhibited a less significant response to vancomycin.

To test the sensor's applicability, preliminary studies were conducted to determine the BSA concentration in bovine milk. After sample pretreatment, the BSA concentration obtained by the optical sensor ($(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) was close to that obtained by the bicinchoninic acid (BCA) reference test ($(8.22 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

This suggests that the optical sensor could potentially be a viable alternative to the colorimetric and chromatographic tests currently used to detect BSA in milk. However, further validation of these results is required by repeating experiments under different conditions and with various types of samples.

Keywords: molecular imprinting polymers, biomimetic materials, nanogels, nanoscale molecularly imprinted polymers (nanoMIPs), molecularly imprinted nanoparticles (nanoMIPs), optical sensor, bovine serum albumin (BSA), epitope, precipitation polymerization, solid-phase synthesis, surface plasmon resonance (SPR).

Índice

Resumo	3
Abstract	6
Lista de Tabelas	11
Lista de Figuras	12
Lista de Abreviaturas	15
1. Enquadramento e objetivo	17
2. Introdução.....	20
2.1. Albumina do soro bovino (BSA): composição, importância biológica e métodos de deteção	20
2.2. Polímeros de impressão molecular: uma alternativa aos anticorpos biológicos	22
2.3. A evolução da impressão molecular: da escala macro à nanoescala.....	24
2.4. Estratégias para a impressão molecular da BSA	27
2.5. Hidrogéis e a impressão molecular	27
2.6. Métodos de síntese de nanogéis de impressão molecular (nanoMIPs).....	29
2.6.1. Polimerização por precipitação	30
2.6.2. Síntese em fase sólida	31
2.6.3. Aplicações nanoMIPs	34
2.7. Impressão molecular utilizando epítomos	34
2.8. Ressonância de plasmão de superfície (SPR).....	35
3. Parte Experimental	36
3.1. Reagentes e soluções utilizados.....	36
3.2. Síntese por polimerização por precipitação	38
3.3. Síntese em fase sólida	41
3.4. Caracterização dos nanoMIPs por Dispersão dinâmica de luz (DLS)	48
3.5. Estudos de ressonância de plasmão de superfície (SPR).....	50
3.5.1. Imobilização dos nanoMIPs nos substratos de SPR	51
3.5.2. Estudo da afinidade	52

3.5.3.	Construção do sensor ótico e deteção da BSA.....	53
3.6.	Quantificação da BSA numa amostra de leite bovino	53
4.	Resultados Obtidos	55
4.1.	Síntese, otimização e caraterização dos nanoMIPs para o reconhecimento da BSA	56
4.1.1.	Síntese por polimerização por precipitação	56
4.1.2.	Síntese em fase sólida	61
4.1.3.	Comparação dos métodos de síntese.....	65
4.2.	Avaliação da afinidade dos nanoMIPs utilizando a técnica SPR	66
4.2.1.	Imobilização das NPs de impressão molecular nos substratos de SPR.	67
4.2.2.	Estudos de afinidade	68
4.3.	Sensor ótico para a deteção da BSA	72
4.3.1.	Minimização da adsorção não específica na superfície do sensor.....	73
4.3.2.	Regeneração do sensor	75
4.3.3.	Estudos de deteção	76
4.3.4.	Ensaio de recuperação	79
4.3.5.	Estudos de seletividade	79
4.4.	Quantificação da BSA numa amostra de leite bovino	81
5.	Conclusões.....	82
6.	Trabalho Futuro	84
7.	Referências Bibliográficas	85
8.	Anexos	96

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação genérica das propriedades dos anticorpos biológicos e MIPs.	23
Tabela 2. Tamanho e potencial zeta das partículas obtidas através da síntese de polimerização por precipitação	57
Tabela 3. Tamanho e potencial zeta das partículas obtidas através da síntese de polimerização por precipitação com o novo conjunto de reagentes	60
Tabela 4. Tamanho e potencial zeta dos E-nanoMIPs obtidos através da síntese de polimerização por precipitação	61
Tabela 5. Quantidade de APTMS imobilizado nas esferas de vidro.....	63
Tabela 6. Quantidade de proteína imobilizada nas esferas de vidro.....	63
Tabela 7. Tamanho e potencial dos nanoNIPs e E-nanoMIPs obtidos através da síntese em fase sólida.....	64
Tabela 8. Comparação das vantagens e desvantagens encontradas para cada um dos métodos de síntese.	66
Tabela 9. Variação do ângulo devido à imobilização dos recetores nos substratos de SPR (passo 5)	68
Tabela 10. Parâmetros estimados após ajuste do modelo de Langmuir aos resultados experimentais	71
Tabela 11. Parâmetros obtidos do sensor ótico para a deteção da BSA	78
Tabela 12. Percentagem de recuperação obtidas para as várias concentrações de BSA testadas.....	79
Tabela 13. Concentração de BSA obtida através do sensor ótico e do teste colorimétrico BCA.	81

Lista de Figuras

Figura 1. A) Representação esquemática da formação das cavidades moleculares utilizando a tecnologia de impressão molecular. Adaptada com permissão da referência [32]. B) Representação esquemática da detecção da BSA utilizando a técnica de ressonância de plasmão de superfície (SPR).	18
Figura 2. Estrutura química da albumina do soro bovino (BSA). Adaptada com permissão da referência [7]......	21
Figura 3. Representação esquemática da formação das cavidades moleculares utilizando a tecnologia de impressão molecular. Adaptada com permissão da referência [32].	24
Figura 4. Evolução da tecnologia de impressão desde a produção de macroMIPs para o reconhecimento de moléculas pequenas até à produção de MIPs de menor tamanho (microMIPs, nanoMIPs) para reconhecimento de grandes (bio)moléculas. Adaptada com permissão da referência [38]......	25
Figura 5. A) Comparação da resposta do sensor durante a exposição de nanoMIPs de diferentes tamanhos à atrazina; B) Comparação da resposta do sensor piezoelétrico à atrazina obtida pelo MIP de tamanho macroscópico e pelos nanoMIPs; C) Resposta do sensor, contendo anticorpos naturais e "plásticos", à atrazina e moléculas análogas (seletividade). Adaptada com permissão da referência [40].	26
Figura 6. Representação esquemática do comportamento de hidrogéis sensíveis a diversos estímulos externos. Adaptado com permissão da referência [43].	28
Figura 7. Representação esquemática dos monómeros, sequencia de aminoácidos da molécula molde (melitina) e processo de síntese por polimerização por precipitação. Adaptada com permissão da referência [49].	31
Figura 8. Representação esquemática do processo de síntese de nanoMIPs por impressão em fase sólida para reconhecimento de (A) moléculas pequenas. Adaptado com permissão da referência [59] (B) biomoléculas de grandes dimensões. Adaptado com permissão da referência [60].	33
Figura 9. Representação esquemática da impressão de epítomos (E-nanoMIPs). Adaptada da referência [84].	35
Figura 10. Representação esquemática de um SPR com a configuração de Kretschmann. Adaptado da referência [86].	36
Figura 11. Mistura de polimerização, antes e após a síntese	39
Figura 12. Membranas de diálise contendo a solução de nanoMIPs para remoção da molécula molde.....	40

Figura 13. Concentrador de vácuo (Univapo 100 ECH)	41
Figura 14. Montagem experimental para a ativação das esferas de vidro com hidróxido de sódio.	42
Figura 15. Esferas de vidro antes da silanização com solução aquosa de APTMS 15%.	43
Figura 16. Esferas de vidro antes e após incubação na solução de glutaraldeído 7% (vol/vol).	44
Figura 17. Solução de polimerização, com sistema de vácuo e colocada em ultrassons; Solução de polimerização borbulhada com N ₂	45
Figura 18. Ciclos alternados de vácuo e N ₂	46
Figura 19. Esferas de vidro imersas na mistura de polimerização.....	47
Figura 20. Montagem experimental para recolha dos nanoMIPs com maior afinidade para a BSA.	48
Figura 21. Equipamento utilizado, Malvern Zetasizer Nano ZS, da Malvern e cuvetes utilizadas para medição de tamanho e do potencial zeta (DTS0012 e DTS1070, respetivamente.)	49
Figura 22 Equipamento SPR Autolab ESPRIT e cuvette com o substratos de ouro.	51
Figura 23. Representação esquemática da imobilização dos nanoMIPs nos substratos de SPR.	52
Figura 24. Amostra de leite acidificada com HCl (pH 4,6) para precipitação da caseína	54
Figura 25. Tubos Amicon com cut-off de 30 kDa utilizados para purificação das amostras.....	55
Figura 26. Reagentes utilizados para a síntese por polimerização por precipitação... 56	
Figura 27. A) Tamanho médio das NPs de impressão molecular obtidos pelo método de síntese de polimerização por precipitação. B) Correlogramas obtidos para os nanoNIPs e nanoMIPs. Verde - nanoNIPs; Vermelho - nanoMIPs	58
Figura 28. Reagentes utilizados na nova receita para a síntese de nanoMIPs por polimerização por precipitação para reconhecimento da BSA.	59
Figura 29. Tamanho médio das NPs de impressão molecular obtidos pelo método de síntese em fase sólida. Verde – E-nanoMIPs (APTMS 15%/H ₂ O); Vermelho - E-nanoMIPs (APTMS 2%/tolueno); Azul – nanoNIPs.	65
Figura 30. Sensogramas representativos da imobilização dos recetores testados nos substratos de SPR: Linha 1, linha de base (0,010 mol L ⁻¹ PB); Linha 2, ativação do 11-MUA (0,010 mol L ⁻¹) com uma mistura de EDC/NHS; Linha 3, lavagem da superfície com PB (linha de base); Linha 4, imobilização dos recetores; Linha 5, lavagem da	

superfície com PB (linha de base); Linha 6, desativação dos esteres reativos com etanolamina (1 mol L^{-1}); Linha 7, lavagem da superfície com PB (linha de base); Linha 8, lavagem com uma solução de PB e SDS 1%; linha 9, lavagem com PB (linha de base).

..... 67

Figura 31. Sensogramas obtidos para os diferentes materiais. Zona vermelha – gama de concentrações onde não se observou resposta do sensor à BSA; Zona verde – gama de concentrações onde se observou resposta do sensor à BSA. 69

Figura 32. Representação da variação do ângulo em função da concentração de BSA. Ajuste do modelo de Langmuir aos resultados experimentais obtidos para a interação entre os diferentes recetores e a BSA. 70

Figura 33. Interação dos padrões de BSA com o sensor, após estabilização com os diferentes reagentes. 75

Figura 34. Dados do sensograma de SPR obtidos para uma concentração de BSA de $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Linha 1, linha de base (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 2, associação (BSA $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); Linha 3, dissociação (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 4, (SDS 0,1% (m/v) preparada em tampão acetato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 5, linha de base (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$). 76

Figura 35. A) Dados do sensograma de SPR obtidos para as soluções de BSA preparadas. Linha 1, linha de base (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 2, associação (BSA $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); Linha 3, dissociação (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 4, (SDS 0,1% (m/v) preparada em tampão acetato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 5, linha de base (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$). B) Curva de calibração obtida para deteção da BSA. 77

Figura 36. Resposta do sensor à BSA e aos interferentes caseína e vancomicina. ... 80

Figura 37. Espectrómetro T70 UV/VIS, PG Instruments..... 98

Figura 38. Determinação de silano (APTMS) com o teste da ninidrina..... 98

Figura 39. Curva de calibração – Teste da Ninidrina..... 99

Figura 40. Determinação da quantidade de BSA utilizando o teste de Bradford..... 100

Figura 41. Curva de calibração - Teste Bradford..... 101

Figura 42. Curva de calibração - Teste BCA 103

Lista de Abreviaturas

AAc – Ácido acrílico (do inglês, *Acrylic acid*)

AIBN – 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo)

APM – N-(3-aminopropil)metacrilamida

APS – Persulfato de amónio (do inglês, *Ammonium persulfate*)

APTMS – 3-aminopropiltrimetiloxisilano

BCA – Ácido bicinconínico (do inglês, *Bicinchoninic acid*)

BIS – N,N'-metilenobisacrilamida

BSA – Albumina do soro bovino (do inglês, *Bovine serum albumin*)

CTAB – brometo de cetiltrimetilamónio

DLS - Dispersão dinâmica de luz (do inglês, *Dynamic light scattering*)

EDC – 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)-carbodiimida

E-nanoMIPs – nanoMIPs com base na região do epítopo

IF - Fator de impressão (do inglês, *Imprinting factor*)

IM - Impressão molecular (do inglês, *Molecular imprinting*)

K_D - Constante de afinidade ou de dissociação

K_L – Constante de Langmuir

LOD – Limite de deteção (do inglês, *Limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês, *Limit of quantification*)

MCH - 6-mercaptop-1-hexanol

MIP – Polímero de impressão molecular (do inglês, *Molecularly imprinted polymer*)

MUA – Ácido 11-mercaptoundecanóico (do inglês, *11-mercaptoundecanoic acid*)

nanoMIPs - Polímeros de impressão molecular à escala nanométrica; Nanopartículas de impressão molecular ou nanopartículas molecularmente impressas (do inglês, *MIP nanoparticles*)

NHS – N-hidroxisuccinimida

NIPAm – N-isopropilacrilamida

NPs - Nanopartículas

PDI – Índice de polidispersão (do inglês, *Polydispersity index*)

PI – Ponto isoelétrico

SAM – Monocamada auto-montada (do inglês, *Self assembled monolayer*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*)

SPR – Ressonância de Plasmão de Superfície (do inglês, *Surface plasmon resonance*)

TBAm – N-terc-butilacrilamida

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

ζ - Potencial zeta

1. Enquadramento e objetivo

A albumina do soro bovino (BSA) desempenha um papel importante na avaliação da saúde da glândula mamária das vacas e na qualidade do leite. Do ponto de vista do consumidor, têm sido publicados estudos reportando a BSA como proteína alergénica.

Para a quantificação da BSA podem ser utilizados métodos colorimétricos tradicionais de determinação da concentração total de proteínas, como o método de Lowry e o método de Bradford [1]. Contudo, estes apresentam algumas limitações, como uma pequena gama de resposta linear e sensibilidade limitada. Outros métodos comumente utilizados, como o HPLC e fluorescência, também apresentam algumas desvantagens, como a elevada complexidade, processos de tratamento da amostra morosos e custo elevado quer dos equipamentos quer das medições (utilização de anticorpos como recetores, por exemplo) [1-3].

Sendo assim, este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia inovadora para a deteção da BSA em contexto de Qualidade Alimentar, como a análise da qualidade do leite, o controle de processos de produção de laticínios, proteção dos consumidores contra alergénios alimentares ou ainda na investigação na área alimentar.

O método de deteção ótico, com base na técnica de SPR, consistiu na incorporação de materiais biomiméticos, preparados por tecnologia de impressão molecular, que são capazes de se ligar seletivamente ao analito alvo de estudo (BSA), oferecendo elevada estabilidade no tempo e apresentando custos de produção reduzidos (Figura 1).

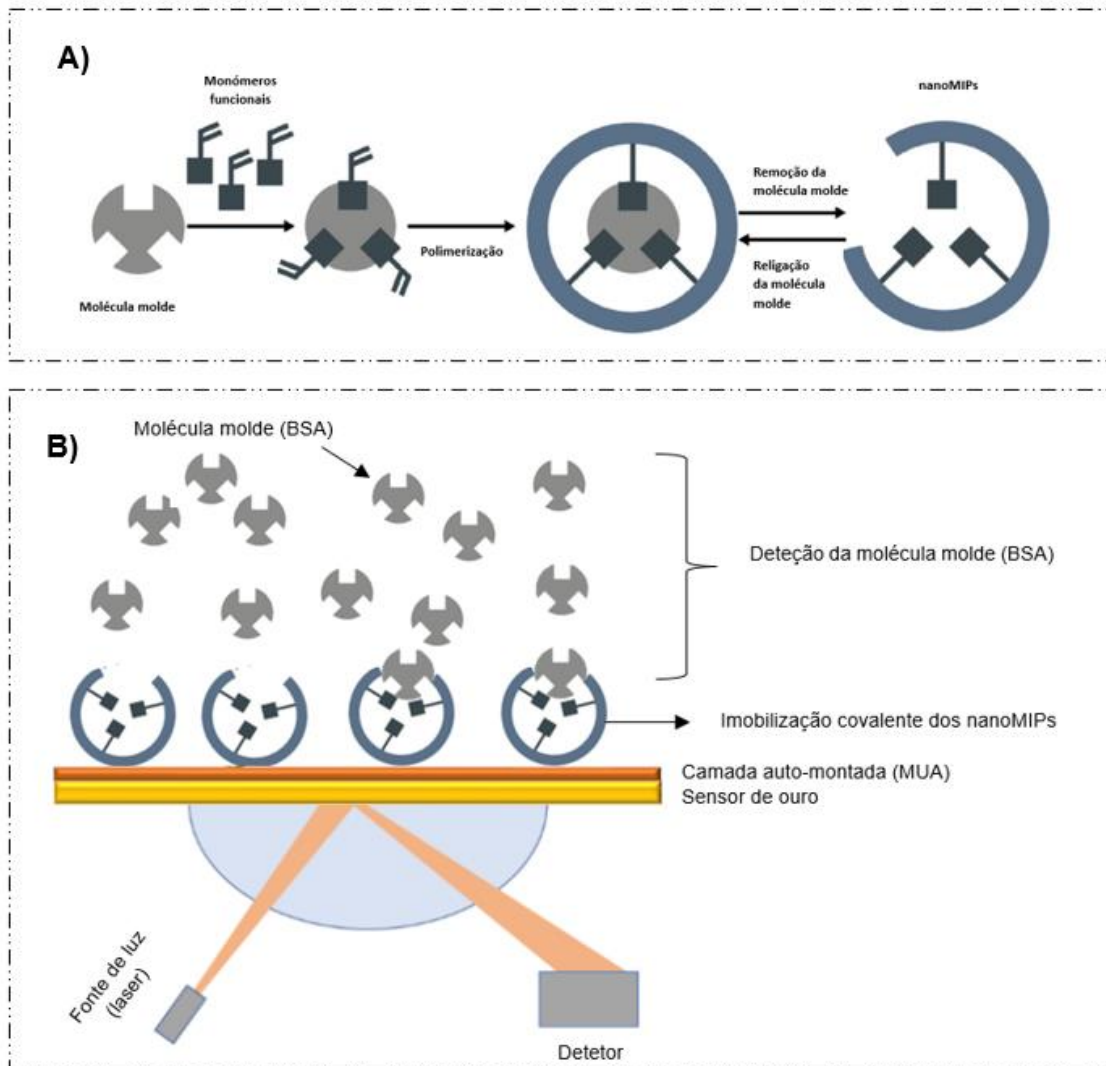


Figura 1. A) Representação esquemática da formação das cavidades moleculares utilizando a tecnologia de impressão molecular. Adaptada com permissão da referência [32]. B) Representação esquemática da detecção da BSA utilizando a técnica de ressonância de plasmão de superfície (SPR).

Os objetivos específicos do trabalho consistiram na síntese de polímeros de impressão molecular de formato esférico e tamanho nanométrico, designados doravante por nanopartículas de impressão, nanopartículas molecularmente impressas ou simplesmente nanoMIPs.

Para a síntese, foram utilizados dois métodos, a polimerização por precipitação e a síntese em fase sólida.

Um dos pontos centrais do trabalho consistiu na otimização do sensor SPR de modo a aumentar a sua performance, nomeadamente o tratamento da superfície para minimizar a adsorção não específica de moléculas e a regeneração da superfície do sensor,

permitindo determinar os parâmetros analíticos como os limites de deteção e quantificação e a sensibilidade

Durante a realização deste trabalho, parte do trabalho de revisão bibliográfica contribuiu para publicação de um artigo de revisão no domínio da deteção de proteínas através do uso de nanoMIPs:

intitulado ***“Imprinted Hydrogel Nanoparticles for Protein Biosensing: A Review”***, Silva, A. T., Figueiredo, R., Azenha, M., Jorge, P. A., Pereira, C. M., & Ribeiro, J. A. (2023). ACS sensors, 8(8), 2898-2920.

Além disso, parte do trabalho experimental foi apresentado no formato de póster em duas conferencias nacionais, nomeadamente:

- **“8th Portuguese Young Chemists Meeting”** UTAD, Vila Real, Portugal, 17 a 19 de Maio de 2023. “MIP nanoparticles for specific recognition of BSA”, Rui Figueiredo, Manuel Azenha, Carlos M. Pereira, José A. Ribeiro
- **“16º Encontro de Investigação Jovem da U.Porto (IJUP)”** Porto, Portugal, 10-12 de Maio de 2023. “MIP nanoparticles for specific recognition of BSA”, Rui Figueiredo, Manuel Azenha, Carlos M. Pereira, José A. Ribeiro

Fui bolseiro durante 12 meses (tendo começado em setembro de 2022) no âmbito do projeto MyTag - PTDC/EEI-EEE/4832/2021, financiado pela FCT, que tem como objetivo o desenvolvimento de sistemas de monitorização ambiental miniaturizados, com potencial para ser incorporados em sistemas robóticos autónomos, através da combinação de análise de dispersão, com modelos em tempo real e inteligência artificial (IA), utilizando polímeros de impressão molecular para reconhecimento do analito alvo de estudo.

2. Introdução

2.1. Albumina do soro bovino (BSA): composição, importância biológica e métodos de deteção

As albuminas do soro são as principais proteínas existentes no sistema circulatório e desempenham diversas funções fisiológicas, desde o armazenamento ao transporte de várias substâncias no sangue [4]. Estudos sugerem que a distribuição e metabolismo de muitas substâncias biologicamente ativas (metabolitos, medicamentos, etc.) no corpo humano estão relacionados com a sua afinidade para a albumina do soro [5, 6]. A albumina do soro bovino (BSA) é uma proteína constituída por 583 aminoácidos, possui um peso molecular de 66,4 kDa e tem uma forma globular (semelhante a um coração – ver Figura 2 [7]). Possui um ponto isoelétrico (PI) de ~4,5. O ponto isoelétrico é o pH no qual uma molécula tem uma carga igual a zero. Assim sendo, a valores de pH <4,5, a BSA tende a estar positivamente carregada, enquanto a pH>4,5, está negativamente carregada [8].

A BSA é essencialmente conhecida pela sua elevada estabilidade e abundância, custo reduzido, pureza e pela sua solubilidade em água. Apresenta grande semelhança estrutural com a albumina do soro humano (HSA), tornando-a muito atrativa para diversos ensaios bioquímicos [9].

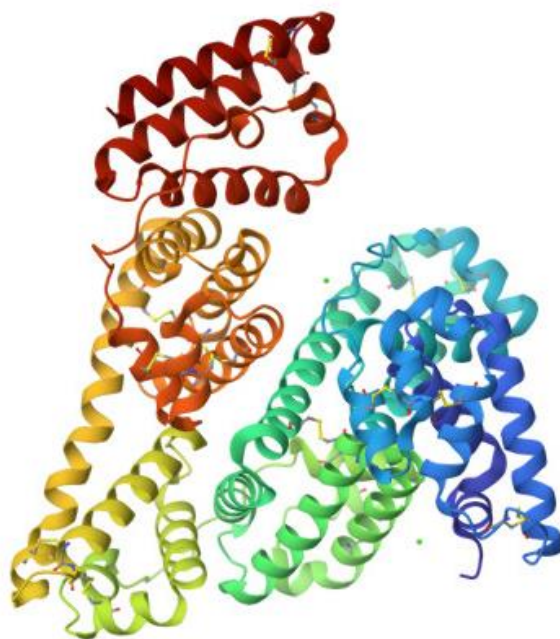


Figura 2. Estrutura química da albumina do soro bovino (BSA). Adaptada com permissão da referência [7].

Os seres humanos estão expostos à BSA devido ao consumo de carne e leite bovino, sendo uma fonte de proteína na alimentação. Contudo, esta exposição pode estar associada ao desenvolvimento de algumas reações alérgicas, infeções e doenças, como a *diabetes mellitus*, a nefropatia membranosa e a “doença das vacas loucas” que pode ser transmitida a seres humanos através do consumo de carne contaminada [2].

A BSA tem sido utilizada como um marcador da saúde da glândula mamária da vaca e da qualidade do leite [10], sendo assim, a análise quantitativa da BSA desempenha um papel crucial principalmente na qualidade alimentar, de modo a evitar reações alérgicas nos seres humanos.

Para a quantificação da BSA podem ser utilizados métodos colorimétricos tradicionais de determinação da concentração total de proteínas, como o método de Lowry e o método de Bradford [1]. Contudo, estes apresentam algumas limitações, como uma pequena gama de resposta linear e sensibilidade limitada. Outros métodos comumente utilizados, como o HPLC e fluorescência, também apresentam algumas desvantagens, como a elevada complexidade, processos de tratamento da amostra morosos e custo elevado quer dos equipamentos quer das medições (utilização de anticorpos como recetores, por exemplo) [1-3].

Deste modo, é fundamental desenvolver métodos alternativos para a deteção de baixos níveis de concentração de BSA, de forma rápida, barata, simples e com elevada seletividade [3]. A seletividade é um fator chave no contexto analítico. Se o método respondesse a todas as substâncias exatamente da mesma forma não seria possível determinar a concentração de qualquer substância específica numa mistura [11].

Neste contexto, a tecnologia de impressão molecular (IM) [12] foi utilizada neste trabalho como abordagem inovadora e promissora para a deteção da BSA, abrindo novas perspetivas no desenvolvimento de novos materiais biomiméticos com elevada afinidade para a BSA, e posterior integração em sensores óticos, eletroquímicos, entre outros, para a sua quantificação.

2.2. Polímeros de impressão molecular: uma alternativa aos anticorpos biológicos

Os anticorpos biológicos têm sido extensamente usados em várias áreas, tais como no desenvolvimento de biossensores (imunoensaios), estudos de biologia molecular, aplicações terapêuticas e biomédicas, entre outras [13-17]. Apresentam como principal vantagem o facto de proporcionarem interações específicas para um determinado antigénio (elevada seletividade) através da formação de complexos estáveis. Contudo, estes bioreceptores apresentam algumas desvantagens, nomeadamente (Tabela 1): (i) baixa estabilidade a longo prazo, podendo mesmo desnaturar de forma irreversível em meios ácidos/básicos ou quando expostos a elevadas temperaturas; (ii) o seu manuseamento tem de ser feito de forma cuidadosa, requerendo armazenamento frio; (iii) os custos de aquisição são muito elevados e; (iv) questões éticas associadas à imunização de animais para produção de anticorpos são um enorme obstáculo ao seu uso nos dias de hoje.

Deste modo, os polímeros de impressão molecular (MIPs) [18-20], frequentemente designados na literatura de “anticorpos plásticos”, são considerados uma alternativa promissora aos anticorpos naturais. Estes materiais biomiméticos sintéticos são capazes de se ligar seletivamente ao analito alvo de estudo, oferecendo elevada estabilidade no tempo e apresentando custos de produção reduzidos (ver Tabela 1) [21-26]. Assim sendo, a utilização de MIPs (micropartículas, filmes, etc.) como receptores sintéticos em sensores tem encontrado aplicações práticas relevantes, tal como no diagnóstico de doenças [27], na monitorização ambiental [28], na segurança alimentar

[29], entre outras, utilizando principalmente metodologias de transdução eletroquímicas [28, 30] e óticas [31].

Tabela 1. Comparação genérica das propriedades dos anticorpos biológicos e MIPs.

Caraterísticas	Anticorpos	MIPs
Tempo de Produção	Poucos meses	1-2 dias
Estabilidade Térmica	Desnaturam a $\approx 70^{\circ}\text{C}$	Resistente até 140°C
Estabilidade do pH	Baixa	Alta
Estabilidade	6-12 meses	Anos
Método de Produção	Imunização animal	Síntese química
Quantidade de moléculas molde	Médio	Alto
Armazenamento	Congelador	De 6°C até à temperatura ambiente
Preço	Alto	Baixo
Seletividade/Especificidade/Afinidade	Alta (mesmo em matrizes complexas; K_D geralmente $< 1\text{ nM}$ para anticorpos monoclonais)	Baixa até alta (valores de IF^* desde ~ 1 até > 10 ; valores de K_D^{**} entre nM até pM para nanoMIPs)

*Fator de Impressão (IF)

**Constante de Afinidade (K_D)

A tecnologia de impressão molecular permite criar recetores sintéticos que demonstram alta afinidade e seletividade em relação a moléculas ou outras estruturas específicas. O processo de impressão envolve a formação de uma matriz polimérica em torno de uma molécula molde, que posteriormente é removida, originando uma cavidade (ver Figura 3 [32]) que é complementar à molécula molde em termos de tamanho, forma e disposição espacial dos grupos funcionais [20, 21, 33, 34].

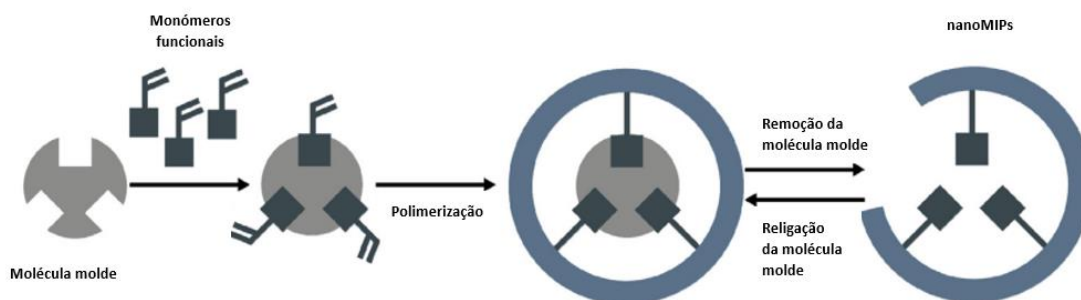


Figura 3. Representação esquemática da formação das cavidades moleculares utilizando a tecnologia de impressão molecular. Adaptada com permissão da referência [32].

2.3. A evolução da impressão molecular: da escala macro à nanoescala

A tecnologia de IM surge na década 30, quando *Pauling et al.* [12] e todos os seus colegas propuseram o conceito de “reconhecimento molecular” baseado na complementaridade de forma e distribuição de carga das moléculas. Desde então, esta tecnologia tem sido continuamente desenvolvida e aprimorada, na procura por aplicações práticas em diversas áreas.

Os primeiros estudos reportando a preparação do MIPs foram reportados por Wulff [12, 35] e Mosbach [36, 37] e basearam-se na produção de macromateriais biomiméticos. Apesar de estes materiais poderem posteriormente ser reduzidos a partículas de menores dimensões (micro/nano) por meio de processos de moagem e peneiração, o desempenho dos MIPs era frequentemente não adequado para aplicações de elevada precisão e/ou para estudos *in vivo* devido a vários fatores, nomeadamente: (i) formação de locais de ligação heterogéneos no MIP com diferentes afinidades para a molécula molde; (ii) número de locais de ligação reduzido, conduzindo a uma maior possibilidade de interações não específicas; (iii) elevada variabilidade de ensaio para ensaio, comprometendo a consistência e reprodutibilidade dos resultados e; (iv) cinética da interação demasiado lenta para biomoléculas de elevada dimensão, tais como as proteínas.

De modo a ultrapassar as limitações dos MIPs de tamanho macroscópico (macroMIPs), os investigadores na área da impressão molecular começaram a reduzir as dimensões dos MIPs preparados de macroMIPs para micropartículas, filmes finos e nanopartículas Figura 4 [38] com o intuito de (i) aumentar a acessibilidade dos locais de ligação de forma a facilitar a extração da molécula molde; (ii) aumentar o número de cavidades

impressas por unidade de área (idealmente 1 por cada nanopartícula), minimizando a adsorção não específica e; (iii) proporcionar uma cinética de interação MIP-analito mais rápida, essencial para a deteção de macro(bio)moléculas [39].

Ao mesmo tempo que a dimensão dos MIPs foi diminuindo, as estratégias de impressão molecular, inicialmente aplicadas apenas para reconhecimento de pequenas moléculas (drogas, pesticidas, etc.), foram sendo aplicadas com sucesso na impressão de (bio)moléculas maiores e mais complexas, tais como péptidos, proteínas e até células e vírus. Esta tendência, exemplarmente descrita no trabalho de Culver e Peppas [38] em 2017, mantém-se válida até aos dias de hoje.

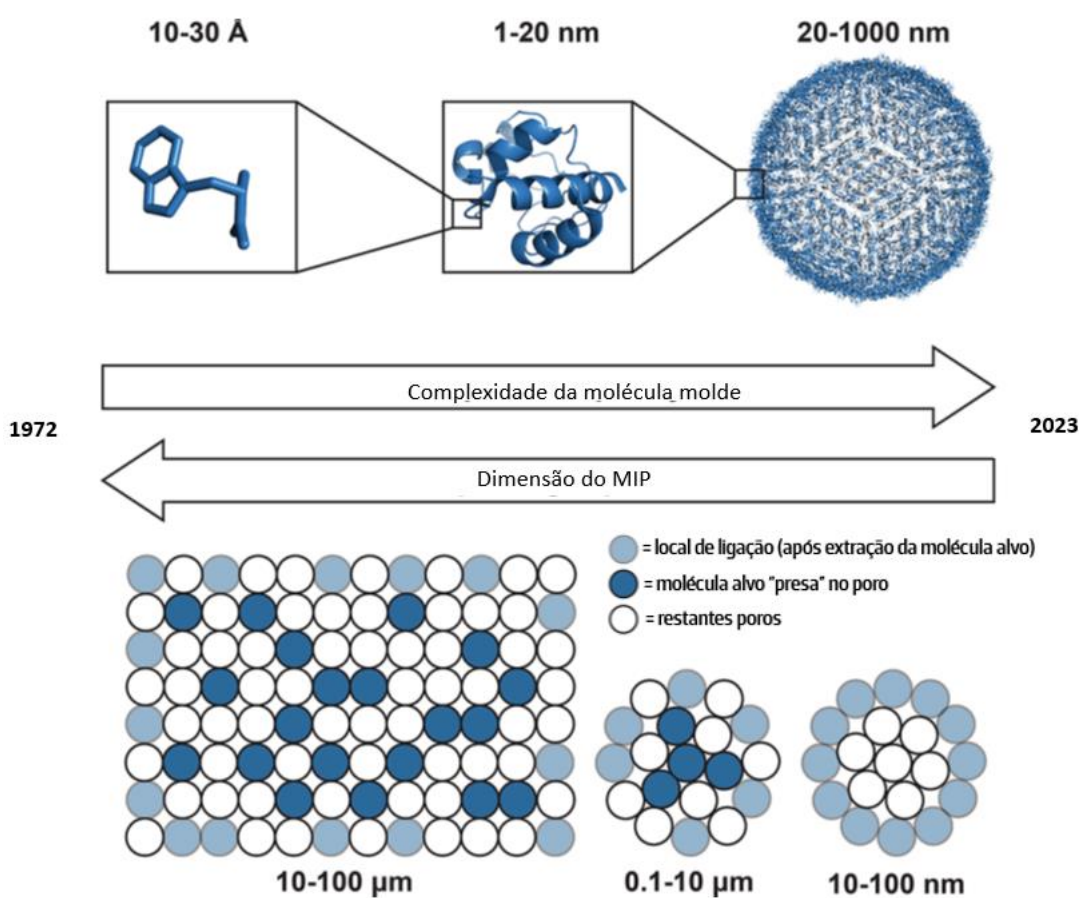


Figura 4. Evolução da tecnologia de impressão desde a produção de macroMIPs para o reconhecimento de moléculas pequenas até à produção de MIPs de menor tamanho (microMIPs, nanoMIPs) para reconhecimento de grandes (bio)moléculas. Adaptada com permissão da referência [38].

Um dos primeiros trabalhos a demonstrar as vantagens de diminuir o tamanho dos materiais de impressão molecular em termos do aumento do desempenho dos sensores foi reportado por *Yaqub et al.* [40], em 2011. Os autores utilizaram o mesmo conjunto de monómeros de acrilato/metacrilato para preparar macroMIPs e nanoMIPs (de

diversos tamanhos) para o reconhecimento seletivo da atrazina. O MIP de tamanho macroscópico e os nanoMIPs preparados foram incorporados na superfície de um sensor piezoelétrico para comparação da sua performance. Após a análise dos resultados obtidos, representados nas Figuras 5A e 5B, é perceptível que a diminuição do tamanho do MIP conduz a um aumento da zona de resposta do linear do sensor em função da concentração devido à maior relação superfície/volume das NPs que aumenta a acessibilidade do analito à superfície recetora.

Mais se acrescenta que neste trabalho foram realizados estudos de comparativos entre um anticorpo natural e os nanoMIPs para a deteção da atrazina. Tal como pode observar na Figura 5C, o sensor registou uma resposta do mais de duas vezes superior para o nanoMIP em relação ao anticorpo natural, tendo ambos os recetores apresentado elevada seletividade para a atrazina relativamente a metabolitos e análogos estruturais.

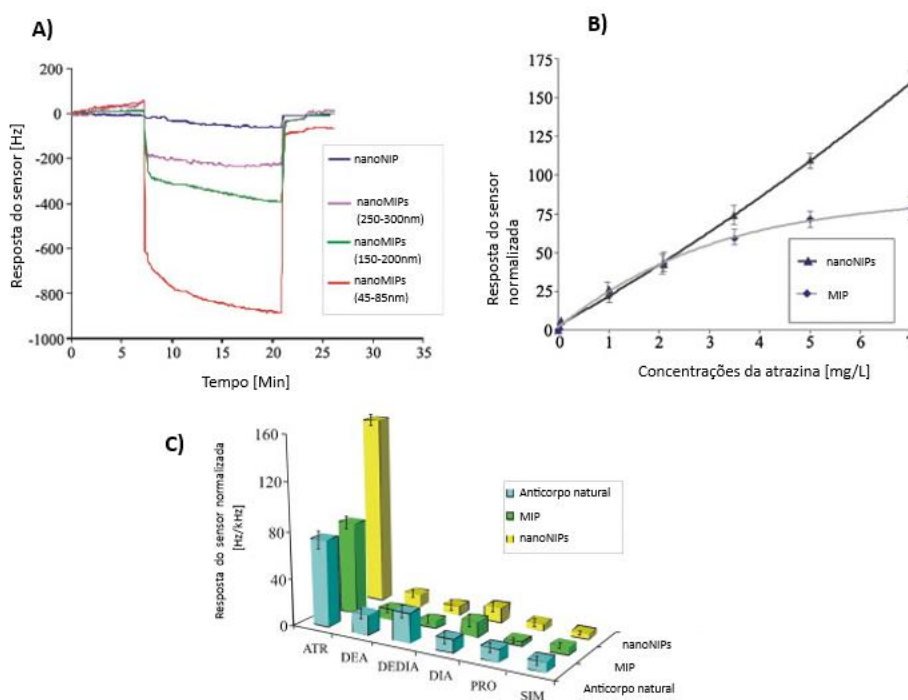


Figura 5. A) Comparação da resposta do sensor durante a exposição de nanoMIPs de diferentes tamanhos à atrazina; B) Comparação da resposta do sensor piezoelétrico à atrazina obtida pelo MIP de tamanho macroscópico e pelos nanoMIPs; C) Resposta do sensor, contendo anticorpos naturais e "plásticos", à atrazina e moléculas análogas (seletividade). Adaptada com permissão da referência [40].

2.4. Estratégias para a impressão molecular da BSA

Várias abordagens têm sido realizadas na literatura para sintetizar NPs de impressão de diferente composição e formatos com afinidade para a BSA, como é o caso da tecnologia de impressão molecular na superfície de partículas esféricas (SMIT). No método de SMIT, a superfície de partículas de sílica ou magnéticas foi usada para a criação de uma camada de revestimento com um MIP com elevada seletividade para a BSA [1, 41]. A combinação de MIPs com materiais magnéticos resulta em polímeros que possuem propriedades magnéticas e alta seletividade para as moléculas alvo.

Outra abordagem promissora para a impressão molecular da BSA é a síntese de nanoMIPs recorrendo ao método de polimerização por precipitação [42]. Esta abordagem será abordada na secção 2.6.1.

Neste trabalho, os nanoMIPs com afinidade para a BSA têm uma composição de um hidrogel e foram preparados através de dois métodos de síntese comuns para impressão molecular de proteínas, a precipitação por polimerização e a síntese em fase sólida.

2.5. Hidrogéis e a impressão molecular

Os hidrogéis são compostos por uma rede tridimensional de cadeias poliméricas que podem alterar o seu volume (aumentando ou diminuindo) em resposta a determinados estímulos externos (Figura 6 [43]), sejam eles físicos (temperatura, campo elétrico, luz, pressão, etc.), químicos (pH, solventes, força iónica, etc.) ou até mesmo biológicos, alterando a sua forma na presença de (bio)moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc.). A presença dos grupos hidrofílicos ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, etc.) na estrutura polimérica leva a que estes géis “dilatam” devido a absorverem e reterem quantidades significativas de água, proporcionando um ambiente ideal para reter pequenas moléculas, proteínas e até mesmo células no interior do gel [44].

Atualmente, a área dos hidrogéis encontra-se em rápido crescimento com aplicações relevantes no âmbito da biomedicina e da deteção bioanalítica [45, 46].

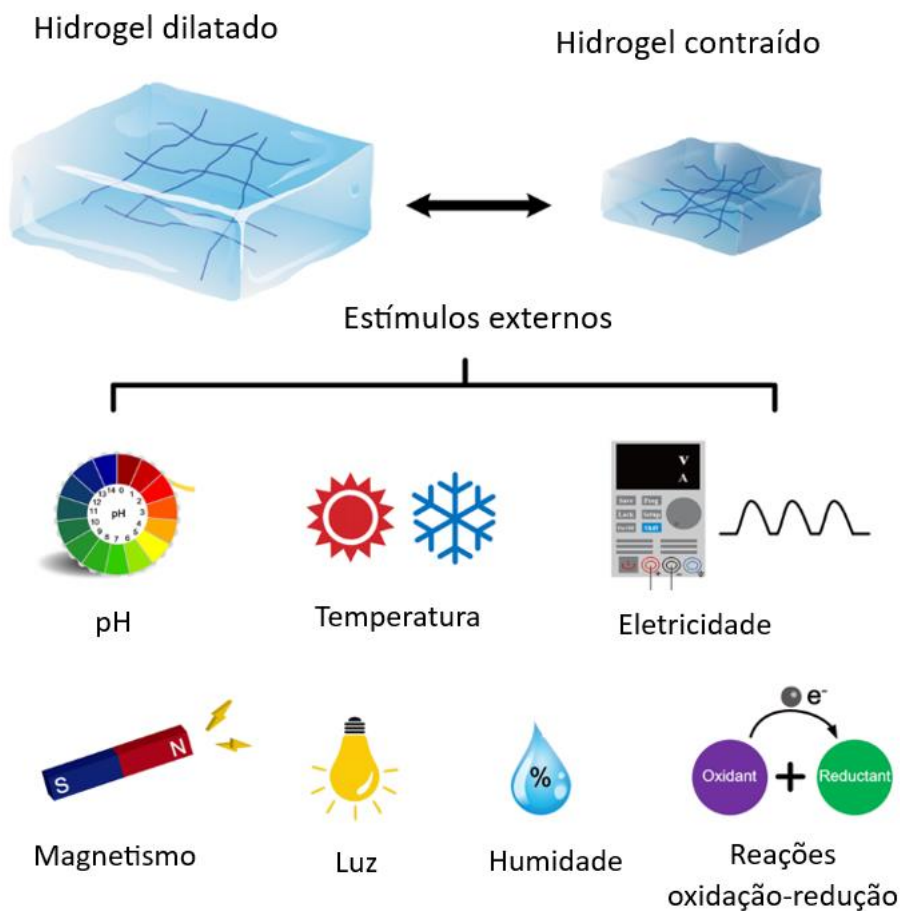


Figura 6. Representação esquemática do comportamento de hidrogéis sensíveis a diversos estímulos externos. Adaptado com permissão da referência [43].

A possibilidade de produzir hidrogéis em diferentes tamanhos e configurações confere a estes materiais funcionais uma promissora versatilidade para o desenvolvimento de novos biomateriais "inteligentes" [44]. Neste contexto, os hidrogéis têm já um papel importante no domínio da impressão molecular, devido à sua utilização para o desenvolvimento de MIPs. Os hidrogéis têm vindo a ser imensamente utilizados para a impressão molecular de proteínas dada a possibilidade da sua produção em meio aquoso, de modo a não degradar as proteínas, tal como ocorre em processos de síntese com solventes orgânicos. Apesar das mudanças na conformação dos hidrogéis, as cavidades de ligação permanecem estáveis e bem definidas na estrutura do MIP, garantindo o reconhecimento do analito alvo. Em ensaios de deteção, as alterações de volume e/ou forma dos hidrogéis molecularmente impressos aquando da interação com o analito modificam as suas propriedades mecânicas, elétricas e/ou óticas, que podem ser usadas como sinais analíticos para a deteção [47].

Os monômeros funcionais derivados do ácido acrílico e da acrilamida são os mais utilizados na produção de géis molecularmente impressos para reconhecimento de proteínas. Em particular, o monómero N-isopropilacrilamida (NIPAm) tem sido muito utilizado para a produção de MIPs. Este apresenta uma temperatura crítica denominada LCST (*low critical solution temperature*) próxima dos 32 °C em soluções aquosas, fazendo com que o polímero se expanda e contraia abaixo e acima da LCST, respetivamente, provocando uma alteração na hidrofiliicidade/hidrofobicidade do gel [48].

Os avanços na nanotecnologia permitiram a produção de hidrogéis à escala nanométrica, os nanogéis molecularmente impressos (nanoMIPs). A mistura de NIPAm com derivados de (met)acrilatos e de (met)acrilamidas solúveis em água tem sido uma das abordagens mais utilizadas para a síntese de nanogéis impressos [49].

De forma a comprovar o elevado potencial destes nanogéis molecularmente impressos (nanoMIPs), vários grupos de investigação têm realizado ensaios bioanalíticos de modo a comparar a sua performance com a dos anticorpos naturais para deteção de uma mesma (bio)molécula. *Chianella et al.* [50], realizaram um estudo comparativo entre nanoMIPs e anticorpos (imunoensaios) para deteção da vancomicina. Os resultados obtidos demonstram que o limite de deteção (LOD) do ensaio com nanoMIPs (2,5 pM) é 3 ordens de grandeza inferior ao do imunoensaio (0.1 µM). Também *Ashley et al.* [51], demonstraram que um sensor ótico incorporando nanoMIPs para detetar a alfa-caseína possibilitou obter um LOD inferior ao teste comercial ELISA. Mais recentemente, *McClements et al.* [52], demonstraram em ensaios de deteção térmica com nanoMIPs e anticorpos a obtenção de LODs semelhantes (9,9 e 8.9 fg mL⁻¹, respetivamente) para a deteção do SARS-COV-2 (variante alfa). Estes estudos demonstram assim a capacidade que os nanoMIPs possuem para detetar diferentes analitos, que sejam usados como alternativa aos anticorpos.

2.6. Métodos de síntese de nanogéis de impressão molecular (nanoMIPs)

Tal como referido anteriormente, os nanoMIPs têm uma performance analítica mais aproximada aos anticorpos do que os macroMIPs em termos de tamanho e afinidade em relação ao analito alvo, tendo, portanto, um maior potencial para os substituir como recetores sintéticos em ensaios de afinidade e sensores para (bio)análise de vários (bio)compostos, incluindo proteínas [53, 54].

Ao longo dos últimos anos, têm sido testados vários métodos inovadores com o objetivo de produzir materiais biomiméticos nanoestruturados de diversos formatos (filme, nanopartículas, etc.) para reconhecimento de proteínas, tal como a produção de nanogéis impressos. Dos métodos de síntese de nanoMIPS mais extensivamente explorados na literatura para a síntese de nanoMIPs: são a polimerização por precipitação e a síntese em fase sólida. Estes dois métodos de síntese, utilizados neste trabalho, serão abordados de seguida.

2.6.1. Polimerização por precipitação

O método de polimerização por precipitação é uma abordagem simples para a preparação de partículas de impressão molecular de tamanho micro/nano.

A partir de uma solução diluída que contém a mistura de monómeros, iniciadores de reação, o agente de entrelaçamento e a molécula molde, dissolvidos num solvente apropriado, formam-se partículas esféricas uniformes no meio reacional, variando em diâmetro desde alguns micrómetros até dezenas de nanómetros. Posteriormente é possível realizar diálise, de modo a remover a molécula molde da matriz polimérica. Porém, tal como referindo anteriormente, muitos dos métodos utilizados usam solventes orgânicos que não são adequados para proteínas (Figura 7). Assim sendo, foi desenvolvida uma abordagem específica para proteínas onde a polimerização ocorre em ambiente aquoso, na presença de concentrações muito baixas de surfactantes, para obter NPs de impressão molecular (nanoMIPs) uniformes e esféricas.

Em 2008, *Hoshino et al.* [49] reportou pela primeira vez o uso da polimerização por precipitação para a produção de NPs de impressão molecular, dispersas em água, para o reconhecimento seletivo da toxina de abelha, a melitina. A otimização da composição da solução de polimerização (escolha dos monómeros e respetiva razão molar) revelou-se crucial para o sucesso da impressão molecular. Desde então, este método tem sido extensivamente usado para preparar nanoMIPs para reconhecimento de péptidos [55], proteínas [56, 57] e anticorpos [58].

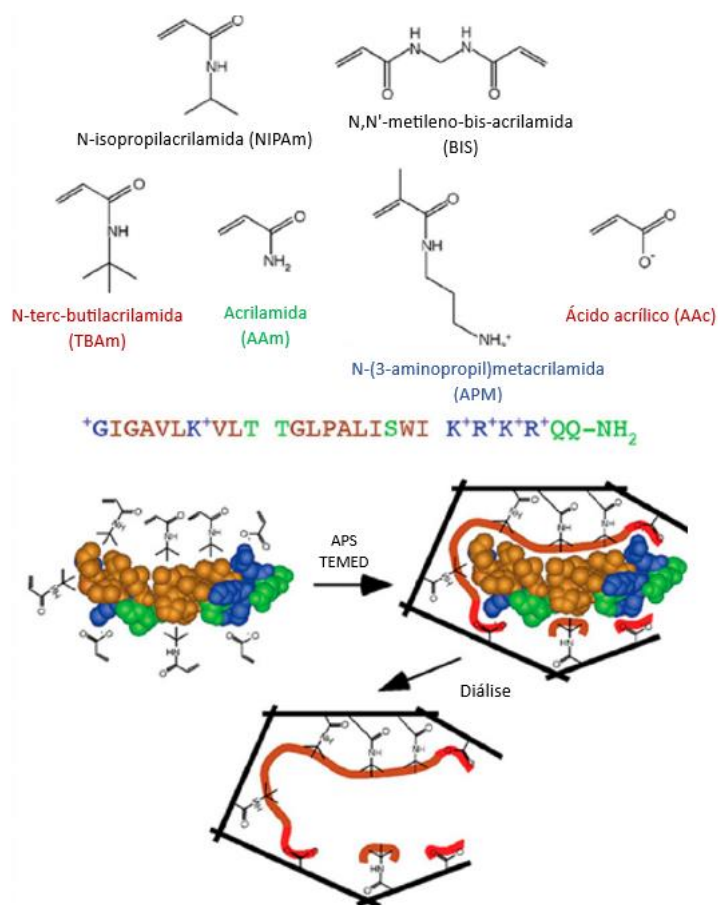


Figura 7. Representação esquemática dos monômeros, sequência de aminoácidos da molécula molde (melitina) e processo de síntese por polimerização por precipitação. Adaptada com permissão da referência [49].

Contudo, apesar deste método ser simples e eficiente para obter nanoMIPs com alto rendimento e pureza, apresenta algumas desvantagens, nomeadamente: (i) a extração da molécula molde via diálise é lenta demorando vários dias; (ii) o uso de surfactantes não é o mais indicado para aplicações biológicas *in vivo*; e (iii) elevada heterogeneidade dos locais de ligação (semelhante aos anticorpos plásticos policlonais) podendo reduzir a afinidade para a molécula molde [44, 48]. Deste modo, para superar as limitações deste método de síntese, surgiu na literatura uma abordagem inovadora, a impressão em fase sólida.

2.6.2. Síntese em fase sólida

Este processo de síntese, introduzido por *Poma et al.* [59], em 2013, para pequenas moléculas (melamina) e por *Ambrosini et al.* [60] para proteínas (tripsina), evoluiu rapidamente e abriu novas perspectivas na síntese de nanoMIPs com propriedades diferenciadas, semelhantes às dos anticorpos monoclonais.

Este método diferencia-se da polimerização por precipitação na medida em que ocorre a imobilização da molécula molde numa superfície sólida (normalmente esferas de vidro) antes da polimerização, reduzindo o seu número de graus de liberdade de orientação, conduzindo à formação de locais de ligação homogêneos e, conseqüentemente, a nanoMIPs com maior afinidade. Além disso, após a síntese, é possível remover os nanoMIPs com baixa afinidade, antes de recolher os nanoMIPs com maior afinidade, através de uma simples lavagem com solvente devido às propriedades de contração/expansão do nanogel (lavagem com água quente [59] ou fria [60]).

Ao longo dos últimos anos, têm vindo a ser produzidos eficazmente nanoMIPs com grande afinidade para pequenas moléculas [61, 62], péptidos [63, 64], proteínas [63, 65-67], assim como vírus [52, 68] e bactérias [69] (Figura 8), utilizando protocolos bem estabelecidos na literatura [70]. No entanto, este método tem como desvantagem o facto do rendimento da reação ser relativamente baixo (< 1 mg/grama de esfera de vidro), devido principalmente à baixa área superficial das esferas de vidro convencionais (diâmetro: 70 a 100 μm), resultando na imobilização de quantidades reduzidas de proteínas (molécula molde) [53, 54].

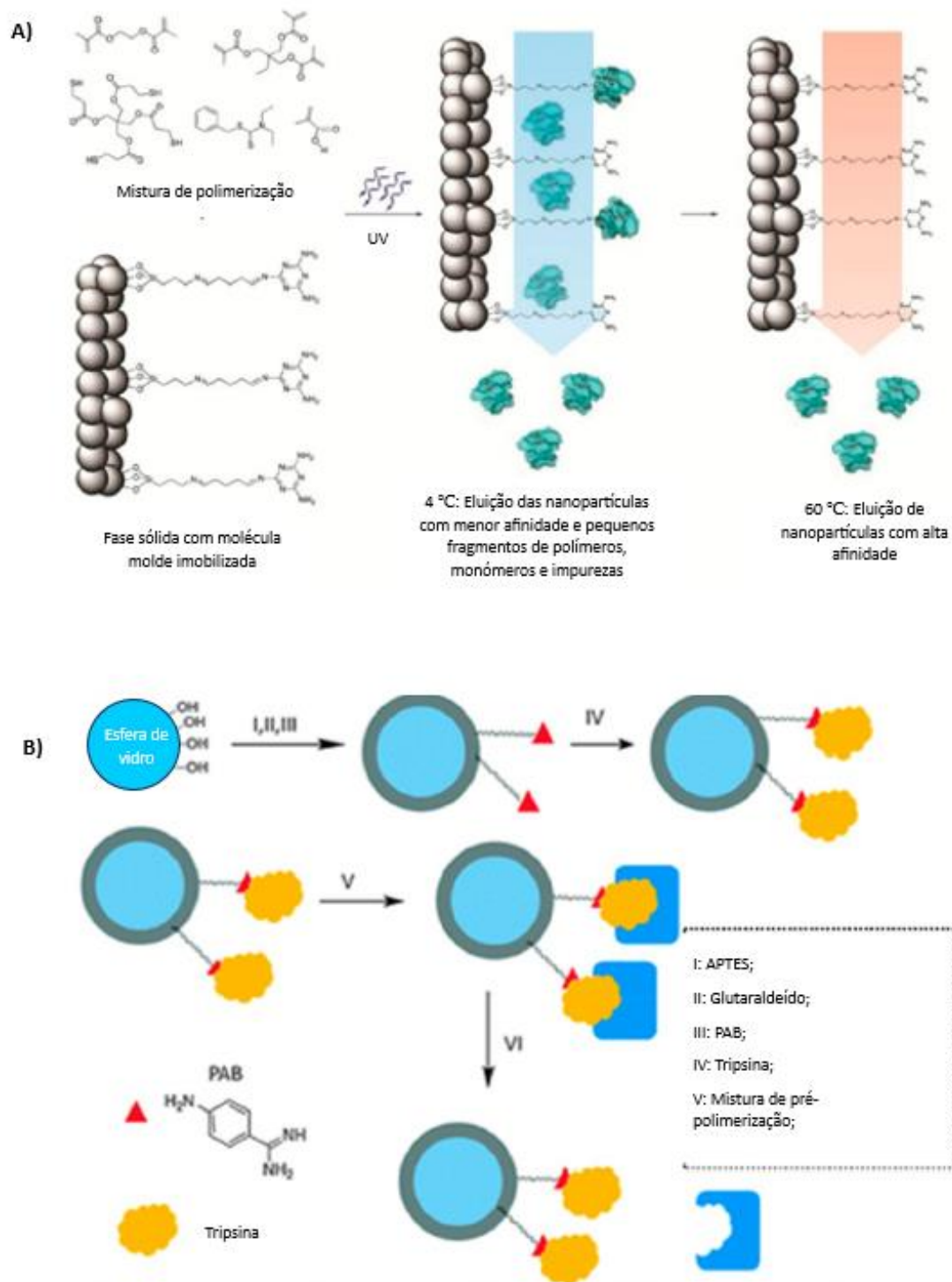


Figura 8. Representação esquemática do processo de síntese de nanoMIPs por impressão em fase sólida para reconhecimento de (A) moléculas pequenas. Adaptado com permissão da referência [59] (B) biomoléculas de grandes dimensões. Adaptado com permissão da referência [60].

2.6.3. Aplicações nanoMIPs

Os MIPs e nanoMIPs têm vindo a encontrar várias aplicações devido à sua capacidade de reconhecer e ligar seletivamente a vários tipos de moléculas, desde pequenas drogas e pesticidas, até macromoléculas, como péptidos e proteínas. Alguns dos exemplos de aplicações incluem: o i) pré-tratamento de amostras e separações analíticas, tal como a extração em fase sólida (SPE) [71-73], a cromatografia de afinidade [19] e a eletroforese capilar [74]; ii) aplicações biomédicas, como bioimagem [75, 76], administração controlada de fármacos [77, 78] e nanomedicina biomimética [79, 80] e; iii) utilização como recetores sintéticos em sensores com vários tipos de transdução (óticos, eletroquímicos, térmicos, piezoelétricos, etc.).

2.7. Impressão molecular utilizando epítomos

A impressão molecular de proteínas pode ser um desafio devido à sua estrutura complexa e conformação 3D flexível que é necessário manter durante o processo de polimerização para garantir que os MIPs produzidos sejam seletivos para a proteína molde. Outro dos desafios na impressão de proteínas provém ao seu elevado tamanho e peso molecular. A incorporação da proteína na matriz polimérica pode tornar o processo de extração difícil, complexo e demorado. Mais se acrescenta que algumas proteínas são extremamente caras, mesmo em pequenas quantidades, limitando o processo de síntese dos MIPs.

Para superar estas dificuldades, foi introduzida na literatura o método de impressão utilizando um epítomo sintético (composto por aproximadamente 9 aminoácidos) da proteína molde [81, 82]. Este método inspira-se no reconhecimento molecular dos anticorpos que apenas reconhece um pequeno fragmento exposto da proteína, conhecido como epítomo. Por exemplo, no trabalho de *Nishino et al.* [83], em 2006, foram selecionados para a impressão molecular os aminoácidos 599-607 (VVSTQTALA) para o reconhecimento da BSA e os aminoácidos 97-104 (AYLKKATNE) para reconhecimento do citocromo c.

A grande vantagem deste método é a remoção fácil do epítomo (de tamanho reduzido) da matriz polimérica. No fim, as cavidades específicas do MIP mantêm a capacidade de reconhecer e se ligar à proteína original (Figura 9 [84]).

Assim sendo, a impressão molecular utilizando epítomos oferece diversas vantagens em termos de afinidade, desempenho e/ou custos de produção dos MIPs [81, 82]. Os

epítomos (contendo grupos funcionais $-NH_2$ ou $-COOH$) podem ser facilmente imobilizados em esferas de vidro por meio de procedimentos químicos simples. Além disso, grupos cisteína podem ser adicionados ao péptido sintético (cisteína-epítomo) para ligação covalente a suportes de vidro usando ligandos específicos [75-77]. Apresenta a desvantagem de ser dispendioso, até mesmo em pequenas quantidades.

Neste trabalho, os nanoMIPs preparados utilizando um epítomo serão designados por E-nanoMIPs.

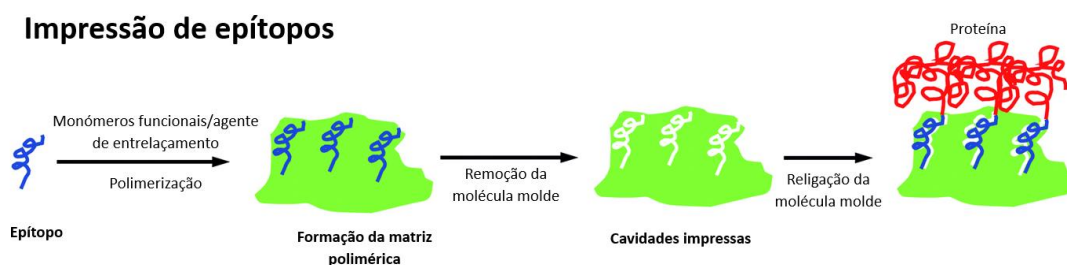


Figura 9. Representação esquemática da impressão de epítomos (E-nanoMIPs). Adaptada da referência [84].

2.8. Ressonância de plasmão de superfície (SPR)

A Ressonância de Plasmão de Superfície (SPR) é um método ótico que mede, em tempo real, as alterações no índice de refração do meio próximo de uma superfície metálica muito fina (geralmente ouro; 50 nm), causadas por eventos de ligação (interações moleculares) que ocorrem na superfície [85].

A maioria dos dispositivos de SPR utiliza um método de reflexão total, a configuração de Kretschmann, que contempla um prisma com elevado índice de refração, uma película de ouro fina e uma solução, num arranjo tridimensional (Figura 10 [86]) [87].

O fenómeno de SPR tem como base oscilações coletivas de eletrões chamados de plasmões de superfície. Ao direcionar uma fonte de luz para uma superfície metálica com um ângulo específico (ângulo de ressonância), os plasmões são excitados, e um detetor mede a intensidade da luz refletida, que varia conforme a ressonância dos plasmões. O mínimo das curvas de refletividade corresponde ao ângulo de ressonância.

Interações moleculares perto da superfície causam mudanças do ângulo de ressonância, permitindo monitorizar essas interações em tempo real, tais como a ligações anticorpo-antígeno, por exemplo. Os sensores SPR exploram a relação linear entre a variação do ângulo, e a quantidade de material ligado à superfície do sensor para estimar a concentração do analito [88].

Esta técnica tem vindo ser muito utilizada para a deteção de biomoléculas [86], principalmente no diagnóstico médico [89, 90], mas também como ferramenta na área do controlo da qualidade dos alimentos [91-93].

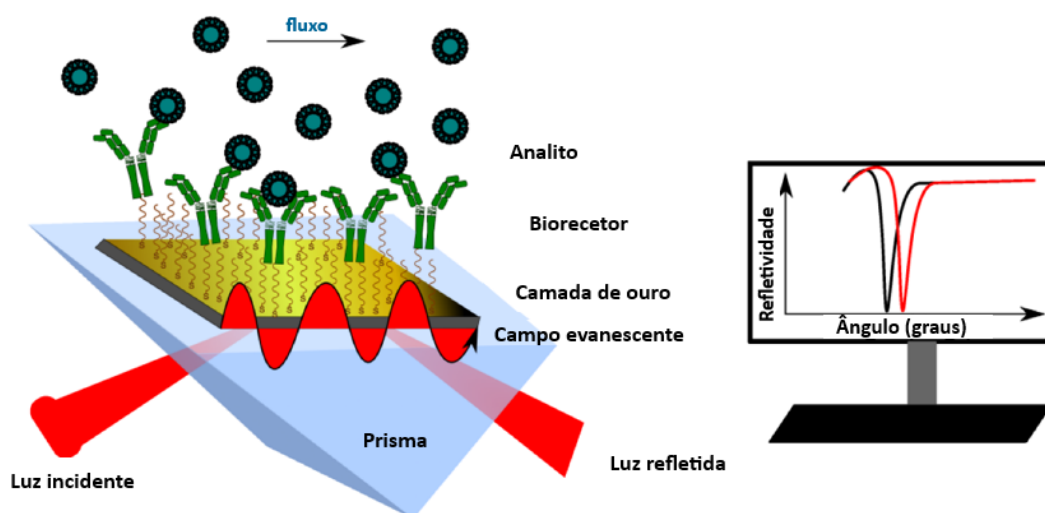


Figura 10. Representação esquemática de um SPR com a configuração de Kretschmann. Adaptado da referência [86].

Este trabalho teve como foco a produção de nanoMIPs como recetores sintéticos para o reconhecimento da BSA e a sua integração em substratos de SPR para a deteção em tempo real da BSA.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e soluções utilizados

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4 , Sigma-Aldrich); hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich); acetona ($\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich); (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS, 95%, Sigma-Aldrich); tolueno anidro (99,8%, Sigma-Aldrich); glutaraldeído (Sigma-Aldrich); ninidrina ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich); N-isopropilacrilamida (NIPAm, 97%, Thermo Fisher); N,N'-metileno-bis-acrilamida (BIS, 99%, Thermo Fisher); N-terc-butilacrilamida (TBAm, 97%,

Thermo Fisher); etanol (absoluto, >99,5%, Sigma-Aldrich); ácido acrílico (AAc, 98%, Thermo Fisher); dodecilsulfato de sódio (SDS, ≥99,9%, Sigma-Aldrich); persulfato de amónio (APS, 98%, Sigma-Aldrich) ; N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED, 99,5%, Sigma-Aldrich); N-(3-aminopropil)metacrilamida (APM, 98%, Sigma-Aldrich); brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB, 98%, Sigma-Aldrich); 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN, 98%, Sigma-Aldrich) ; ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA, 95%, Sigma-Aldrich); 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, ≥98%, Sigma-Aldrich); N-Hidroxisuccinimida (NHS, ≥98%, Sigma-Aldrich); etanolamina (≥98%, Sigma-Aldrich); ácido clorídrico (HCl, 37%, Sigma-Aldrich); 6-mercaptop-1-hexanol (MCH, 97%, Sigma-Aldrich); Tween 20 (Sigma-Aldrich); vancomicina de *Streptomyces orientalis* (≥900 µg/mg, Sigma-Aldrich); hidróxido de sódio (NaOH, 98%, Sigma-Aldrich); acetato de sódio (CH₃COONa, Sigma-Aldrich); ácido acético (CH₃COOH, Sigma-Aldrich).

Como molécula molde foram utilizadas a albumina do soro bovino (BSA) pH 7, (≥98%, Sigma-Aldrich) e os aminoácidos 599-607 (VVSTQTALA) da BSA como epítipo (95,8%, GenScript).

Foram também utilizados os kits comerciais para a realização do ensaio de Bradford (Thermo Fisher) e do ensaio de BCA (Thermo Fisher).

Todas as soluções aquosas usadas neste trabalho foram preparadas com água purificada com um sistema de purificação Milli-Q (resistividade ≥ 18 MΩ.cm, Millipore).

As soluções utilizadas neste trabalho foram:

- Solução tampão de fosfato de sódio (PB) 1,0 mol L⁻¹ , pH 6,8, através da adição de dois sais, o dihidrogenofosfato de sódio e o hidrogenofosfato de sódio;
- (PB) 0,010 mol L⁻¹ , pH 7,4, preparada a partir de uma solução de (PB) 1,0 mol L⁻¹;
- solução tampão de acetato de sódio 0,010 mol L⁻¹ , pH 4,0, preparada a partir de acetato de sódio e ácido acético;
- solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ , preparada a partir da solução de HCl concentrada;

O pH das soluções foi medido com um medidor de pH (Metrohm Autolab), com o auxílio de um agitador magnético.

Os reagentes foram cuidadosamente pesados com uma balança analítica Mettler Toledo AE100, com uma precisão de ± 0,1 mg, enquanto as medições dos volumes das soluções foram realizadas com micropipetas VWR.

3.2. Síntese por polimerização por precipitação

Neste trabalho foram utilizadas duas receitas para o método de síntese de polimerização por precipitação.

Síntese de nanoMIPs

1ª receita

Primeiramente, foram pesadas 97,5 mg de N-isopropilacrilamida (NIPAm) (0,86 mmol) para um tubo de polipropileno de 50 mL. Seguidamente, foram adicionadas 82,5 mg de N-terc-butilacrilamida (TBAm) (0,65 mmol) dissolvidas em 0,5 mL de etanol e adicionou-se ainda, 11 µl ácido acrílico (0,08 mmol) ao tubo, tendo-se agitado suavemente de modo a dissolver todos os sólidos. Posteriormente foram adicionados 20 mL de água ultrapura Milli-Q.

Num tubo de plástico de 10 mL, foram pesadas 5 mg de N,N'-metileno-bis-acrilamida (BIS) (0,0325 mmol) e adicionou-se 1 mL de água ultrapura. Em seguida, dissolveu-se o reagente agitando suavemente o tubo e a solução foi adicionada à solução preparada anteriormente. Adicionou-se ainda 1 mL de SDS 1% (massa/volume).

Posteriormente, foi adicionada na solução, 8,3 mg da molécula molde, a BSA (concentração final de BSA de 5×10^{-6} mol L⁻¹; concentração total de monómeros de 65 mmol L⁻¹; razão molécula molde: monómeros de 1:13000) à solução preparada anteriormente. Ajustou-se o volume final para 25 mL com água ultrapura. Fechou-se o tubo e procedeu-se à homogeneização da solução, tendo-se invertido o tubo 5-10 vezes.

Em seguida, a solução foi filtrada usando um funil de Büchner com papel de filtro (Grau 2, 70 mm, Whatman), e transferida para um balão de fundo redondo de 100 mL com uma barra de agitação magnética. Fechou-se o balão com uma tampa de borracha.

Utilizando agulhas, a solução de polimerização foi purgada com um fluxo lento de N₂ durante 30 minutos sob agitação suave. No final dos 30 minutos, adicionou-se 30 mg (0,13 mmol) de APS em 500 µl de água desionizada e foi adicionado à solução. O APS tanto pode ser utilizado em conjunto com o TEMED para a polimerização à temperatura ambiente ou pode ser utilizado sozinho se a reação ocorrer a temperatura elevada – ~60 °C – (decomposição térmica do iniciador) [94-96]. Retirou-se as agulhas da solução e colocou-se o balão num banho de água, pré-aquecido a 60 °C (Figura 11). A mistura reacional foi mantida em agitação contante durante 3 horas.

2ª receita

A segunda receita seguiu o mesmo protocolo que a anterior com as seguintes alterações:

- troca do AAc por N-(3-aminopropil)metacrilamida (APM), tendo-se adicionado 12,25 mg (0,08 mmol);
- substituição do SDS pelo de brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB), tendo-se utilizado 10 mg
- substituição do iniciador de reação APS por 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN). Pesou-se 15 mg e dissolveu-se em 0,5 mL de acetona (AIBN).

Nesta receita, foram utilizadas como molécula molde:

- BSA (concentração final de BSA de 5×10^{-6} mol L⁻¹; concentração total de monómeros de 65 mmol L⁻¹; razão molécula molde: monómeros de 1:13000);
- epítipo da BSA (concentração final de $2,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; concentração total de monómeros de 65 mmol L⁻¹; razão molécula molde: monómeros de 1:224) , ou seja, a sequência de aminoácidos 599-607 (VVSTQTALA) [83] uma vez que apresenta vantagens em termos de afinidade, desempenho e/ou custos de produção dos MIPs. (E-nanoMIPs).

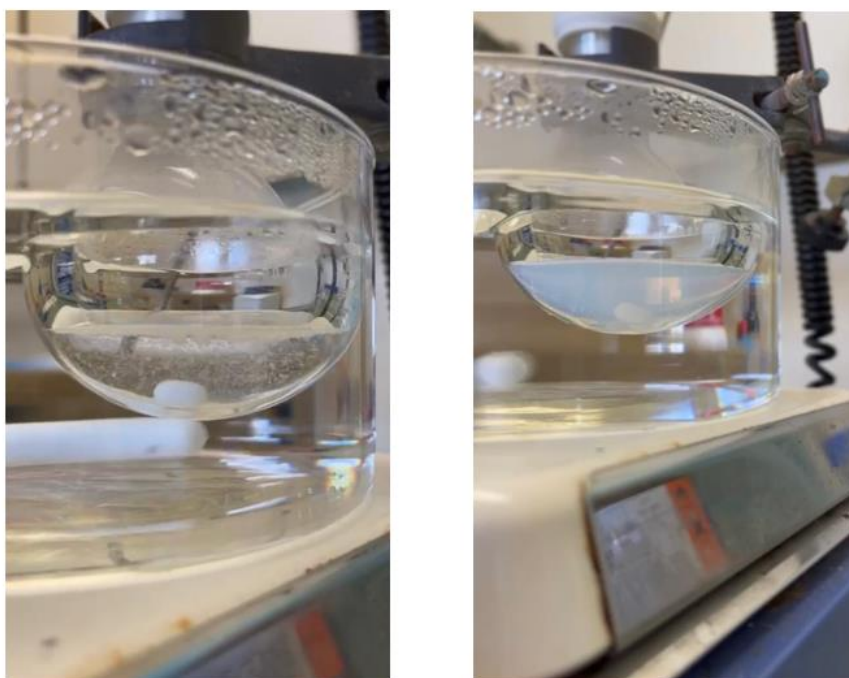


Figura 11. Mistura de polimerização, antes e após a síntese

Remoção da molécula molde por diálise

Após a reação, transferiu-se alíquotas da solução para sacos de diálise. Foram utilizadas membrana de celulose de 2,5 cm de diâmetro com um tamanho nominal do poro da membrana (Molecular Weight Cut-Off, MWCO) de 100 kDa para a síntese utilizando a BSA e membranas de celulose de 2,5 cm de diâmetro com um tamanho nominal do poro da membrana (Molecular Weight Cut-Off, MWCO) de 14 kDa para a síntese utilizando o epítipo . Adicionou-se ~4,5 L de água ultrapura num gobelé de 5 L e colocou-se o saco de diálise submerso na água ultrapura. A diálise foi realizada durante 4 dias, sob agitação lenta à temperatura ambiente, tendo-se trocado a água 2x ao dia (Figura 12).



Figura 12. Membranas de diálise contendo a solução de nanoMIPs para remoção da molécula molde.

Determinação da concentração dos nanoMIPs obtidos

Após a diálise, a solução de nanoMIPs foi transferida para um tubo de 50 mL. Parte da solução foi guardada para evaporação do solvente de modo a determinar a concentração de nanoMIPs tendo-se pesado um tubo de centrífuga de 10 mL e registado a massa. Em seguida, transferiu-se 5,0 mL de solução para o tubo, tendo sido colocado num concentrador de vácuo (Univapo 100 ECH) (Figura 13), à temperatura ambiente, onde ficou durante vários dias de modo a evaporar todo o solvente. Após a evaporação do solvente, pesou-se novamente o tubo contendo os nanoMIPs e calculou-se a concentração de nanoMIPs na solução.



Figura 13. Concentrador de vácuo (Univapo 100 ECH)

Outra parte da solução foi retirada para análise da solução de nanoMIPs por dispersão dinâmica de luz (DLS) e ressonância de plasmão de superfície (SPR). A restante foi guardada à temperatura ambiente.

3.3. Síntese em fase sólida

Este método foi composto por duas etapas fundamentais. A primeira etapa consistiu na imobilização da molécula molde nas esferas de vidro e a segunda etapa envolveu a polimerização da mistura reacional.

Ativação das esferas de vidro

Primeiramente, foram pesadas 65 g de esferas de vidro de 0,1 mm de diâmetro (BioSpec), para um balão de fundo redondo de 100 mL. A superfície das esferas de vidro foi ativada mergulhando-as numa solução de hidróxido de sódio 4 M (0,8 mL de solução/grama de esferas de vidro) durante 15 minutos à temperatura de 100 °C (Figura 14). De seguida, as esferas de vidro foram lavadas cuidadosamente com água ultrapura (8x200 mL). Para neutralizar a base, as esferas foram mergulhadas em PB 0,010 mol L⁻¹ (300 mL) e em seguidas lavadas (3x200 mL) com água ultrapura de forma a remover eventuais resíduos de sais da solução tampão. No fim deste processo, verificou-se o pH da solução de lavagem (pH 6-7) de modo a garantir que a base tinha

sido completamente removida. Por fim, as esferas foram lavadas com acetona (2x200 mL) e colocadas na estufa a 80 °C durante 3 h para secagem.

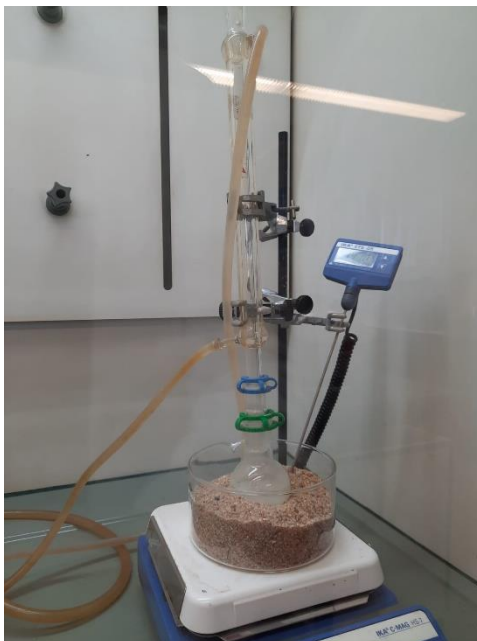


Figura 14. Montagem experimental para a ativação das esferas de vidro com hidróxido de sódio.

Silanização das esferas de vidro

Para a silanização (Figura 15), procedeu-se à incubação das esferas, previamente ativadas e secas, numa solução aquosa de APTMS 15% (vol/vol) durante 2h (0,4 mL de solução/grama de esferas) utilizando um gobelé. Após a incubação na solução de silano, as esferas de vidro foram decantadas e filtradas (sob vácuo) utilizando um funil de Buchner, contendo um disco de papel de filtro adequado, e depois recolhidas. Por fim, as esferas foram secas a 120 °C.

Neste trabalho foram utilizados dois solventes para preparar as soluções do silano e se proceder à silanização:

- solução de APTMS (15%), preparada em água ultrapura e;
- solução de APTMS (2%), preparada em tolueno anidro (procedimento de referência).

Foram ainda testadas diferentes concentrações de APTMS, entre os 2-15% (em água), de modo a aumentar o grau de cobertura das esferas de vidro com grupos funcionais – NH₂ e os resultados foram comparados com os obtidos com a silanização em tolueno anidro durante 12 h.

O teste da ninidrina foi efetuado neste ponto, de modo a avaliar o grau de cobertura do silano (APTMS) na superfície das esferas de vidro (Anexo 2).



Figura 15. Esferas de vidro antes da silanização com solução aquosa de APTMS 15%.

Ligação covalente da molécula molde às esferas de vidro

Para ligar covalentemente a proteína (ou epítopo) às esferas de vidro, as esferas foram primeiramente incubadas durante 2 h numa solução de glutaraldeído 7% (vol/vol) em PB 0,010 mol L⁻¹, pH 7,4 (Figura 16). As esferas foram decantadas e depois filtradas sob vácuo, utilizando um funil de Buchner, e submetidas a uma lavagem abundante com PB para remover o glutaraldeído em excesso (8x200 mL).

Posteriormente, as esferas foram incubadas durante a noite numa solução de BSA (C = 0,5 mg mL⁻¹, em PB 0,010 mol L⁻¹, pH 7,4). Por fim, as esferas contendo a proteína imobilizada foram recolhidas por filtragem sob vácuo, lavadas abundantemente com água pura (8x200 mL), secas (sobre vácuo) e armazenadas a 4 °C até posterior utilização.

O teste de Bradford foi realizado neste ponto para confirmar e quantificar a molécula molde imobilizada na superfície das esferas de vidro (Anexo 3).

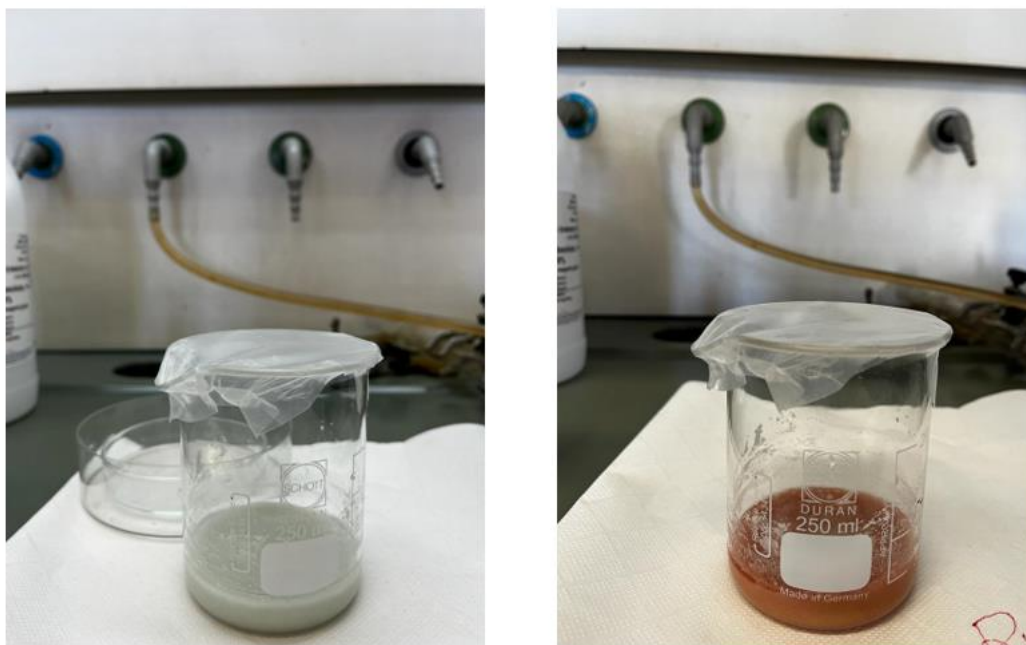


Figura 16. Esferas de vidro antes e durante incubação na solução de glutaraldeído 7% (vol/vol).

Síntese de nanoMIPs

Para a síntese dos nanoMIPs, foram inicialmente pesadas 39 mg de N-isopropilacrilamida (NIPAm) (0.34 mmol) e 2 mg de N,N'-metileno-bis-acrilamida (BIS) (0.013 mmol) para um balão de fundo redondo de 250 mL. Adicionou-se 95 mL de água e os sólidos foram dissolvidos agitando suavemente o balão. De seguida, pesou-se 33 mg de N-terc-butilacrilamida (0.26 mmol) para um tubo de plástico de 10 mL e dissolveu-se em 1 mL de etanol. Depois de dissolvido, o monómero foi adicionado à solução de polimerização preparada anteriormente, agitando a solução suavemente para homogeneização.

Para adição do monómero ácido acrílico (AAc) foi necessário preparar primeiramente uma solução concentrada deste monómero. Assim sendo, dissolveu-se 22 μ L de ácido acrílico concentrado (0.32 mmol) em 1 mL de água ultrapura, tendo depois sido adicionado 100 μ L desta solução (0,032 mmol) à solução preparada anteriormente. De seguida, adicionou-se 1 mL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1% (m/v) e, por fim, adicionou-se água ultrapura de forma a ajustar o volume final da solução a 100 mL.

De forma a remover o O_2 da solução de polimerização, esta foi colocada num frasco de vidro com tampa de conexão a um sistema de vácuo e colocada em ultrassons (sob

vácuo) durante 10 minutos. Após este passo, a solução foi borbulhada com N_2 , durante 20 minutos (Figura 17).



Figura 17. Solução de polimerização, com sistema de vácuo e colocada em ultrassons; Solução de polimerização borbulhada com N_2

Para preparar os nanoMIPs, pesou-se 60 g de esferas de vidro com a proteína imobilizada preparadas anteriormente e colocou-se num frasco de vidro de 250 mL. De seguida, realizaram-se 3 ciclos alternados de vácuo e N_2 (Figura 18), à temperatura ambiente, tendo-se adicionado posteriormente a solução de polimerização.



Figura 18. Ciclos alternados de vácuo e N_2

Para preparação da solução de iniciadores de reação, dissolveu-se 30 mg (0,13 mmol) de persulfato de amónio (APS) em 500 μ L de água ultrapura e posteriormente foram adicionados 30 μ L (0,33 mmol) de N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED). Para dar início à polimerização, procedeu-se a uma breve desgaseificação, e verteu-se rapidamente a solução de APS/TEMED para o frasco de 250 mL contendo a solução de polimerização e as esferas de vidro. Purgou-se a solução com N_2 durante 1 minuto, fechou-se rapidamente o frasco e deixou-se a reação ocorrer durante 1 h à temperatura ambiente (Figura 19).



Figura 19. Esferas de vidro imersas na mistura de polimerização

Recolha dos nanoMIPs com maior afinidade

Após a síntese dos nanoMIPs, transferiu-se todo o conteúdo do frasco (esferas de vidro e a solução) para um cartucho de extração em fase sólida (SPE) equipado com um filtro adequado (fibra de polietileno, 20 μm de porosidade, Sigma-Aldrich) (Figura 20). Removeu-se a solução através filtragem sob vácuo e substituiu-se por ~ 30 mL de água ultrapura à temperatura ambiente. Neste passo, procurou-se não deixar secar as esferas de vidro. Os monómeros que não reagiram e os nanoMIPs de baixa afinidade foram removidos por eluição com água à temperatura ambiente. O processo de lavagem foi repetido oito vezes com novas alíquotas de 30 mL de água ultrapura.

De forma a recolher os nanoMIPs com maior afinidade, vedou-se o cartucho contendo os suportes de vidro com uma tampa de Luer (Sigma-Aldrich) e adicionou-se ~ 30 mL de água ultrapura pré-aquecida a 60 $^{\circ}\text{C}$. O cartucho de SPE foi colocado num banho de água a 60 $^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos. Após os 15 minutos, o cartucho foi retirado do banho e a solução contendo os nanoMIPs foi recolhida sob vácuo. De seguida, adicionou-se uma nova alíquota (~ 30 mL) de água (pré-aquecida a 60 $^{\circ}\text{C}$) ao cartucho, colocou-se no banho a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min e recolheu-se a solução sob vácuo. Este passo foi repetido 2/3 vezes de forma a obter um volume final de solução de nanoMIPs de ~ 100 mL. Por fim, a solução foi deixada à temperatura ambiente para arrefecer, e posteriormente foi

guardada a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ no frigorífico, tendo uma validade de entre algumas semanas até alguns meses.

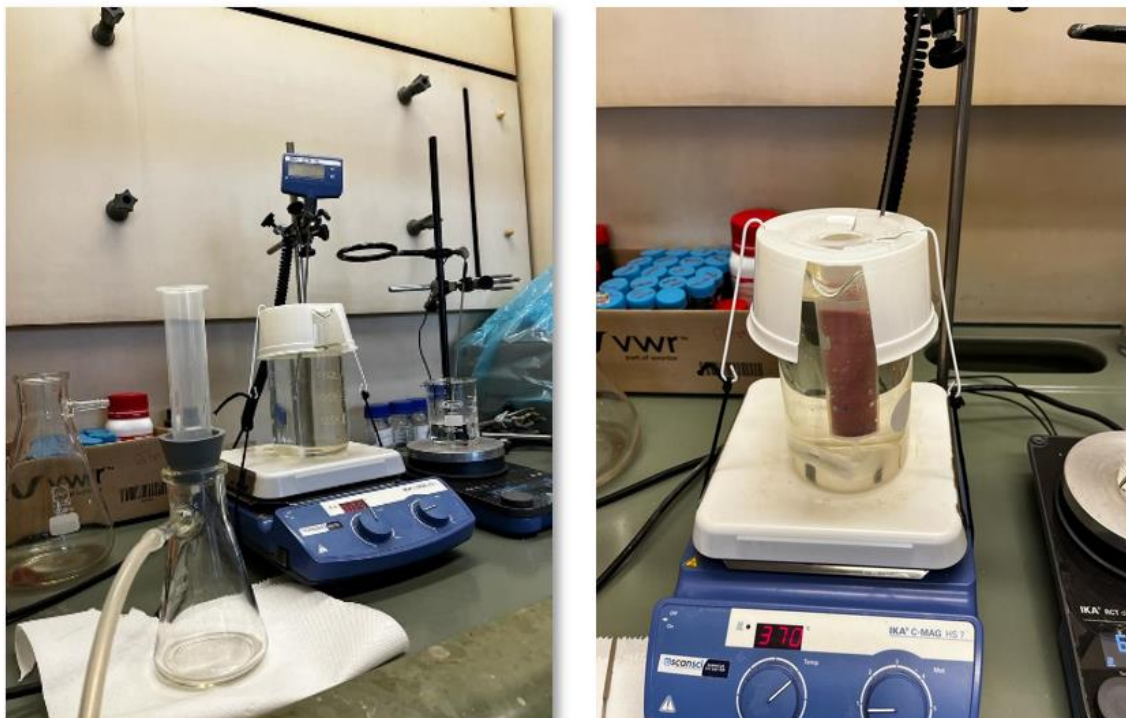


Figura 20. Montagem experimental para recolha dos nanoMIPs com maior afinidade para a BSA.

Determinação da concentração dos nanoMIPs obtidos

A determinação da concentração de nanoMIPs obtida através do método da síntese em fase sólida foi realizada de igual forma ao método de síntese de precipitação por polimerização (secção 3.2)

3.4. Caracterização dos nanoMIPs por Dispersão dinâmica de luz (DLS)

Os conceitos teóricos da técnica de dispersão dinâmica de luz encontram-se reportados no Anexo 1.

Neste trabalho, o equipamento utilizado para medir o tamanho hidrodinâmico das partículas foi o Malvern Zetasizer Nano ZS, da Malvern (Figura 21). O software utilizado para as medições foi o Zetasizer Nano software v3.30.

Foram utilizadas duas cuvetes para a análise por DLS, a DTS0012, para medição do tamanho, e a DTS1070, para medição do potencial zeta, com um volume de 5 mL e 1 mL, respetivamente (Figura 21). A concentração das amostras foi de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Todas as medições foram realizadas a uma temperatura de $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O índice de refração das esferas de poliestireno foi utilizado como padrão nas medições.

Foram realizadas 5 medições para cada amostra, e todos os resultados obtidos atenderam aos critérios de qualidade estabelecidos pela software da Malvern.

O *count rate*, que representa o número de fótons (partículas de luz) que são detetados pelo equipamento durante uma medição, foi tida em consideração. Caso a contagem seja muito baixa, as medições podem ser imprecisas e ter bastante ruído. Se a taxa de contagem for muito alta, pode haver saturação do detetor. Assim, foi mantida uma taxa de contagem acima de 200 (idealmente 300).

Foram realizados dois tipos de análise dos resultados:

- Análise pelo método de cumulantes, que se baseia no pressuposto de uma única população de partículas em solução (monomodal) e que fornece os valores de Z-Average e índice de polidispersão (PDI);
- Análise pelo método multimodal, que fornece uma distribuição de tamanhos e identifica os diferentes picos para amostras multimodais.



Figura 21. Equipamento utilizado, Malvern Zetasizer Nano ZS, da Malvern e cuvetes utilizadas para medição de tamanho e do potencial zeta (DTS0012 e DTS1070, respetivamente.)

3.5. Estudos de ressonância de plasmão de superfície (SPR)

Neste trabalho, utilizou-se o SPR Autolab ESPRIT (KEI bv, Ridderkerk, Utrecht, Países Baixos), controlado pelo software de aquisição de dados KEI SPR (versão 4.4, KEI bv, Ridderkerk, Utrecht, Países Baixos) (Figura 22). Este tem uma configuração ótica de Kretschmann e apresenta dois canais de medição independentes. O equipamento incorpora um sistema robótico de amostragem que permite a injeção de todas as soluções necessárias, retiradas de qualquer posição de uma placa com 384 micropoços ou de duas soluções de armazenamento distintas. A solução tampão de trabalho circula através do sistema em fluxo do equipamento com a ajuda de uma bomba peristáltica. Os resíduos são direcionados para um recipiente apropriado.

A injeção das soluções nos dois canais de medição foi feita por duas agulhas que controlam o volume (60 μL), a frequência e a velocidade de aspiração/dispensa das soluções.

Como substratos de SPR, foram utilizados discos de vidro revestido com uma camada fina de ouro (~ 50 nm; KEI bv, Ridderkerk, Utrecht, Países Baixos) (Figura 22). Antes das medições, foram lavados com água pura e etanol, seguido de secagem sob fluxo de N_2 . Posteriormente, os substratos de SPR foram colocados sobre o prisma de vidro coberto com uma fina camada de óleo de elevado índice de refração (Cargille) e posicionados dentro do equipamento seguindo todos os procedimentos padrão para medições do ângulo de reflexão.

Utilizou-se um banho de água Julabo F32-HE (Julabo GmbH, Seelbach, Alemanha) de modo a manter uma temperatura do sistema constante ($T = 25.0 \pm 1.0$ °C), contribuindo para a obtenção de resultados reprodutíveis.

Antes de serem efetuadas as medições experimentais, e para assegurar a limpeza eficaz do equipamento, fez-se passar pelo sistema de fluxo do SPR uma sequência de 5 soluções: (1) 0,5% SDS, HCl 0,1 mol L^{-1} , etanol absoluto, NaOH 0,1 mol L^{-1} e água ultrapura.

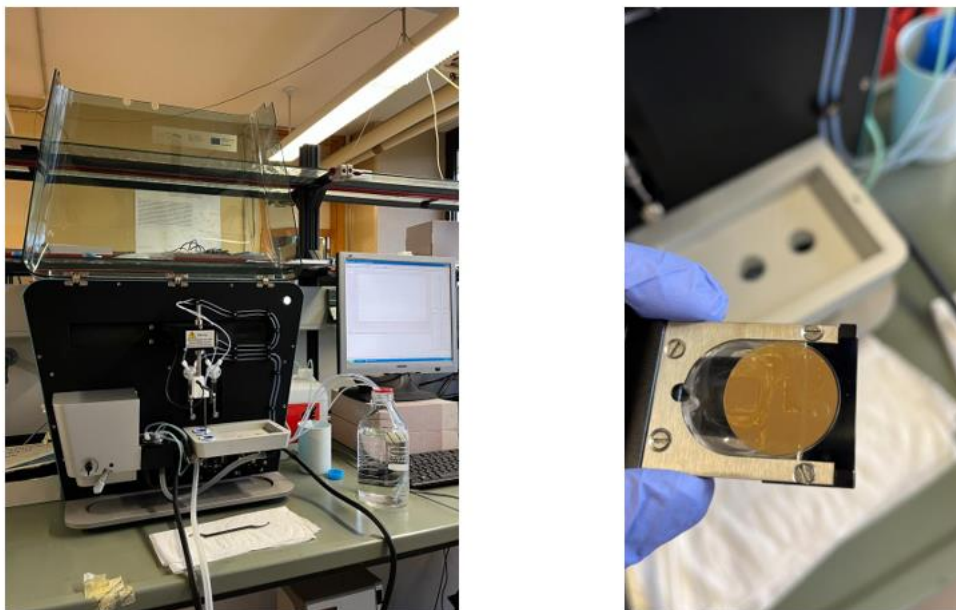


Figura 22 Equipamento SPR Autolab ESPRIT e cuvette com o substratos de ouro.

3.5.1. Imobilização dos nanoMIPs nos substratos de SPR

A imobilização dos nanoMIPs na superfície de Au foi realizada em 4 passos (Figura 23):

- i) Formação de uma monocamada auto-montada (SAM) com grupos terminais -COOH provenientes do ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA). Para tal, o disco de vidro revestido com uma camada fina de ouro, foi imerso numa solução de MUA $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, preparada em etanol, durante a noite. Posteriormente, foi lavado abundantemente com água de modo a remover o tiol não ligado e foi colocado no SPR Autolab ESPRIT para a realização dos passos seguintes.
- ii) Ativação do grupo terminal carboxilato dos tióis utilizando uma mistura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (EDC) e N-hidroxissuccinimida $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NHS), ambas preparadas em água. A ativação foi realizada durante 300 s;
- iii) Imobilização covalente de uma solução de nanoMIPs $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, preparada em PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, na superfície do disco de ouro modificado, durante 600 s.
- iv) Desativação dos ésteres reativos que não reagiram com uma solução de etanolamina 1 mol L^{-1} (pH 8,0) durante 300 s.

O processo foi repetido para os nanoNIPs ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$), E-nanoMIPs ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e ainda para um anticorpo monoclonal com afinidade para a BSA (anti-BSA antibody, MyBiosource) ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

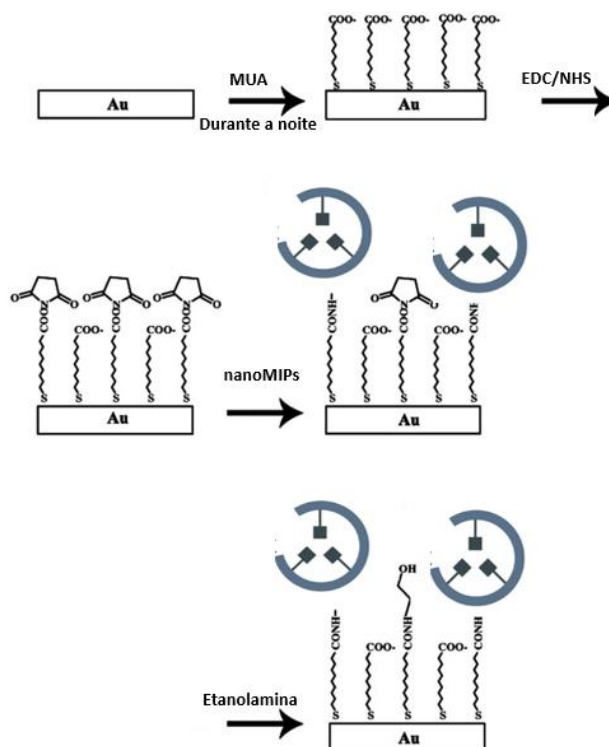


Figura 23. Representação esquemática da imobilização dos nanoMIPs nos substratos de SPR.

3.5.2. Estudo da afinidade

Após a etapa da construção das plataformas de SPR, procedeu-se à interação dos vários tipos de recetores naturais e sintéticos com a BSA. Preparou-se um conjunto de soluções padrão de BSA (em PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$) e foram injetadas de forma cumulativa (sem regeneração) para avaliar a interação com os materiais imobilizados em tempo real.

De modo a realizar os estudos de adsorção, foi utilizada a isotérmica de Langmuir para estimar a constante de afinidade (K_D) de cada um dos recetores.

Os resultados obtidos experimentalmente foram ajustados à equação de Langmuir, utilizando os softwares OriginPro 2023b e Igor Pro 6.2.2.2. Após o ajuste da isotérmica, estimaram-se os valores de $\Delta\theta_{\text{max}}$ e K_L .

3.5.3. Construção do sensor ótico e deteção da BSA

As plataformas de deteção foram construídas através da imobilização covalente dos nanoMIPs na superfície dos substratos de SPR (secção 3.5.1), seguido de um tratamento da superfície de modo a minimizar a adsorção não específica. Neste contexto, testou-se a utilização da caseína e de um tiol secundário, o 6-mercaptop-1-hexanol (MCH).

As soluções padrão foram preparadas em PB 0,010 mol L⁻¹ e foram posteriormente dopadas com Tween 20 de modo a minimizar as interações não específicas.

Foram realizados os estudos de deteção onde foi preparado um conjunto de soluções padrão de BSA entre os 5,0 × 10⁻⁷ mol L⁻¹ e 1,5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ e para tal, realizou-se a regeneração da superfície do sensor entre cada injeção de solução padrão que consistiu em:

1. Linha de base: introdução de uma solução de PB 0,010 mol L⁻¹ na superfície do sensor SPR de modo a estabelecer a linha de base, durante 60 s;
2. Associação: injeção das soluções padrão (menos concentrada para a mais concentrada), de modo que ocorra interação com os E-nanoMIPs, monitorizada durante 300 s, tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio;
3. Dissociação: injeção de uma solução de PB 0,010 mol L⁻¹ para iniciar a dissociação do complexo formado, durante 120 s;
4. Regeneração: injeção de solução tampão acetato 0,010 mol L⁻¹ pH 4,0, dopada com 0,1% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), durante 300 s, de modo a remover completamente a BSA ligada;
5. Linha de base: nova injeção de PB 0,010 mol L⁻¹ para restabelecer a linha de base e preparar a superfície para a análise de uma nova solução padrão, durante 60 s.

Este processo foi repetido para todas as soluções padrão preparadas.

3.6. Quantificação da BSA numa amostra de leite bovino

Foi recolhida uma amostra de leite (UHT, Meio Gordo, Agros) e procedeu-se a um pré-tratamento da amostra para separar a BSA das restantes componentes do leite,

nomeadamente da caseína, a proteína mais abundante do leite. Assim sendo, primeiramente, a amostra de leite foi acidificada com uma solução diluída de HCl (pH final de 4,6) de modo a precipitar a caseína (Figura 24).



Figura 24. Amostra de leite acidificada com HCl (pH 4,6) para precipitação da caseína

Recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se à sua purificação por ultrafiltração utilizando tubos Amicon com *cut-off* de 30 kDa (Amicon® Ultra-0.5, Millipore) (Figura 25), tendo como objetivo reduzir ao máximo a quantidade de caseína ($M = 20\text{-}25$ kDa) na amostra. Assim sendo, pipetou-se 0,5 mL de sobrenadante para o tubo e procedeu-se a uma centrifugação da solução a 10000 g durante 1 h. De seguida, virou-se o filtro ao contrário, adicionou-se 0,5 mL de PB ao tubo e realizou-se uma nova centrifugação (1000 g, durante 2 min) com o objetivo de recuperar a BSA inicialmente recolhida no filtro. Por fim, a BSA na amostra tratada foi quantificada pelo sensor SPR desenvolvido, através do procedimento descrito na secção 3.5.3. Para comparação, foi também quantificada a proteína total na amostra através do teste do ácido bicinonínico (BCA) (Anexo 4).

Para se proceder à quantificação foi necessário diluir as amostras (fator de diluição para o sensor ótico – 20; fator de diluição para o teste BCA – 25).



Figura 25. Tubos Amicon com cut-off de 30 kDa utilizados para purificação das amostras.

4. Resultados Obtidos

Na primeira fase do trabalho, foram sintetizados os nanoMIPs para o reconhecimento da BSA através de dois métodos de síntese, a polimerização por precipitação e a síntese em fase sólida. Os materiais foram posteriormente caracterizados através da técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS).

De seguida, foi realizada a avaliação da afinidade dos nanoMIPs para a BSA usando a técnica de SPR, permitindo determinar as constantes de afinidade (K_D). A afinidade dos materiais sintéticas para a BSA foi comparada com a de um anticorpo monoclonal específico para a BSA.

Os nanoMIPs com maior afinidade foram selecionados para o desenvolvimento um sensor ótico (SPR) para a deteção da BSA, incluindo ensaios de recuperação e testes de seletividade.

Por fim, a aplicabilidade do sensor ótico integrando os nanoMIPs foi realizada através da quantificação da BSA numa amostra de leite bovino.

4.1. Síntese, otimização e caracterização dos nanoMIPs para o reconhecimento da BSA

4.1.1. Síntese por polimerização por precipitação

Numa primeira abordagem, e com o objetivo de ganhar experiência na síntese de NPs molecularmente impressas (nanoMIPs) para reconhecimento da BSA, utilizou-se a precipitação por polimerização devido a ser um método simples e eficaz para a obtenção de partículas esféricas de tamanho nanométrico. Para tal, recorreu-se a um protocolo desenvolvido e otimizado por Kenneth Shea e seus colaboradores [97]. Neste método, foram utilizados os reagentes representados na Figura 26 como solução de polimerização de modo a preparar os nanoMIPs. Como sistema de referência, foi realizada uma síntese em paralelo na ausência da molécula molde. As nanopartículas obtidas, designadas de nanoNIPs, permitem assim avaliar o efeito da adsorção não específica.

<i>N-isopropilacrilamida</i> (NIPAm) Monómero ligações de hidrogénio; interações hidrofóbicas	N-terc-butilacrilamida (TBAm) Monómero interações hidrofóbicas	N,N'-metileno-bis-acrilamida (BIS) Agente de entrelaçamento
Ácido acrílico (AAC) Monómero ligações eletrostáticas; ligações de hidrogénio	Dodecil sulfato de sódio (SDS) surfactante	Persulfato de amónio (APS) Iniciador da reação
N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina (TEMED) catalisador		

Figura 26. Reagentes utilizados para a síntese por polimerização por precipitação

Cada um desses reagentes desempenha um papel específico na síntese de nanoMIPs sendo importante conhecer cada um dos reagentes e que tipo de interações podem proporcionar. Devido à sua mudança de volume em função da temperatura, o N-isopropilacrilamida (NIPAm) facilita a remoção da molécula molde durante a diálise; o monómero N-tert-butilacrilamida (TBAm) proporciona hidrofobicidade à matriz e maior afinidade para a molécula molde; o N,N'-metilenobisacrilamida (BIS), agente de

entrelaçamento, permite formar ligações covalentes entre as cadeias de polímero, criando uma estrutura tridimensional estável nas partículas; o ácido acrílico (AAc) foi usado para introduzir grupos carboxilato na matriz polimérica; o dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfactante usado para controlar o tamanho e a dispersão das partículas durante a polimerização e; o persulfato de amônio (APS) é fundamental para iniciar o processo de formação das partículas, enquanto o N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED) acelerou o início da reação (catalisador). As quantidades de cada um dos reagentes utilizadas bem como os detalhes experimentais da síntese encontram-se descritos na parte experimental (Secção 3.2).

Após a diálise, procedeu-se à determinação da concentração de nanoMIPs em solução por evaporação do solvente, tendo-se obtido valores entre os 5,0 e 6,0 mg mL⁻¹.

Seguidamente, foi realizada a caracterização morfológica das NPs de impressão molecular através da determinação do tamanho e do potencial zeta (ζ) utilizando a técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS). Foram realizadas várias sínteses com sucesso, e os valores apresentados na Tabela 2 representam a média das medições obtidas.

Tabela 2. Tamanho e potencial zeta das partículas obtidas através da síntese de polimerização por precipitação

		nanoNIPs	nanoMIPs
Tamanho	Média (nm)	83 ± 6	111 ± 3
	PDI	0,20 ± 0,07	0,03 ± 0,01
Potencial Zeta	Média (nm)	-31 ± 6	-33 ± 3

Após analisar os resultados obtidos para o tamanho das NPs, foi possível confirmar que estas apresentavam o tamanho nanométrico esperado (Figura 27A). Os nanoMIPs apresentaram um tamanho médio de 111 ± 3 nm, enquanto os nanoNIPs exibiram um tamanho médio de 83 ± 6 nm. Esta discrepância de tamanho deverá estar relacionada com a presença ou não da molécula molde durante a síntese, podendo resultar em alterações do tamanho. Os correlogramas obtidos permitem confirmar o tamanho reduzido dos materiais sintetizados, uma vez que, quanto mais rápido é o decaimento da autocorrelação, menor é o tamanho do material a analisar. Partículas maiores

apresentam taxas de decaimento de autocorrelação mais lentas. A análise do correlograma permite ainda garantir que a amostra não está contaminada nem apresenta ruído significativo (Figura 27B)

É ainda importante mencionar que tanto os nanoMIPs como os nanoNIPs apresentaram valores de índice de polidispersão (PDI) inferiores a 0,3 nas suas distribuições de tamanho, indicando que as partículas são uniformes em tamanho e são monodispersas, ou seja, não revelando sinais de agregação em solução [98].

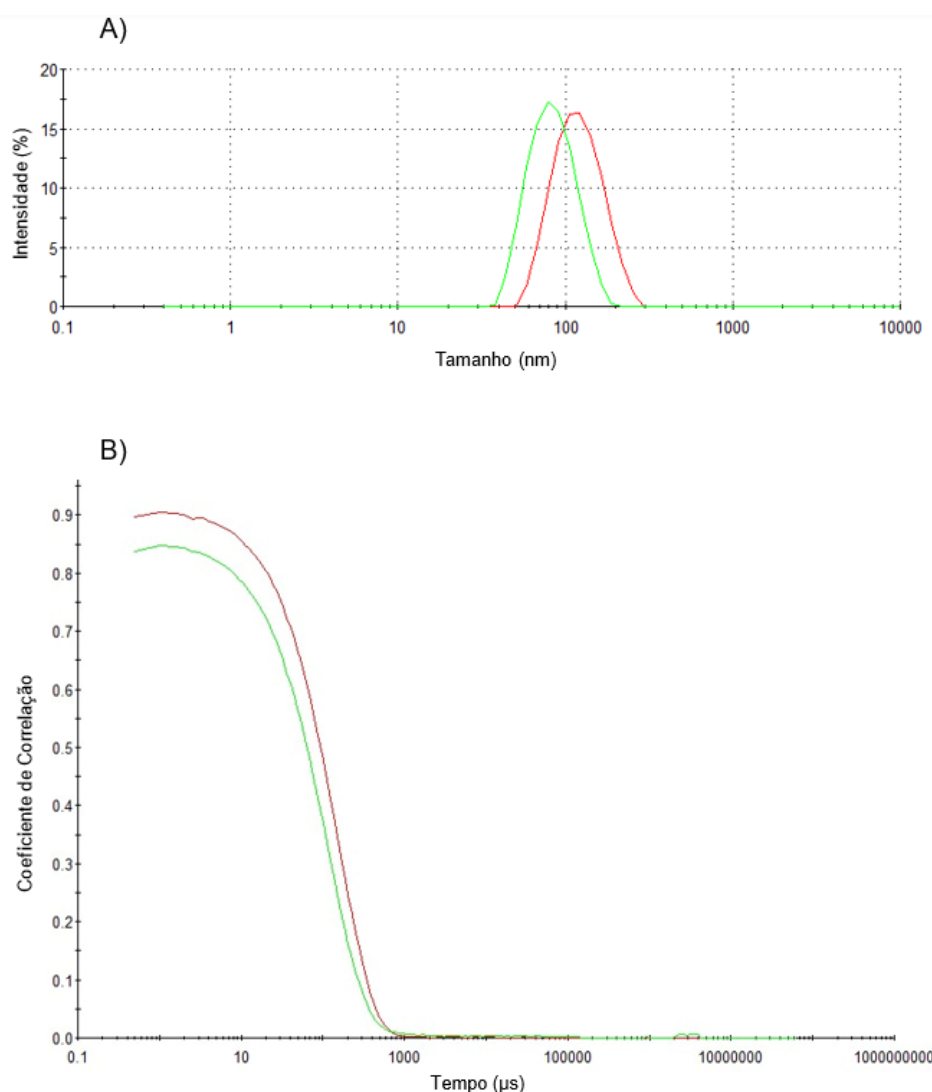


Figura 27. A) Tamanho médio das NPs de impressão molecular obtidos pelo método de síntese de polimerização por precipitação. B) Correlogramas obtidos para os nanoNIPs e nanoMIPs. Verde - nanoNIPs; Vermelho - nanoMIPs

Relativamente ao potencial zeta das NPs, de forma geral, considera-se que existe elevada estabilidade coloidal para valores superiores a 30 mV e inferiores a -30 mV

($-30 \text{ mV} < \text{potencial zeta} < 30 \text{ mV}$), devido a uma redução das forças de atração entre as partículas, prevenindo a aglomeração dos coloides em solução [98]. Para ambas as soluções de NPs (nanoMIPs/nanoNIPs), o potencial zeta obtido foi inferior a -30 mV , o que indica que possuem uma carga superficial negativa considerável. A carga elétrica negativa nas NPs está relacionada com os grupos carboxilato do ácido acrílico (AAc) presentes na estrutura do polimérica [99].

Após ganhar experiência com o método de síntese de precipitação por polimerização, procurou-se desenvolver uma receita que permitisse a produção de nanoMIPs com elevada afinidade para a BSA. Uma vez que os nanoMIPs preparados anteriormente apresentavam carga elétrica negativa, tal como a BSA em soluções a pH neutro (ponto isoeletrico $\sim 4,5$), seria de esperar uma repulsão eletrostática significativa entre os nanoMIPs e a BSA que iria dificultar a interação e o reconhecimento molecular.

Assim sendo, tornou-se imperativo utilizar reagentes no processo de síntese que providenciassem carga elétrica positiva aos nanoMIPs de forma a interagir com a BSA carregada negativamente (pH do meio neutro). A Figura 28 contém a composição reacional utilizada na nova receita.

<i>N-isopropilacrilamida</i> (NIPAm) Monómero ligações de hidrogénio; interações hidrofóbicas	<i>N-terc-butilacrilamida</i> (TBAm) Monómero interações hidrofóbicas	<i>N,N'</i>-metileno-bis- acrilamida (BIS) Agente de entrelaçamento	
Cloridrato de N-(3- Aminopropil)metacrilamida (APM) ligações eletrostáticas	brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) surfactante	brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) surfactante	
Persulfato de amónio (APS)	<i>N,N,N',N'</i>- Tetrametiletileno diamina (TEMED)	dodecil sulfato de sódio (SDS)	Ácido acrílico (AAC)

Figura 28. Reagentes utilizados na nova receita para a síntese de nanoMIPs por polimerização por precipitação para reconhecimento da BSA.

Na nova receita, trocou-se o monómero ácido acrílico (AAc) pelo N-(3-aminopropil)metacrilamida (APM) que contém um grupo funcional amino ($-\text{NH}_2$) suscetível de ser protonado e fornecer carga positiva ao polímero [97]. De forma a evitar

interações indesejadas com o APM, trocou-se o surfactante SDS pelo CTAB e o iniciador APS pelo AIBN (neutro) [100].

Após a síntese e diálise dos nanoMIPs para reconhecimento da BSA, estimou-se o seu tamanho e potencial zeta usando a técnica de DLS. Foram realizadas várias sínteses (n=6) com sucesso e os resultados obtidos foram reprodutíveis. Valores representativos são apresentados na Tabela 3 e representam a média das medições obtidas por DLS.

Tabela 3. Tamanho e potencial zeta das partículas obtidas através da síntese de polimerização por precipitação com o novo conjunto de reagentes

		nanoNIPs	nanoMIPs
Tamanho	Média (nm)	65 ± 3	70 ± 2
	PDI	0,27 ± 0,03	0,25 ± 0,03
Potencial Zeta	Média (nm)	32 ± 3	31 ± 1

Os nanoMIPs apresentaram um tamanho médio de 70 ± 2 nm enquanto os nanoNIPs exibiram um tamanho médio de 65 ± 3 nm, ambos apresentando valores menores que os obtidos para os nanoMIPs preparados anteriormente. Tanto as soluções de nanoMIPs como os nanoNIPs apresentaram valores de índice de polidispersão (PDI) inferiores a 0,3 nas suas distribuições de tamanho, indicando elevada uniformidade e monodispersão das mesmas.

Por último, obtiveram-se valores potencial zeta positivos e superiores a 30 mV, comprovando que a utilização do APM como monómero funcional teve um impacto direto na carga superficial das partículas. Deste modo, demonstrou-se ainda a flexibilidade e adaptabilidade deste método em função da proteína alvo de estudo através da simples alteração da composição da mistura reacional.

Síntese de nanoMIPs usando um epítopo da BSA (E-nanoMIPs)

Tal como descrito anteriormente, são inúmeras as vantagens da utilização de um epítopo de uma determinada proteína na impressão molecular como molécula molde (em vez da proteína inteira), em termos de afinidade, desempenho e/ou custos de produção dos MIPs [81]. Assim sendo, neste trabalho selecionou-se a sequência de

aminoácidos 599-607 (VVSTQTALA) da BSA como epítipo [83], sendo usado como molécula molde no processo de síntese dos nanoMIPs para reconhecimento da BSA. Os E-nanoMIPs foram sintetizados de acordo com a nova receita e procedimento descrito anteriormente, ou seja, utilizando o APM como monómero funcional de modo obter partículas carregadas positivamente. Após a diálise, mediu-se o tamanho e potencial zeta dos nanoNIPs e E-nanoMIPs. Foram realizadas várias sínteses (n=5) com sucesso, e os valores apresentados na Tabela 4 representam a média das medições obtidas.

Tabela 4. Tamanho e potencial zeta dos E-nanoMIPs obtidos através da síntese de polimerização por precipitação

		nanoNIPs	E-nanoMIPs
Tamanho	Média (nm)	56 ± 2	61 ± 1
	PDI	0,29 ± 0,04	0,15 ± 0,02
Potencial Zeta	Média (nm)	47 ± 2	32 ± 1

Os resultados obtidos demonstraram mais uma vez que as NPs molecularmente impressas são monodispersas (PDI < 0,3) e têm o tamanho desejado, de poucas dezenas de nanómetros. Os valores de potencial zeta (> +30 mV) confirmam a boa estabilidade coloidal das NPs em solução.

4.1.2. Síntese em fase sólida

Tal como descrito anteriormente, o método de síntese de polimerização por precipitação pode ter algumas desvantagens, destacando-se a elevada heterogeneidade dos locais de ligação (anticorpo plástico policlonal) e o facto da remoção da molécula molde por diálise ser um processo moroso [50, 54].

Posto isto, e de modo a aumentar a afinidade das NPs de impressão molecular para a BSA, tentou-se produzir neste trabalho, nanoMIPs através do método de síntese em fase sólida. Para tal, utilizou-se o protocolo reportado na secção 3.3 que consiste primeiramente na imobilização covalente da molécula molde em esferas de vidro,

seguido da reação de polimerização por precipitação. Por fim, dá-se a eluição com água e recolha dos nanoMIPs com maior afinidade para a molécula molde.

Para imobilizar a molécula molde, as esferas de vidro foram ativadas de modo a modificar a sua superfície, tornando-a mais reativa (formação de grupos -OH na superfície). De seguida, procedeu-se à silanização das esferas de vidro. Neste passo, foram utilizados dois solventes para preparar as soluções do silano (APTMS): a água pura e o tolueno anidro. Os mecanismos de silanização em água e em tolueno diferem principalmente devido à natureza polar da água e ao carácter hidrofóbico do tolueno, afetando a hidrólise, a condensação e a formação de ligações entre o silano e a superfície [101].

Apesar do protocolo descrito na literatura realizar a silanização em tolueno anidro, a utilização de água pura neste trabalho surge numa tentativa de tornar o método mais sustentável [102], evitando o uso de solventes orgânicos, dado os riscos do tolueno para a saúde humana e meio ambiente [103].

Assim sendo, realizou-se a silanização das esferas de vidro utilizando uma solução de APTMS 2%, preparada em tolueno anidro, tal como descrito na literatura. De seguida, foi efetuada a silanização com soluções aquosas de APTMS. Foram testadas diferentes concentrações de APTMS, entre os 2-15%, de modo a aumentar o grau de cobertura das esferas de vidro. Neste contexto, o teste colorimétrico da ninidrina foi utilizado para quantificar as moléculas de silano imobilizado nas esferas de vidro utilizando os dois solventes (Anexo 2). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 5.

O valor de silano imobilizado, obtido para a solução de APTMS 2% preparada em tolueno (solução de referência), foi de $(9,00 \pm 0,02) \times 10^{-6}$ moles de APTMS por grama de esferas de vidro. Uma vez que os resultados obtidos para a solução aquosa de APTMS (2%) não permitiram obter uma quantidade de silano imobilizado nas esferas de vidro semelhante ao tolueno, procurou-se aumentar a concentração de APTMS de modo a obter uma quantidade semelhante. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que a utilização de uma solução aquosa de APTMS 15% permite obter uma quantidade de silano imobilizado nas esferas de vidro da mesma ordem de grandeza que a solução de APTMS 2%, preparada em tolueno (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidade de APTMS imobilizado nas esferas de vidro

	APTMS 2%		APTMS 10%	APTMS 15%
Moles de APTMS/grama de esferas de vidro	$(9,00 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	$(3,08 \pm 0,09) \times 10^{-7}$	$(5,01 \pm 0,05) \times 10^{-7}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-6}$
	Tolueno	Água desionizada		

Após a silanização, o glutaraldeído foi usado para funcionalizar as superfícies sólidas, uma vez que permite introduzir grupos aldeído (-CHO) na superfície. Esses grupos aldeído são reativos e podem ser usados para ligar covalentemente moléculas que possuem grupos amina primários (APTMS-NH₂-glutaraldeído-NH₂-proteína) [104].

Posteriormente, procedeu-se à ligação covalente da molécula molde (BSA) às esferas de vidro. De modo a quantificar a BSA imobilizada nas esferas de vidro após a silanização realizou-se o teste colorimétrico de Bradford (Anexo 3). Os resultados obtidos estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Quantidade de proteína imobilizada nas esferas de vidro

	APTMS 2%		APTMS 10%	APTMS 15%
Moles de BSA ligada/grama de esferas de vidro	$(6,48 \pm 0,03) \times 10^{-9}$	$(1,04 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	$(3,03 \pm 0,02) \times 10^{-9}$	$(5,19 \pm 0,04) \times 10^{-9}$
	Tolueno	Água desionizada		

Uma vez que, a quantidade de BSA ligada às esferas de vidro, após utilizar a solução aquosa de APTMS 15% foi semelhante à quantidade de BSA ligada às esferas de vidro após utilizar a solução de APTMS 2%, preparada em tolueno, decidiu-se avançar para o próximo passo utilizando exclusivamente a solução de APTMS 15%, preparada em água.

Após a imobilização da proteína, procedeu-se à imersão das esferas de vidro na mistura reacional (com a receita utilizada na Figura 26) e iniciou-se a polimerização. Por fim, os nanoMIPs com maior afinidade para a BSA foram obtidos por eluição com água quente.

O rendimento obtido, de 0,20 mg g⁻¹ de esfera de vidro, foi muito inferior ao obtido pelo método da polimerização por precipitação.

O método de síntese em fase sólida foi testado repetidamente quer utilizando a BSA quer o seu epítipo sintético como molécula molde, imobilizado nas esferas de vidro. Foi ainda testada a síntese de nanoNIPs (onde não se realizou o passo da imobilização da proteína) servindo como comparação aos E-nanoMIPs seletivos a outras moléculas.

De uma forma geral, problemas associados à agregação das partículas foram recorrentes utilizando este método de síntese. Como exemplo desta limitação experimental, apresentam-se os resultados obtidos para o tamanho e potencial zeta dos nanoNIPs e dos E-nanoMIPs. Foram realizadas várias sínteses, e os valores apresentados na Tabela 7 representam a média das medições obtidas.

Tabela 7. Tamanho e potencial dos nanoNIPs e E-nanoMIPs obtidos através da síntese em fase sólida

		nanoNIPs	E-nanoMIPs (APTMS 2%/tolueno)	E-nanoMIPs (APTMS 15%/H2O)
Tamanho	Média (nm)	494 ± 172	311 ± 18	237 ± 16
	PDI	0,49 ± 0,04	0,5 ± 0,2	0,39 ± 0,04
Potencial Zeta	Média (nm)	-20 ± 1	-20 ± 3	-13 ± 4

Os resultados obtidos mostram que, independentemente do solvente utilizando na silanização, os nanoMIPs obtidos apresentaram um tamanho médio acima do esperado, de várias centenas de nanómetros. Os valores de PDI obtidos, superiores a 0,3, indicam uma distribuição de tamanho de partículas ampla e heterogénea. Por fim, os valores de potencial zeta, inferiores a -30 mV, indicam uma baixa estabilidade coloidal das NPs. Tal como pode observar na figura 29, existe a presença de uma segunda população de partículas de vários micrómetros em solução, confirmando a agregação dos E-nanoMIPs em solução.

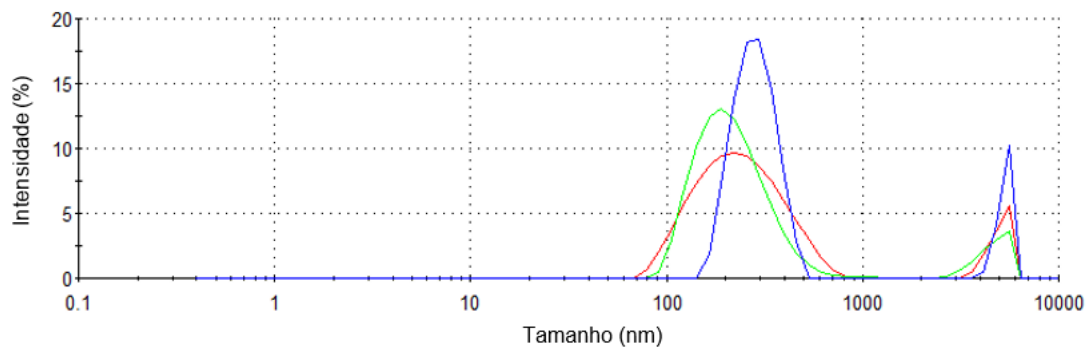


Figura 29. Tamanho médio das NPs de impressão molecular obtidos pelo método de síntese em fase sólida. Verde – E-nanoMIPs (APTMS 15%/H₂O); Vermelho - E-nanoMIPs (APTMS 2%/tolueno); Azul – nanoNIPs.

4.1.3. Comparação dos métodos de síntese

Com base na literatura e nos resultados obtidos pelos dois métodos de síntese de nanoMIPs, foi possível perceber que cada um dos métodos tem vantagens e desvantagens associadas, que se encontram sistematizados na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação das vantagens e desvantagens encontradas para cada um dos métodos de síntese.

	Vantagens	Desvantagens
Síntese por Polimerização por Precipitação	+ método muito simples e eficaz para a obtenção de nanoMIPs; + obtenção de NPs esféricas e tamanho nanométrico + flexibilidade na composição dos reagentes para adaptar a outras (bio)moléculas; + elevado rendimento obtido (5,0 e 6,0 mg mL⁻¹)	- remoção da molécula molde por diálise foi demorada - pode existir elevada heterogeneidade dos locais de ligação (anticorpo plástico policlonal) - gastos elevados de molécula molde para a síntese.
Síntese em Fase Sólida	+Teoricamente permite a formação de locais de ligação homogêneos e de maior afinidade (anticorpo plástico monoclonal) + Utilização de baixa quantidade de molécula molde +Procedimento de obtenção de nanoMIPs simples e rápido (simples lavagem com água)	- processo de síntese complexo e demorado; - dificuldade em obter nanoMIPs com tamanho nanométrico (agregação) - rendimento baixo (0,20 mg g⁻¹ de esfera de vidro)

Posto isto, e após várias tentativas sem sucesso com o método de síntese em fase sólida, decidiu-se avançar para a fabricação do sensor ótico para deteção da BSA com os E-nanoMIPs obtidos pelo método de polimerização por precipitação.

4.2. Avaliação da afinidade dos nanoMIPs utilizando a técnica SPR

Para avaliar a performance dos nanoMIPs para reconhecimento da BSA, preparados por precipitação por polimerização, os nanomateriais preparados foram primeiramente imobilizados, através de uma ligação covalente, aos substratos de ouro de SPR. Neste estudo, testaram-se 3 sistemas de NPs de impressão molecular, os nanoMIPs sintetizados na presença de BSA, os nanoMIPs preparados na presença de um epítopo da BSA (E-nanoMIPs) e as NPs preparadas na ausência de molécula molde (nanoNIPs).

Os resultados obtidos foram ainda comparados com os obtidos com um anticorpo monoclonal com afinidade para a BSA.

4.2.1. Imobilização das NPs de impressão molecular nos substratos de SPR

O procedimento experimental para imobilização dos nanomateriais molecularmente impressos na superfície dos substratos de ouro encontra-se representado na secção 3.5.1.

Na Figura 30 encontram-se representados sensogramas representativos da imobilização dos nanoNIPs, nanoMIPs, E-nanoMIPs e do anticorpo natural nos substratos de SPR, utilizando o mesmo método. Tal como se pode observar na Figura 30, a imobilização dos materiais testados na superfície de ouro funcionalizada foi realizada com sucesso, garantindo uma distribuição homogénea dos materiais nos substratos de SPR.

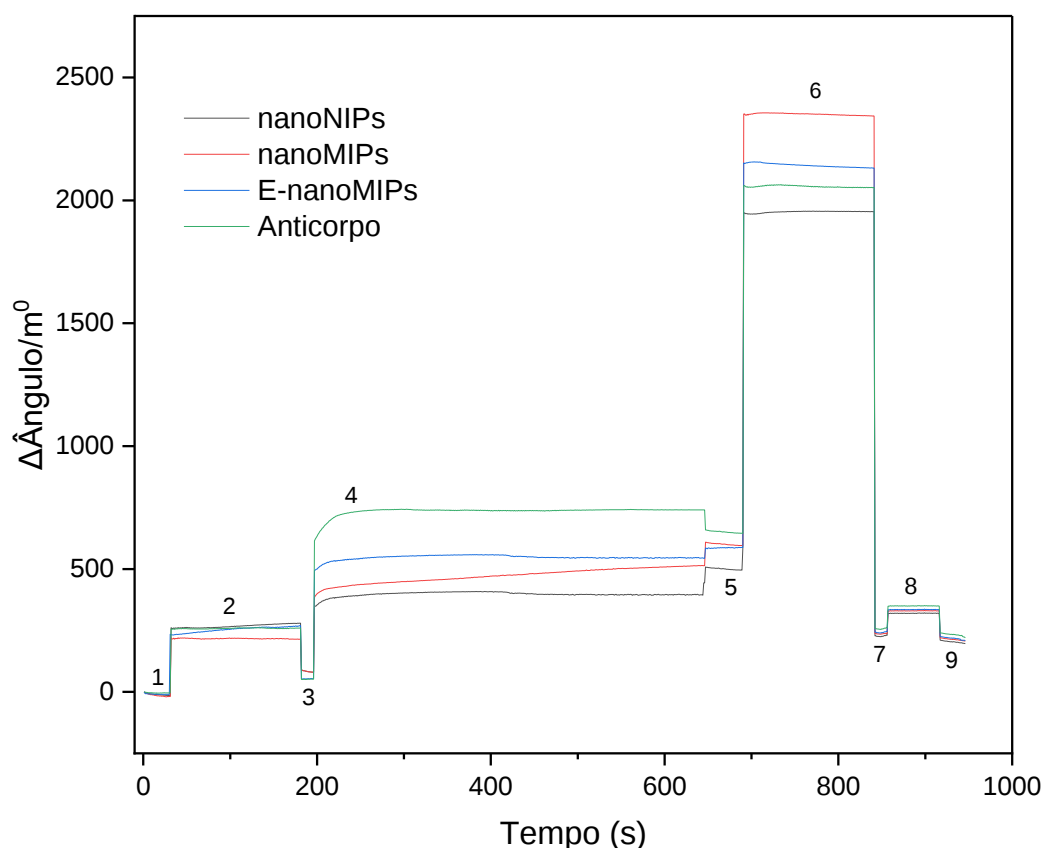


Figura 30. Sensogramas representativos da imobilização dos recetores testados nos substratos de SPR: Linha 1, linha de base ($0,010 \text{ mol L}^{-1}$ PB); Linha 2, ativação do 11-MUA ($0,010 \text{ mol L}^{-1}$) com uma mistura de EDC/NHS; Linha 3, lavagem da superfície com PB (linha de base); Linha 4, imobilização dos recetores; Linha 5, lavagem da superfície com PB (linha de base); Linha 6, desativação dos esteres reativos com etanolamina (1 mol L^{-1}); Linha 7, lavagem da superfície com PB (linha de base); Linha 8, lavagem com uma solução de PB e SDS 1%; linha 9, lavagem com PB (linha de base).

As variações do ângulo no passo de imobilização, representados na Tabela 9, devem-se à ligação dos diferentes materiais à superfície funcionalizada, sendo influenciadas pelo tamanho e estrutura molecular de cada um dos materiais, e refletem o máximo grau de cobertura da superfície. O facto de os valores obtidos apresentarem um desvio padrão relativamente baixo para várias imobilizações com o mesmo recetor, evidencia a estabilidade dos materiais produzidos e a elevada reprodutibilidade na preparação do sensor ótico.

Tabela 9. Variação do ângulo devido à imobilização dos recetores nos substratos de SPR (passo 5)

Recetor	$\Delta\text{ângulo}/\text{m}^0$
nanoNIPs	505 ± 8
nanoMIPs	514 ± 3
E-nanoMIPs	534 ± 4
Anticorpo	594 ± 2

4.2.2. Estudos de afinidade

Após a etapa da construção das plataformas de SPR, procedeu-se à interação dos vários tipos de recetores naturais e sintéticos com a BSA. Para tal, um conjunto de soluções padrão de BSA foram preparadas em PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e de seguida injetadas de forma cumulativa (sem regeneração) para avaliar a interação com os materiais imobilizados em tempo real. Como é possível visualizar na figura 31, apenas a partir da injeção da solução padrão de BSA $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ é que se observou resposta significativa do sensor à BSA. Sendo assim, utilizou-se apenas a gama de concentrações entre $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para efeito comparativo dos vários recetores testados.

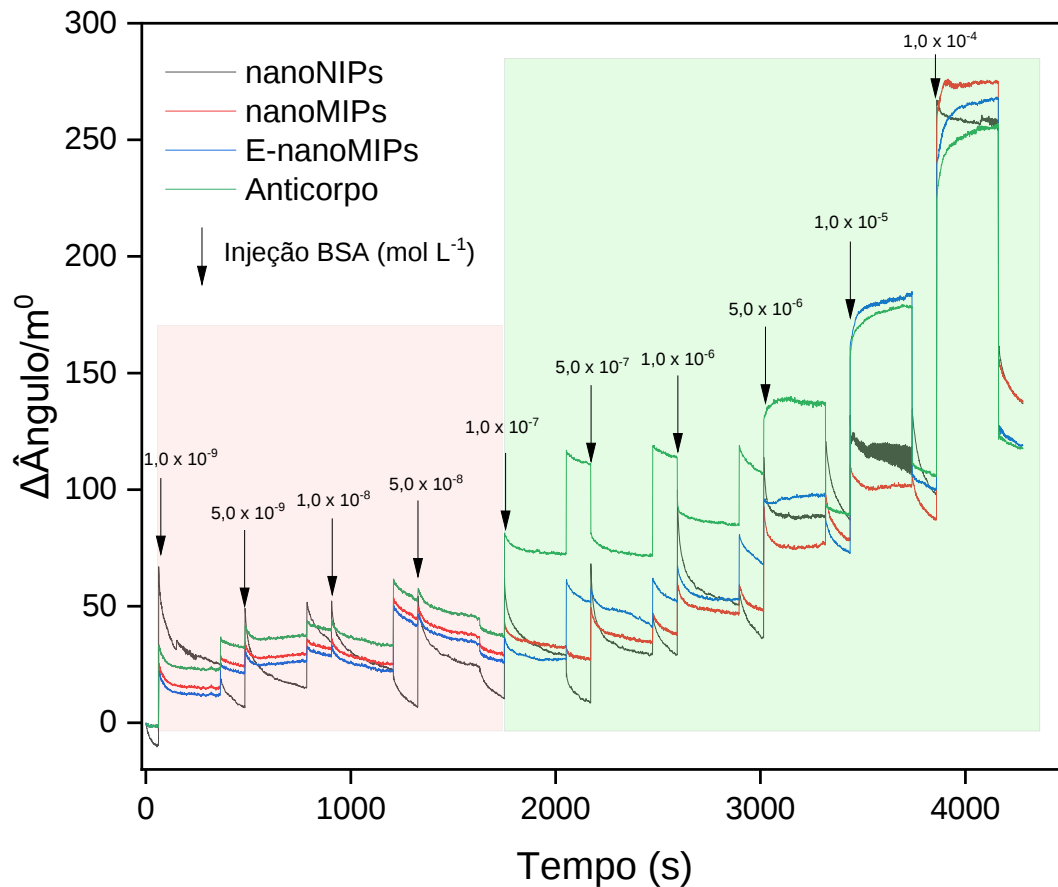


Figura 31. Sensogramas obtidos para os diferentes materiais. Zona vermelha – gama de concentrações onde não se observou resposta do sensor à BSA; Zona verde – gama de concentrações onde se observou resposta do sensor à BSA.

A variação do ângulo, obtida 300 s após cada injeção de BSA, foi representada em função da concentração de BSA, para cada um dos recetores, sendo os valores apresentados na Figura 32 o resultado médio de várias medições para cada recetor.

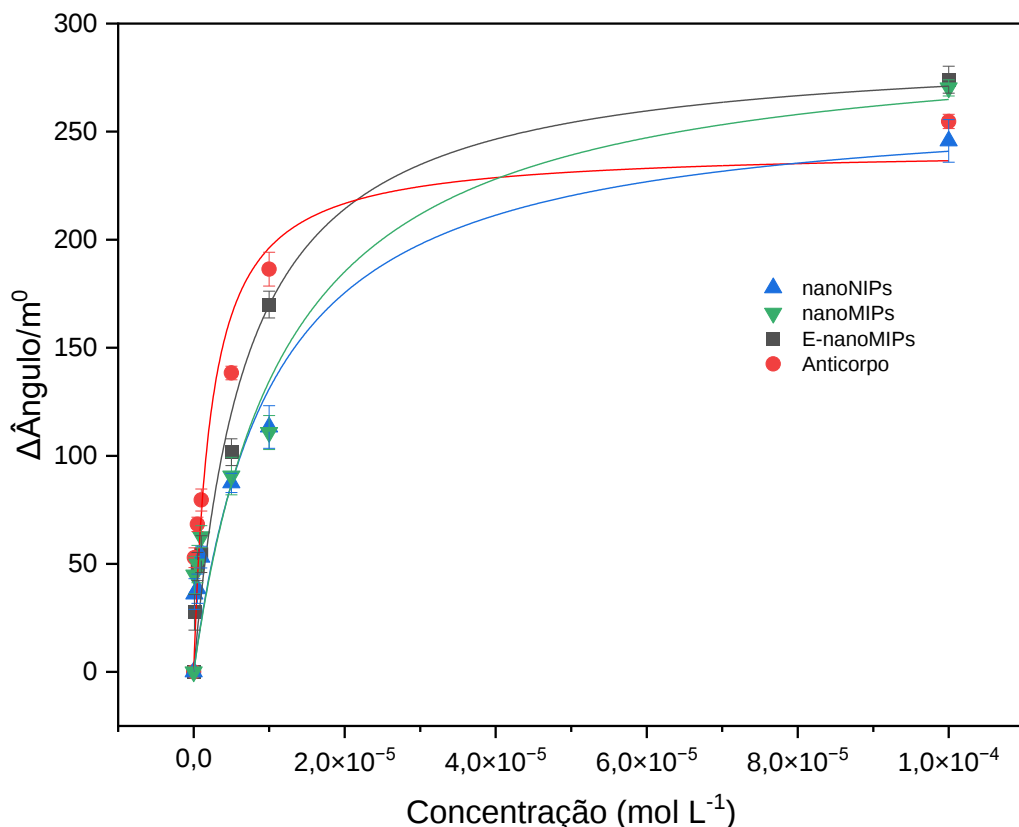


Figura 32. Representação da variação do ângulo em função da concentração de BSA. Ajuste do modelo de Langmuir aos resultados experimentais obtidos para a interação entre os diferentes recetores e a BSA.

De modo a realizar os estudos de adsorção, foi utilizada a isotérmica de Langmuir para estimar a constante de afinidade (K_D) de cada um dos recetores.

O modelo de Langmuir é um modelo simples e que considera que apenas uma molécula de analito se liga a uma molécula de ligando (1:1). Parte da suposição de uma energia de adsorção mais forte para a primeira camada de moléculas adsorvidas, assumindo que todos os locais de ligação são equivalentes (homogêneos), e sem considerar interações entre as moléculas adsorvidas. Neste modelo, a constante de Langmuir (K_L) caracteriza o processo de adsorção e quantifica a força da interação.

De acordo com a teoria de Langmuir, a isotérmica para a adsorção monomolecular da BSA na superfície do sensor contendo os locais de ligação pode ser matematicamente representada através da Equação 1 (caso o sistema atinja o equilíbrio) [105-107]:

$$\Delta\theta_{eq} = \frac{\Delta\theta_{m\acute{a}x} K_L C}{1 + K_L C} \quad (1)$$

onde $\Delta\theta_{eq}$ representa a variação do ângulo em condições equilíbrio para as diferentes concentrações de BSA; $\Delta\theta_{m\acute{a}x}$ representada a variação máxima do ângulo de ressonância, ou seja, quando a superfície está completamente coberta por moléculas de BSA; K_L representa a constante de afinidade entre a BSA e os locais de ligação; C representa a concentração das moléculas de BSA na solução.

Os resultados obtidos experimentalmente foram ajustados à equação de Langmuir (Equação 1 e Figura 32), utilizando os softwares OriginPro 2023b e Igor Pro 6.2.2.2. Após o ajuste da isotérmica, estimaram-se os valores de $\Delta\theta_{max}$ e K_L . Os valores obtidos para cada sistema encontram-se resumidos na Tabela 10:

Na literatura é comum a força de interação entre moléculas e os locais de ligação serem expressos através da constante de dissociação (K_D) que é inversamente proporcional à força da interação. Ou seja, quanto menor for o valor de K_D , mais forte e estável é a interação. Assim sendo, os valores de K_D foram incluídos na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros estimados após ajuste do modelo de Langmuir aos resultados experimentais

	$\Delta\theta_{max}$ (m°)	K_L (mol ⁻¹ L)	R ²	K_D (mol L ⁻¹)
nanoNIPs	266 ± 33	(9 ± 4) × 10 ⁴	0,92333	1,1 × 10 ⁻⁵
nanoMIPs	297 ± 46	(8 ± 4) × 10 ⁴	0,88013	1,2 × 10 ⁻⁵
E-nanoMIPs	290 ± 25	(1,4 ± 0,4) × 10 ⁵	0,96135	7,1 × 10 ⁻⁶
Anticorpo	242 ± 25	(4 ± 2) × 10 ⁵	0,91921	2,5 × 10 ⁻⁶

Os nanoNIPs (sistema de referência), tal como seria de esperar, apresentam um valor elevado de K_D (1,1 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) sugerindo uma interação relativamente mais fraca devido à ausência de interações seletivas com moléculas molde. Por sua vez, os nanoMIPs, apesar de terem sido projetados para terem interações seletivas com as moléculas molde, apresentam um valor de K_D (1,2 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) muito próximo do obtido para os nanoMIPs. Isto pode estar associado às limitações da impressão molecular de proteínas. Uma vez que estas apresentam grandes dimensões e uma

estrutura complexa, a eficácia da extração da proteína durante o processo de diálise deverá ter sido muito limitada.

Em contrapartida, os nanoMIPs preparados utilizando o epítipo da BSA (E-nanoMIPs), apresentaram um valor de K_D consideravelmente inferior ($7,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) resultando assim no valor obtido mais próximo ao do anticorpo ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) com afinidade para a BSA. Tal como seria de esperar, o anticorpo natural apresenta maior afinidade para a BSA, com um valor de K_D cerca de uma ordem de grandeza superior à dos nanoMIPs. Embora o anticorpo natural apresente maior afinidade, é importante considerar as desvantagens associadas à sua utilização. O anticorpo natural é mais caro, apresenta uma baixa estabilidade em certas condições (pH, temperatura, etc) e requer cuidados especiais de utilização e armazenamento. Assim sendo, os E-nanoMIPs foram utilizados neste trabalho para a deteção da BSA, uma vez que apresenta inúmeras vantagens em termos de afinidade, desempenho e/ou custos de produção dos MIPs.

Hoshino et al. [108] produziu, através do mesmo método de síntese utilizado neste trabalho, a polimerização por precipitação, nanoMIPs com afinidade para a toxina melitina. Os nanoMIPs, apresentaram um valor de K_L de $4,6 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, ou seja, da mesma ordem de grandeza que os E-nanoMIPs produzidos neste trabalho.

Também *Wang et al.* [55], utilizando o método da polimerização por precipitação produziu nanoMIPs com afinidade para a hormona cardíaca peptídeo natriurético atrial, do inglês atrial natriuretic peptide (ANP). O valor reportado de K_D para os nanoMIPs foi de $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Este valor vai de encontro aos valores obtidos neste trabalho para os E-nanoMIPs.

Contudo, a síntese poderá ser otimizada em trabalho futuro de modo a obter valores de K_D na ordem de grandeza dos nmol L^{-1} . A otimização da síntese em fase sólida poderá ser um fator importante para reduzir o K_D e aumentar assim a afinidade das NPs para a molécula molde.

4.3. Sensor ótico para a deteção da BSA

Com o objetivo de preparar o sensor ótico para a deteção da BSA, primeiramente, foram otimizadas as condições experimentais de modo a aumentar a sua performance, nomeadamente o tratamento da superfície para minimizar a adsorção não específica de moléculas e a regeneração da superfície do sensor.

Após a otimização das condições experimentais, foram realizados estudos de detecção da BSA em PB, tendo-se estimados os parâmetros analíticos do sensor, tais como a sensibilidade, a zona de resposta linear e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Foram também realizados estudos de seletividade, um parâmetro importante para a aplicação prática do sensor em amostras complexas (como o leite, por exemplo) e ainda realizados ensaios de recuperação.

4.3.1. Minimização da adsorção não específica na superfície do sensor

As ligações não específicas têm origem em forças moleculares (interações electrostáticas, interações hidrofóbicas, etc.) entre o analito e a superfície do sensor, tendo uma contribuição de “falso positivo” para o sinal num sensograma [109]. Existem diversas estratégias reportadas na literatura para minimizar a adsorção não específica em diversos tipos de superfícies, nomeadamente a utilização de SAMs, de compostos zwitteriônicos, do poli(etilenoglicol), e de proteínas, entre outros [109, 110].

Embora a BSA possa reduzir a adsorção não específica, esta foi utilizada como molécula molde na produção dos nanoMIPs, não podendo ser utilizada para bloquear a superfície neste trabalho.

Assim sendo, tentou-se substituir a BSA pela caseína, uma vez que esta possui regiões hidrofóbicas que permitem a sua adsorção na superfície do chip e regiões hidrofílicas que minimizam a adsorção não específica [111], fazendo com que a BSA tenha mais tendência para se ligar especificamente aos nanoMIPs.

No entanto, como é possível observar na Figura 33, a caseína não foi a opção mais adequada. A curva de calibração obtida após o tratamento da superfície com a caseína não tem uma tendência linear e apresentou um sinal bastante inferior, provavelmente devido a interações indesejadas com os locais de ligação dos E-nanoMIPs. Sendo assim, procurou-se uma nova solução.

De acordo com literatura, a utilização de SAMs é uma solução simples e eficaz para combater a adsorção não específica [110]. Geralmente, as cadeias terminadas em tiol podem ligar-se à superfície do ouro para formar um conjunto ordenado de moléculas, de modo a criar uma superfície que é resistente à adsorção das proteínas.

Neste contexto, testou-se utilização de um segundo tiol, o 6-mercaptop-1-hexanol (MCH). Este permite formar uma monocamada organizada, que serve como uma “barreira

física” que impede a adsorção não específica de moléculas à superfície do sensor devido às extremidades hidrofílicas (grupos –OH).

Após o tratamento com MCH (estabilização da superfície com MCH, durante 1h), foi possível aumentar o intervalo de resposta linear do sensor, (entre $5,00 \times 10^{-7}$ M e os $1,50 \times 10^{-5}$ M) (Figura 33). A sensibilidade do sensor diminuiu provavelmente devido à diminuição da contribuição das ligação não específicas da BSA à superfície de ouro (adsorção).

Para reduzir ainda mais quaisquer interações não específicas, foi adicionado Tween 20 (0,005% v/v) às soluções padrão de BSA preparadas. Este permite romper as ligações e minimizar as interações intermoleculares entre a proteína e a superfície [112].

Tal como se pode ver na Figura 33, após a imobilização dos E-nanoMIPs, o bloqueio da superfície de deteção, com MCH e a adição de Tween 20 às soluções e amostras de BSA, permitiu minimizar as interações não específicas entre a BSA e a superfície do sensor, tendo um papel importante na performance do sensor (aumento da zona de resposta linear) e obtenção de resultados precisos e confiáveis nas experiências de SPR.

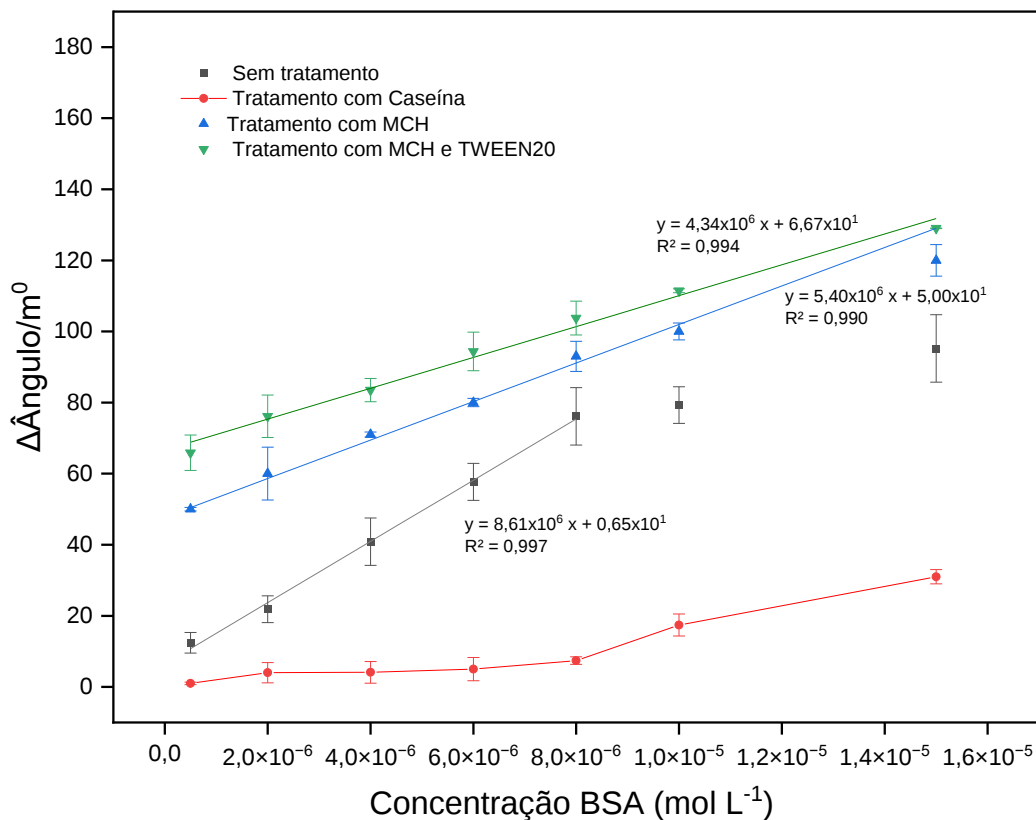


Figura 33. Interação dos padrões de BSA com o sensor, após estabilização com os diferentes reagentes.

4.3.2. Regeneração do sensor

Nos estudos de afinidade (secção 4.2.2), a injeção dos padrões de BSA foi realizada de forma cumulativa, ou seja, sem regeneração da superfície do sensor. Contudo, a etapa de regeneração traduz-se em inúmeras vantagens, uma vez que permite:

- i) evitar a saturação do sensor e aumentar a zona de resposta linear dado que se remove completamente as moléculas ligadas à superfície do sensor antes de uma nova injeção de analito sobre a superfície sensor do sensor [113].
- ii) a reutilização do mesmo sensor várias vezes em experiências consecutivas, sendo vantajoso quer em termos de economia de recursos quer em custos;

Para este trabalho, foi utilizada uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (m/v), preparada em tampão acetato 0,010 mol L⁻¹, pH 4,0, como solução de regeneração. O SDS, sendo um detergente aniónico, é capaz de quebrar as interações não covalentes entre a BSA e os nanoMIPs, permitindo uma remoção eficaz da BSA da superfície do sensor. Para remoção completa da BSA, e tendo em conta o seu ponto isoelétrico (PI: ~4,5), ajustou-se o pH da solução de regeneração para pH 4,0, de forma a alterar a carga da proteína de negativa para positiva e deste modo potenciar a repulsão electrostática com os E-nanoMIPs carregados positivamente.

Tal como se pode observar nos sensogramas apresentados na Figura 34, após a injeção da solução padrão 6,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de BSA, a injeção da solução de regeneração permitiu a remoção completa da BSA, isto é, o sinal regressou à linha de base. O procedimento foi eficaz para vários ciclos consecutivos de interação-regeneração.

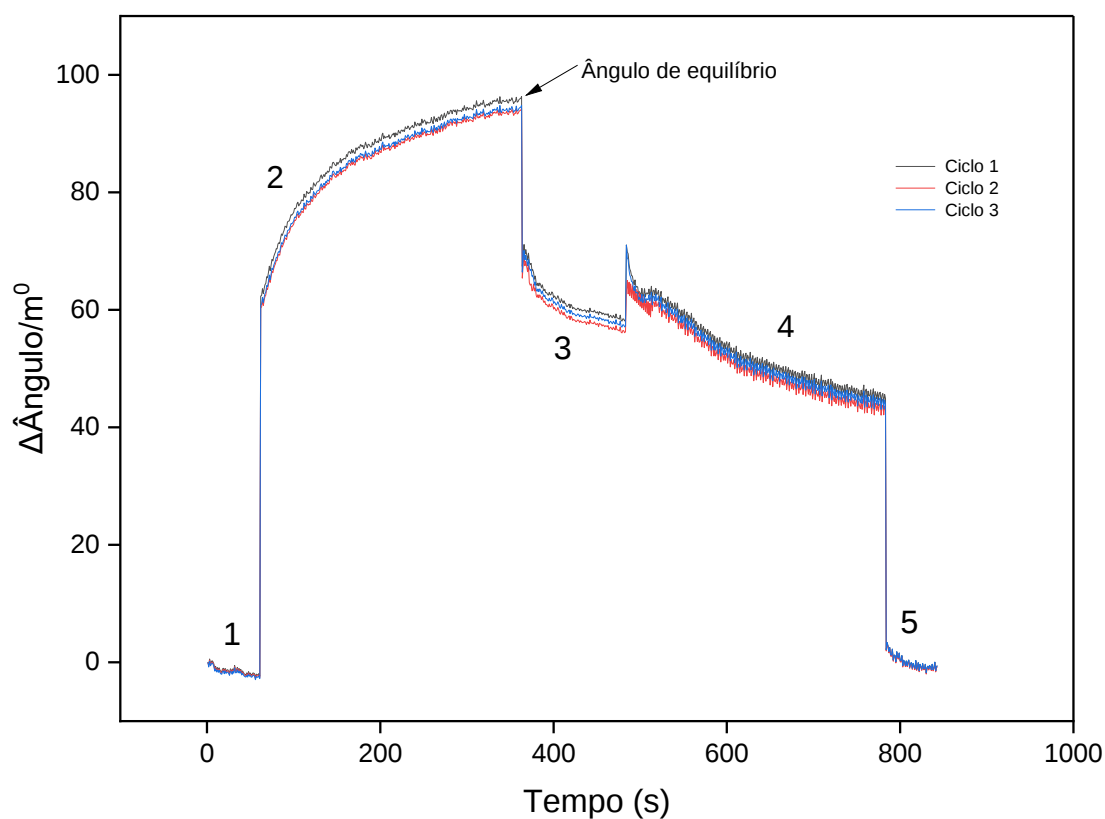


Figura 34. Dados do sensograma de SPR obtidos para uma concentração de BSA de $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Linha 1, linha de base (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 2, associação (BSA $6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); Linha 3, dissociação (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 4, (SDS $0,1\%$ (m/v) preparada em tampão acetato pH 4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$); Linha 5, linha de base (PB $0,010 \text{ mol L}^{-1}$).

4.3.3. Estudos de deteção

Após a otimização do sensor SPR, foram realizados os estudos de deteção da BSA, de acordo com a secção 3.5.3. Os sensogramas obtidos para as várias concentrações de BSA testadas encontram-se na Figura 35A.

Após o processo de deteção, foram recolhidos os dados da variação do ângulo no ângulo de equilíbrio e foi possível criar a curva de calibração que se segue (Figura 35B).

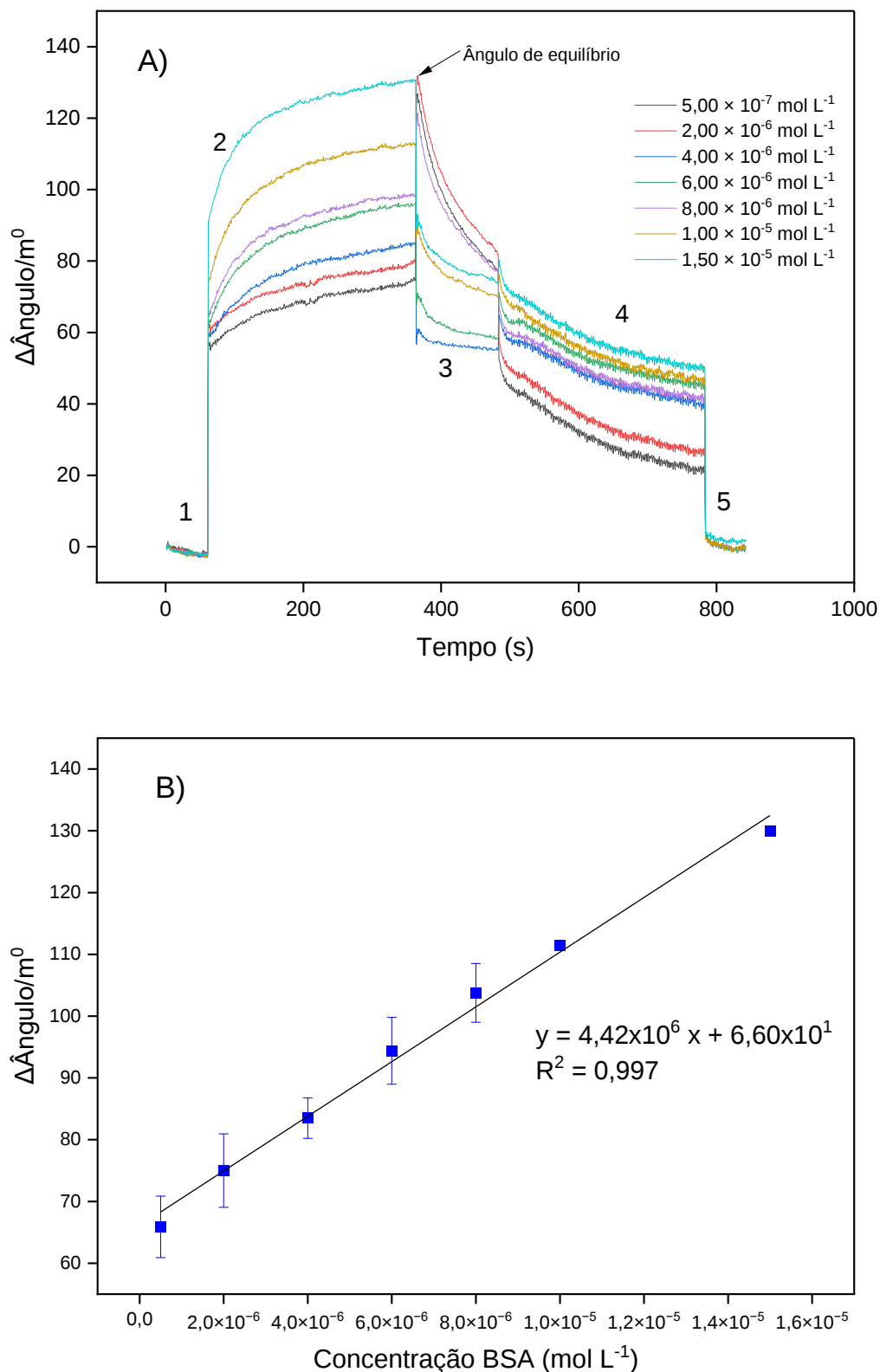


Figura 35. A) Dados do sensograma de SPR obtidos para as soluções de BSA preparadas. Linha 1, linha de base (PB 0,010 mol L $^{-1}$); Linha 2, associação (BSA 6,00 $\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$); Linha 3, dissociação (PB 0,010 mol L $^{-1}$); Linha 4, (SDS 0,1% (m/v) preparada em tampão acetato 0,010 mol L $^{-1}$); Linha 5, linha de base (PB 0,010 mol L $^{-1}$). B) Curva de calibração obtida para detecção da BSA.

Posteriormente foram estimados os parâmetros analíticos do sensor ótico para a deteção da BSA, nomeadamente, os limites de deteção e quantificação, sensibilidade e zona de resposta linear.

A determinação dos limites de deteção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) permite avaliar a sensibilidade dos métodos de análise e garantir a qualidade dos resultados. Determinar o LOD é fundamental para identificar o nível mais baixo de concentração de uma substância que pode ser detetado, permitindo-nos afirmar com confiança a presença da substância. O LOQ permite quantificar com precisão concentrações mínimas de uma substância [114].

O LoD do sensor foi determinado através da Equação 2 [114]

$$LoD = 3 \times \frac{S_b}{m} \quad (2)$$

enquanto o LoQ foi determinado através da Equação 3 [114]

$$LoQ = 10 \times \frac{S_b}{m} \quad (3)$$

onde o S_b é o desvio padrão da ordenada na origem e o m é o declive da curva de calibração.

Para determinar os limites foi necessário fazer um ajuste à gama de concentrações utilizada, uma vez que ao utilizar toda a gama linear, o valor obtido para o LoD encontrava-se acima do primeiro padrão utilizado. Para tal, utilizou-se apenas o intervalo de concentrações entre $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores obtidos encontram-se representados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros obtidos do sensor ótico para a deteção da BSA

Intervalo de concentrações utilizado	LoD (mol L^{-1})	LoQ (mol L^{-1})	Sensibilidade ($\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	R^2
$5,00 \times 10^{-7} - 1,50 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$3,35 \times 10^{-6}$	$4,42 \times 10^6$	0,997
$2,00 \times 10^{-6} - 1,50 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-6}$	$3,39 \times 10^{-6}$	$4,27 \times 10^6$	0,998

Uma vez que a quantidade de BSA no leite é normalmente superior a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o sensor ótico produzido permite a deteção da BSA em amostras de leite [10].

Na literatura, Wang *et al.* [115] que reporta um LOD de $3,10 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para a detecção da BSA através da técnica de SPR, utilizando como recetor filmes finos de MIP obtidos por eletropolimerização.

4.3.4. Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação dão informação acerca do comportamento que o método deveria apresentar.

Este ensaio foi realizado (em triplicado) injetando 3 concentrações conhecidas de BSA ($2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre a superfície do sensor. Foi medido o sinal ótico e determinou-se a concentração obtida bem como a % de recuperação (Tabela 12). Neste caso não seria de esperar efeito da matriz uma vez que o estudo foi realizado em tampão fosfato. Os valores de recuperação obtidos para as várias concentrações de analito testadas, entre 97 e 102%, encontram-se dentro do intervalo de aceitação definido (80-120%), com um desvio padrão relativo reduzido ($RSD (\%) = \frac{s}{\text{média}} \times 100$), entre 1 e 3%.

Tabela 12. Percentagem de recuperação obtidas para as várias concentrações de BSA testadas

Concentração (mol L^{-1})	Concentração obtida (mol L^{-1})	Recuperação (%)	RSD (%)
$2,00 \times 10^{-6}$	$2,04 \times 10^{-6}$	102	3
$4,00 \times 10^{-6}$	$3,87 \times 10^{-6}$	97	4
$6,00 \times 10^{-6}$	$6,25 \times 10^{-6}$	104	1

4.3.5. Estudos de seletividade

Em aplicações analíticas de sensores e biossensores, a seletividade é fundamental para garantir que o sensor responda seletivamente ao analito de interesse, minimizando a interferência de outras moléculas presentes na amostra [116].

Para o estudo foram seleccionadas duas moléculas:

- (i) o antibiótico vancomicina ($M = 1449,12 \text{ g mol}^{-1}$), cujo tamanho é muito inferior à BSA, mas é próximo do epítipo ($M = 889,02 \text{ g mol}^{-1}$) utilizado na preparação dos E-nanoMIPs;
- (ii) a caseína ($M = 24 \text{ kDa}$), por ser a proteína em maior quantidade no leite.

A seletividade do sensor para a BSA foi avaliada através da injeção de soluções de interferente (de concentração $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na superfície do sensor e posterior comparação com resposta obtida para a BSA. Os resultados obtidos estão representados na Figura 36. Apesar de o biossensor ter sido projetado para ser seletivo para a BSA, os resultados mostram que este também responde significativamente à caseína. Isto deverá estar relacionado com a interação electrostática entre a caseína com os E-nanoMIPs. O ponto isoelétrico da caseína é 4,6, o que indica que, tal como a BSA, está negativamente carregada em soluções a pH neutro.

Por outro lado, o sensor teve uma resposta pouco significativa à vancomicina.

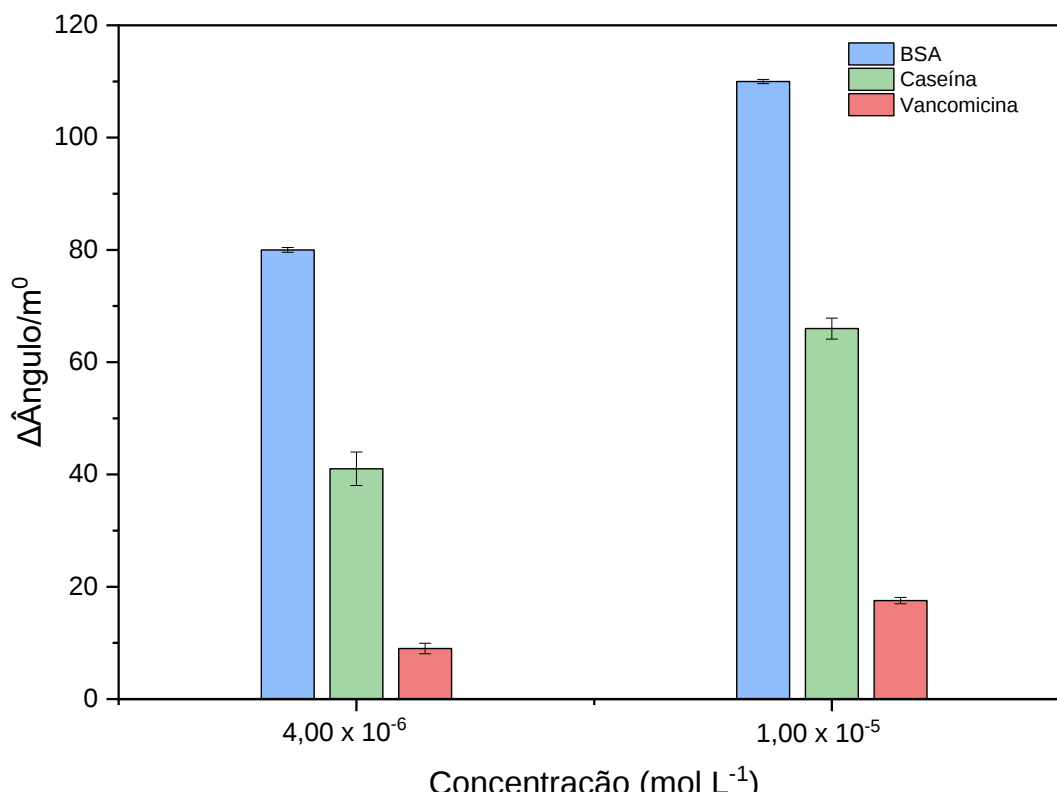


Figura 36. Resposta do sensor à BSA e aos interferentes caseína e vancomicina.

4.4. Quantificação da BSA numa amostra de leite bovino

Para testar a aplicabilidade do sensor ótico, procedeu-se à quantificação da BSA em amostras de leite bovino. Os resultados foram ainda comparados com um outro método analítico, o teste colorimétrico BCA (Figura 35). Para tal foi necessário fazer um pré-tratamento da amostra para separar a BSA das restantes componentes do leite, principalmente a caseína (tendo em conta os estudos da seletividade). Após o tratamento da amostra (Secção 3.6), procedeu-se à quantificação da BSA na amostra de leite. Os resultados obtidos (em triplicado) encontram-se representados na Tabela 13

Tabela 13. Concentração de BSA obtida através do sensor ótico e do teste colorimétrico BCA.

	Sensor ótico	Teste BCA
Concentração de BSA (M)	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(8,22 \pm 0,08) \times 10^{-5}$

Comparando os dois métodos de análise, pode-se observar que o sensor ótico mediu uma concentração ligeiramente maior de BSA em relação ao teste BCA. A diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos pode ser atribuída a várias razões, incluindo as características intrínsecas de cada método, como a sensibilidade, a seletividade, entre outros. Apesar de serem resultados ainda preliminares, há uma grande proximidade entre ambos os métodos, demonstrando assim o potencial do sensor ótico para ser utilizado em análise de controlo de qualidade do leite, de forma a proteger o consumidor contra reações alérgicas, podendo ser uma alternativa aos testes colorimétricos e técnicas cromatográficas. No entanto, é necessário realizar mais testes e experiências para avaliar outros parâmetros do sensor ótico (robustez, reprodutividade, efeito da matriz, entre outros) em diferentes condições e tipos de amostras.

5. Conclusões

A albumina do soro bovino (BSA) é um indicador da saúde da glândula mamária bovina e da qualidade do leite. Contudo, a BSA é considerada uma proteína alergénica e com riscos para o consumidor, sendo atualmente uma necessidade desenvolver novas metodologias alternativas aos métodos tradicionais, permitindo a quantificação da BSA de forma mais simples e rápida, económica, e com elevada seletividade.

A tecnologia de impressão molecular foi utilizada neste trabalho como uma abordagem inovadora e promissora para a deteção da BSA, uma vez que permite criar recetores estáveis e baratos. Para tal, foram sintetizadas nanopartículas esféricas de tamanho nanométrico (nanoMIPs) através de dois métodos de síntese, a polimerização por precipitação e a síntese em fase sólida.

Após a caracterização dos nanomateriais utilizando a técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), as NPs de impressão molecular obtidas pelo método de síntese de polimerização por precipitação demonstraram ser as que apresentaram o tamanho nanométrico desejado (entre 60 e 110 nm). Os valores de potencial zeta e de polidispersão confirmaram a boa estabilidade coloidal e a sua monodispersão. Por sua vez, os materiais obtidos pela síntese em fase sólida não foram utilizados para a construção do sensor, devido à formação de agregados em solução, tendo apresentado um tamanho maior e um potencial zeta abaixo do limite referência para se considerar uma boa estabilidade coloidal.

Na impressão molecular de proteínas, são inúmeras as vantagens da utilização de um epítipo de uma determinada proteína como molécula molde (em vez da proteína inteira), em termos de afinidade, desempenho e/ou custos de produção dos MIPs. Esta estratégia foi utilizada neste trabalho utilizando a sequência de aminoácidos 599-607 (VVSTQTALA como epítipo (E-nanoMIPs). Os resultados obtidos demonstraram que as partículas apresentavam um tamanho nanométrico (entre 55 e 62 nm), eram monodispersas ($PDI < 0,3$) e apresentaram valores de potencial zeta superiores +30 mV, confirmando a boa estabilidade coloidal das NPs em solução.

De modo a estudar a afinidade dos recetores sintetizados foi utilizada a técnica de ressonância de plasmão de superfície (SPR). Os resultados foram comparados com um anticorpo monoclonal com afinidade para a BSA, tendo-se realizado a imobilização com êxito. Após o passo da imobilização nos substratos de SPR, foi possível determinar o valor da constante de afinidade para cada um dos recetores através do modelo de Langmuir. Os E-nanoMIPs obtidos demonstraram uma elevada afinidade de ligação à

BSA ($K_D = 7,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), relativamente próxima à do anticorpo ($K_D = 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). O anticorpo natural apresentou maior afinidade para a BSA, com um valor de K_D cerca de uma ordem de grandeza superior à dos nanoMIPs e nanoNIPs. Contudo, é importante considerar as desvantagens associadas à sua utilização, como facto de serem mais caros, apresentarem uma baixa estabilidade em certas condições de pH e/ou temperatura, requerem cuidados especiais de utilização e armazenamento e devido sobretudo a questões éticas. Assim sendo, os E-nanoMIPs foram utilizados neste trabalho para a deteção da BSA.

Com o objetivo de preparar o sensor ótico para a deteção da BSA, primeiramente, foram otimizadas as condições experimentais de modo a aumentar a sua performance, nomeadamente através do tratamento da superfície para minimizar a adsorção não específica. Após os estudos, foi possível concluir que a utilização do tiol hidrofílico MCH na superfície do sensor e a adição do Tween 20 às soluções padrão e amostras foram fundamentais para minimizar a adsorção não específica. A regeneração da superfície do sensor foi conseguida utilizando uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (m/v), preparada em tampão acetato 0,010 mol L⁻¹, pH 4,0.

Após a otimização das condições experimentais, foram realizados estudos de deteção da BSA em PB, tendo-se estimados os parâmetros analíticos do sensor, tais como a sensibilidade, a zona de resposta linear e os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ). Além disso, o método apresentou uma sensibilidade de $4,27 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ e um limite de deteção (LOD) de $1,02 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de quantificação (LOQ) de $3,39 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Uma vez que a quantidade de BSA no leite é normalmente superior a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o sensor ótico produzido permitiu a deteção da BSA em amostras de leite. Os valores de recuperação obtidos encontram-se dentro do intervalo estabelecido (80-120%), variando de 97% a 103%, com um desvio padrão relativo (RSD) baixo (entre 1% e 4%).

Foram também realizados estudos de seletividade, um parâmetro importante para a aplicação prática do sensor em amostras complexas (como o leite, por exemplo). Apesar de o biossensor ter sido projetado para ser seletivo para a BSA, os resultados mostram que este também responde significativamente à caseína. Por outro lado, o sensor teve uma resposta pouco significativa à vancomicina.

De modo a testar a aplicabilidade do sensor, procurou-se em estudos preliminares determinar a concentração de BSA numa amostra de leite bovino. A concentração de BSA obtida pelo sensor ótico ($(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi muito próxima da obtida pelo teste BCA ($(8,22 \pm 0,08) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), utilizado como método de referência, o que

indica que o sensor ótico poderá vir a ser uma alternativa viável aos testes colorimétricos e cromatográficos atualmente utilizados para detetar a BSA no leite. Contudo, é necessário validar esses resultados repetindo e fazendo novas experiências em diferentes condições e tipos de amostras.

6. Trabalho Futuro

Neste trabalho foram utilizados dois métodos de síntese para a produção de nanoMIPs com afinidade para a BSA, a polimerização por precipitação e a síntese em fase sólida. Contudo, devido à escassez de tempo não foi possível a otimização necessária para obter bons resultados com a síntese em fase sólida. Este método de síntese, de acordo com a literatura, apresenta vantagens, sendo a principal a formação de locais de ligação homogêneos e de maior afinidade para a molécula molde. Assim, como trabalho futuro, será pertinente aplicar a receita que foi otimizada para a síntese de polimerização por precipitação, na síntese em fase sólida, sendo fundamental estudar as diferenças entre a silanização em meio aquoso e meio orgânico.

Seria também interessante, utilizar uma técnica analítica como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), devido à sua grande sensibilidade e capacidade de separação, para determinar a quantidade de BSA no leite de modo a comparar com os resultados obtidos com o sensor ótico fabricado.

No futuro, seria importante ainda explorar outras aplicações do sensor, tanto no controlo alimentar, como a deteção da BSA em leite pediátrico, como no diagnóstico biomédico, através da medição da BSA em amostras de soro e urina de pacientes alérgicos.

Para além disso, e devido à flexibilidade comprovada dos métodos de síntese, seria relevante produzir nanoMIPs com afinidade para outros compostos, tais como os contaminantes ambientais ou biomarcadores de doenças, e integrados em sensores com diferentes modos de transdução (eletroquímico, QCM, fluorescência, etc.) de modo a comprovar o potencial da IM no desenvolvimento de novos métodos de deteção para diversas aplicações.

7. Referências Bibliográficas

1. Jahanban-Esfahlan, A., et al., *Latest developments in the detection and separation of bovine serum albumin using molecularly imprinted polymers*. Talanta, 2020. **207**: p. 120317.
2. Indyk, H.E., B.D. Gill, and D.C. Woollard, *An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products*. International Dairy Journal, 2015. **47**: p. 72-78.
3. Jahanban-Esfahlan, A., et al., *Recent developments in the detection of bovine serum albumin*. Int J Biol Macromol, 2019. **138**: p. 602-617.
4. Papadopoulou, A., R.J. Green, and R.A. Frazier, *Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(1): p. 158-163.
5. Liu, R., et al., *Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin*. Science of The Total Environment, 2009. **407**(13): p. 4184-4188.
6. Zhao, L., et al., *New strategy for the evaluation of CdTe quantum dot toxicity targeted to bovine serum albumin*. Science of The Total Environment, 2009. **407**(18): p. 5019-5023.
7. Bujacz, A., *Structures of bovine, equine and leporine serum albumin*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2012. **68**(Pt 10): p. 1278-89.
8. Peters, T., Jr., *Serum albumin*. Adv Protein Chem, 1985. **37**: p. 161-245.
9. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of serum albumin*. Adv Protein Chem, 1994. **45**: p. 153-203.
10. Bärbel, L., J. Alfred, and F. Berndt, *An improved analytical approach for the determination of bovine serum albumin in milk*. Lait, 2005. **85**(3): p. 237-248.
11. Dorkó, Z., T. Verbić, and G. Horvai, *Selectivity in analytical chemistry: Two interpretations for univariate methods*. Talanta, 2015. **132**: p. 680-684.
12. Wulff, G., *Fourty years of molecular imprinting in synthetic polymers: origin, features and perspectives*. Microchimica Acta, 2013. **180**(15): p. 1359-1370.
13. Conroy, P.J., et al., *Antibody production, design and use for biosensor-based applications*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(1): p. 10-26.

14. Donahue, A.C. and M. Albitar, *Antibodies in Biosensing*, in *Recognition Receptors in Biosensors*, M. Zourob, Editor. 2010, Springer New York: New York, NY. p. 221-248.
15. Hock, B., M. Seifert, and K. Kramer, *Engineering receptors and antibodies for biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002. **17**(3): p. 239-249.
16. North, J.R., *Immunosensors: Antibody-based biosensors*. *Trends in Biotechnology*, 1985. **3**(7): p. 180-186.
17. Zeng, X., Z. Shen, and R. Mernaugh, *Recombinant antibodies and their use in biosensors*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **402**(10): p. 3027-3038.
18. BelBruno, J.J., *Molecularly Imprinted Polymers*. *Chemical Reviews*, 2019. **119**(1): p. 94-119.
19. Guerreiro, A.R., et al., *Selection of imprinted nanoparticles by affinity chromatography*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**(8): p. 2740-2743.
20. Holthoff, E.L. and F.V. Bright, *Molecularly templated materials in chemical sensing*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **594**(2): p. 147-161.
21. Pap, T., V. Horvath, and G. Horvai, *Molecularly imprinted polymers for analytical chemistry*. *Chemia Analityczna*, 2005. **50**: p. 129-137.
22. Svenson, J. and I.A. Nicholls, *On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **435**(1): p. 19-24.
23. Subrahmanyam, S., et al., *Optimisation of experimental conditions for synthesis of high affinity MIP nanoparticles*. *European Polymer Journal*, 2013. **49**(1): p. 100-105.
24. Cheong, W.J., S.H. Yang, and F. Ali, *Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews*. *Journal of Separation Science*, 2013. **36**(3): p. 609-628.
25. Refaat, D., et al., *Strategies for Molecular Imprinting and the Evolution of MIP Nanoparticles as Plastic Antibodies-Synthesis and Applications*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(24).

26. Piletsky, S.A., N.W. Turner, and P. Laitenberger, *Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics--future potential and existing problems*. Med Eng Phys, 2006. **28**(10): p. 971-7.
27. Mostafa, A.M., et al., *Review on molecularly imprinted polymers with a focus on their application to the analysis of protein biomarkers*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021. **144**: p. 116431.
28. Rebelo, P., et al., *Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis*. Biosensors and Bioelectronics, 2021. **172**: p. 112719.
29. Cao, Y., et al., *Recent advances of molecularly imprinted polymer-based sensors in the detection of food safety hazard factors*. Biosensors and Bioelectronics, 2019. **141**: p. 111447.
30. Mazzotta, E., T. Di Giulio, and C. Malitesta, *Electrochemical sensing of macromolecules based on molecularly imprinted polymers: challenges, successful strategies, and opportunities*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022. **414**(18): p. 5165-5200.
31. Chiappini, A., L. Pasquardini, and A.M. Bossi *Molecular Imprinted Polymers Coupled to Photonic Structures in Biosensors: The State of Art*. Sensors, 2020. **20**, DOI: 10.3390/s20185069.
32. Dinc, M., C. Esen, and B. Mizaikoff, *Recent advances on core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for biomacromolecules*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019. **114**: p. 202-217.
33. Ertürk, G. and B. Mattiasson, *Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors*. Sensors (Basel), 2017. **17**(2).
34. Guerreiro, A.R., et al., *Selection of imprinted nanoparticles by affinity chromatography*. Biosens Bioelectron, 2009. **24**(8): p. 2740-3.
35. Wulff, G., *Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers*. Chemical Reviews, 2002. **102**(1): p. 1-28.
36. Sellergren, B., B. Ekberg, and K. Mosbach, *Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers: Demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives*. Journal of Chromatography A, 1985. **347**: p. 1-10.

37. Norrlöw, O., M. Glad, and K. Mosbach, *Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates*. Journal of Chromatography A, 1984. **299**: p. 29-41.
38. Culver, H.R. and N.A. Peppas, *Protein-Imprinted Polymers: The Shape of Things to Come?* Chemistry of Materials, 2017. **29**(14): p. 5753-5761.
39. Cenci, L., et al., *Micro- versus nano-sized molecularly imprinted polymers in MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptides*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. **409**(26): p. 6253-6261.
40. Yaqub, S., U. Latif, and F.L. Dickert, *Plastic antibodies as chemical sensor material for atrazine detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011. **160**(1): p. 227-233.
41. Chen, H.-J., et al., *Surface-imprinted chitosan-coated magnetic nanoparticles modified multi-walled carbon nanotubes biosensor for detection of bovine serum albumin*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012. **163**(1): p. 76-83.
42. Cennamo, N., et al., *On the Effect of Soft Molecularly Imprinted Nanoparticles Receptors Combined to Nanoplasmonic Probes for Biomedical Applications*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. **9**.
43. Shi, Q., et al., *Bioactuators based on stimulus-responsive hydrogels and their emerging biomedical applications*. NPG Asia Materials, 2019. **11**(1): p. 64.
44. Xu, S., et al., *Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers: versatile functional materials*. Journal of Materials Chemistry C, 2013. **1**(29): p. 4406-4422.
45. Herrmann, A., R. Haag, and U. Schedler, *Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications*. Advanced Healthcare Materials, 2021. **10**(11): p. 2100062.
46. Oya, T., et al., *Reversible Molecular Adsorption Based on Multiple-Point Interaction by Shrinkable Gels*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1543-1545.
47. Chen, H., et al., *Bio-Inspired Imprinting Materials for Biomedical Applications*. Advanced Science, 2022. **9**(28): p. 2202038.

48. Halperin, A., M. Kröger, and F.M. Winnik, *Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research*. Angewandte Chemie International Edition, 2015. **54**(51): p. 15342-15367.
49. Hoshino, Y., et al., *Peptide Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(46): p. 15242-15243.
50. Chianella, I., et al., *Direct Replacement of Antibodies with Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles in ELISA—Development of a Novel Assay for Vancomycin*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(17): p. 8462-8468.
51. Ashley, J., et al., *Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for α -Casein Detection Using Surface Plasmon Resonance as a Milk Allergen Sensor*. ACS Sensors, 2018. **3**(2): p. 418-424.
52. McClements, J., et al., *Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles Enable Rapid, Reliable, and Robust Point-of-Care Thermal Detection of SARS-CoV-2*. ACS Sensors, 2022. **7**(4): p. 1122-1131.
53. Zhang, H., *Molecularly Imprinted Nanoparticles for Biomedical Applications*. Advanced Materials, 2020. **32**(3): p. 1806328.
54. Wackerlig, J. and R. Schirhagl, *Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(1): p. 250-261.
55. Wang, C., et al., *Preparation and Characterization of Molecularly Imprinted Polymeric Nanoparticles for Atrial Natriuretic Peptide (ANP)*. Adv Funct Mater, 2011. **21**(23): p. 4423-4429.
56. Yoshimatsu, K., et al., *Temperature-responsive "catch and release" of proteins by using multifunctional polymer-based nanoparticles*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(10): p. 2405-8.
57. Takeuchi, T., et al., *Molecularly Imprinted Nanogels Acquire Stealth In Situ by Cloaking Themselves with Native Dysopsonic Proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, 2017. **56**(25): p. 7088-7092.
58. Schirhagl, R., P.A. Lieberzeit, and F.L. Dickert, *Chemosensors for Viruses Based on Artificial Immunoglobulin Copies*. Advanced Materials, 2010. **22**(18): p. 2078-2081.

59. Poma, A., et al., *Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with a Reusable Template—“Plastic Antibodies”*. Advanced Functional Materials, 2013. **23**(22): p. 2821-2827.
60. Ambrosini, S., et al., *Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles for protein recognition*. Chemical Communications, 2013. **49**(60): p. 6746-6748.
61. Alanazi, K., et al., *Disposable paracetamol sensor based on electroactive molecularly imprinted polymer nanoparticles for plasma monitoring*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021. **329**: p. 129128.
62. Smolinska-Kempisty, K., et al., *New potentiometric sensor based on molecularly imprinted nanoparticles for cocaine detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2017. **96**: p. 49-54.
63. Canfarotta, F., et al., *A novel thermal detection method based on molecularly imprinted nanoparticles as recognition elements*. Nanoscale, 2018. **10**(4): p. 2081-2089.
64. Mazzotta, E., et al., *Solid-phase synthesis of electroactive nanoparticles of molecularly imprinted polymers. A novel platform for indirect electrochemical sensing applications*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. **229**: p. 174-180.
65. Guerreiro, A., et al., *Influence of Surface-Imprinted Nanoparticles on Trypsin Activity*. Advanced Healthcare Materials, 2014. **3**(9): p. 1426-1429.
66. Moczko, E., et al., *Epitope approach in molecular imprinting of antibodies*. Journal of Chromatography B, 2019. **1124**: p. 1-6.
67. Poma, A., et al., *Automatic reactor for solid-phase synthesis of molecularly imprinted polymeric nanoparticles (MIP NPs) in water*. RSC Advances, 2014. **4**(8): p. 4203-4206.
68. Altintas, Z., et al., *Comparative investigations for adenovirus recognition and quantification: Plastic or natural antibodies?* Biosensors and Bioelectronics, 2015. **74**: p. 996-1004.
69. Kushwaha, A., et al., *Epitope imprinting of Mycobacterium leprae bacteria via molecularly imprinted nanoparticles using multiple monomers approach*. Biosensors and Bioelectronics, 2019. **145**: p. 111698.

70. Xu, J., et al., *Toward a Universal Method for Preparing Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with Antibody-like Affinity for Proteins*. *Biomacromolecules*, 2016. **17**(1): p. 345-353.
71. Altintas, Z., et al., *NanoMIP based optical sensor for pharmaceuticals monitoring*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. **213**: p. 305-313.
72. Chiarello, M., et al. *NanoMIP-Based Solid Phase Extraction of Fluoroquinolones from Human Urine: A Proof-of-Concept Study*. *Separations*, 2021. **8**, DOI: 10.3390/separations8110226.
73. Tang, A.-n., et al., *An epitope imprinted polymer with affinity for kininogen fragments prepared by metal coordination interaction for cancer biomarker analysis*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016. **4**(46): p. 7464-7471.
74. Musile, G., et al., *Screening of the binding properties of molecularly imprinted nanoparticles via capillary electrophoresis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. **408**(13): p. 3435-3443.
75. Cecchini, A., et al., *In Vivo Recognition of Human Vascular Endothelial Growth Factor by Molecularly Imprinted Polymers*. *Nano Letters*, 2017. **17**(4): p. 2307-2312.
76. Ekpenyong-Akiba, A.E., et al., *Detecting and targeting senescent cells using molecularly imprinted nanoparticles*. *Nanoscale Horizons*, 2019. **4**(3): p. 757-768.
77. Canfarotta, F., et al., *Specific Drug Delivery to Cancer Cells with Double-Imprinted Nanoparticles against Epidermal Growth Factor Receptor*. *Nano Letters*, 2018. **18**(8): p. 4641-4646.
78. Liu, H., et al., *Capsule-like molecular imprinted polymer nanoparticles for targeted and chemophotothermal synergistic cancer therapy*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021. **208**: p. 112126.
79. Medina Rangel, P.X., et al., *Chemical Antibody Mimics Inhibit Cadherin-Mediated Cell–Cell Adhesion: A Promising Strategy for Cancer Therapy*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020. **59**(7): p. 2816-2822.
80. Bossi, A.M., *Plastic antibodies for cancer therapy?* *Nature Chemistry*, 2020. **12**(2): p. 111-112.

81. Yang, K., et al., *Epitope Imprinting Technology: Progress, Applications, and Perspectives toward Artificial Antibodies*. Advanced Materials, 2019. **31**(50): p. 1902048.
82. Teixeira, S.P.B., et al., *Epitope-imprinted polymers: Design principles of synthetic binding partners for natural biomacromolecules*. Science Advances. **7**(44): p. eabi9884.
83. Nishino, H., C.-S. Huang, and K.J. Shea, *Selective Protein Capture by Epitope Imprinting*. Angewandte Chemie International Edition, 2006. **45**(15): p. 2392-2396.
84. Khumsap, T., A. Corpuz, and L.T. Nguyen, *Epitope-imprinted polymers: applications in protein recognition and separation*. RSC Advances, 2021. **11**(19): p. 11403-11414.
85. Kausaite, A., et al., *Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2007. **35**(1): p. 57-63.
86. Topor, C.-V., M. Puiu, and C. Bala *Strategies for Surface Design in Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensing*. Biosensors, 2023. **13**, DOI: 10.3390/bios13040465.
87. Deng, S., P. Wang, and X. Yu, *Phase-Sensitive Surface Plasmon Resonance Sensors: Recent Progress and Future Prospects*. Sensors, 2017. **17**: p. 2819.
88. Nguyen, H.H., et al., *Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications*. Sensors (Basel), 2015. **15**(5): p. 10481-510.
89. Divya, J., et al., *Surface plasmon based plasmonic sensors: A review on their past, present and future*. Biosensors & Bioelectronics, 2022. **11**: p. 1-17.
90. D'Agata, R., N. Bellassai, and G. Spoto, *Exploiting the design of surface plasmon resonance interfaces for better diagnostics: A perspective review*. Talanta, 2024. **266**: p. 125033.
91. Balbinot, S., et al., *Plasmonic biosensors for food control*. Trends in Food Science & Technology, 2021. **111**: p. 128-140.
92. Narsaiah, K., et al., *Optical biosensors for food quality and safety assurance-a review*. J Food Sci Technol, 2012. **49**(4): p. 383-406.

93. Jay-Allemand, C., et al., *Detection of Biomolecules Using Surface Plasmon Resonance (SPR) Technology for Food Quality and Traceability*. 2017.
94. Silva, A.T., et al., *Imprinted Hydrogel Nanoparticles for Protein Biosensing: A Review*. ACS Sensors, 2023. **8**(8): p. 2898-2920.
95. Canfarotta, F., et al., *Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles*. Nature Protocols, 2016. **11**(3): p. 443-455.
96. Zhang, R., et al. *Precipitation Polymerization: A Powerful Tool for Preparation of Uniform Polymer Particles*. Polymers, 2022. **14**, DOI: 10.3390/polym14091851.
97. Yoshimatsu, K., et al., *Preparation of abiotic polymer nanoparticles for sequestration and neutralization of a target peptide toxin*. Nature Protocols, 2015. **10**(4): p. 595-604.
98. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 2016. **235**: p. 337-351.
99. Sennakesavan, G., et al., *Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties - A review*. Polymer Degradation and Stability, 2020. **180**: p. 109308.
100. Chen, L., et al., *Molecular imprinting: perspectives and applications*. Chemical Society Reviews, 2016. **45**(8): p. 2137-2211.
101. Arkles, B., et al., *Factors contributing to the stability of alkoxysilanes in aqueous solution*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1992. **6**(1): p. 193-206.
102. Kadirvel, P., et al., *A simpler and greener alternative route for anchoring carbohydrates with structural integrity on silica and glass supports*. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2022. **41**(6): p. 346-368.
103. Cruz, S.L., M.T. Rivera-García, and J.J. Woodward, *Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets*. J Drug Alcohol Res, 2014. **3**.
104. Altintas, Z., *Surface plasmon resonance based sensor for the detection of glycopeptide antibiotics in milk using rationally designed nanoMIPs*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 11222.

105. Foo, K.Y. and B.H. Hameed, *Insights into the modeling of adsorption isotherm systems*. Chemical Engineering Journal, 2010. **156**(1): p. 2-10.
106. Kalam, S., et al., *Surfactant Adsorption Isotherms: A Review*. ACS Omega, 2021. **6**(48): p. 32342-32348.
107. Al-Ghouti, M.A. and D.A. Da'ana, *Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review*. Journal of Hazardous Materials, 2020. **393**: p. 122383.
108. Hoshino, Y., et al., *Design of synthetic polymer nanoparticles that capture and neutralize a toxic peptide*. Small, 2009. **5**(13): p. 1562-8.
109. Liu, B., et al., *Design and mechanisms of antifouling materials for surface plasmon resonance sensors*. Acta Biomaterialia, 2016. **40**: p. 100-118.
110. Chen, Q., et al., *The impact of antifouling layers in fabricating bioactive surfaces*. Acta Biomaterialia, 2021. **126**: p. 45-62.
111. Sadiq, U., H. Gill, and J. Chandrapala, *Casein Micelles as an Emerging Delivery System for Bioactive Food Components*. Foods, 2021. **10**(8).
112. Martinez-Perdiguero, J., et al., *Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF α biomarker in human serum*. Talanta, 2014. **119**: p. 492-497.
113. Feng, X., et al., *Real Time Monitoring of On-Chip Coenzyme Regeneration with SPR and DPI*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(4): p. 2370-2376.
114. Shrivastava, A. and V. Gupta, *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. Chronicles of Young Scientists, 2011. **2**: p. 21.
115. Wang, Y. and T.-X. Wei, *Surface plasmon resonance sensor chips for the recognition of bovine serum albumin via electropolymerized molecularly imprinted polymers*. Chinese Chemical Letters, 2013. **24**(9): p. 813-816.
116. Valcárcel, M., A. Gómez-Hens, and S. Rubio, *Selectivity in analytical chemistry revisited*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2001. **20**(8): p. 386-393.
117. Stetefeld, J., S.A. McKenna, and T.R. Patel, *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*. Biophys Rev, 2016. **8**(4): p. 409-427.

118. Mudalige, T., et al., *Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges*, in *Nanomaterials for Food Applications*, A. López Rubio, et al., Editors. 2019, Elsevier. p. 313-353.
119. Lu, H.-T., *Synthesis and characterization of amino-functionalized silica nanoparticles*. Colloid Journal, 2013. **75**(3): p. 311-318.
120. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
121. Kruger, N.J., *The Bradford method for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 9-15.
122. Brenner, A.J. and E.D. Harris, *A Quantitative Test for Copper Using Bicinchoninic Acid*. Analytical Biochemistry, 1995. **226**(1): p. 80-84.

8. Anexos

Anexo 1 - Dispersão dinâmica de luz (DLS)

A técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS) permite obter informações sobre a distribuição de tamanho de partículas numa suspensão coloidal [98]. Esta técnica baseia-se na análise da forma como as partículas em suspensão dispersam a luz. Quando a luz do laser incide sobre as partículas em solução, ocorrem flutuações na intensidade da luz dispersada devido ao movimento Browniano das partículas. O movimento Browniano é o movimento aleatório e contínuo das partículas devido às colisões com as moléculas do solvente que as rodeiam e é influenciado pelo tamanho das partículas, onde as partículas menores movem-se mais rápido do que as partículas maiores. A autocorrelação dos dados de intensidade de luz é calculada e é então usada para extrair informações sobre a taxa de difusão das partículas, permitindo calcular o tamanho hidrodinâmico das partículas, através da equação de Stokes-Einstein (equação 4) [117]:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (4)$$

onde d_H representa o tamanho hidrodinâmico, k a constante de Boltzman, T a temperatura, η a viscosidade e D o coeficiente de difusão

Este equipamento permite ainda medir o potencial zeta (ζ), que é uma medida importante para entender a estabilidade e as interações de partículas coloidais em suspensão. Para além disso, a técnica de DLS ainda fornece informações sobre o índice de polidispersão (PDI) que permite medir a heterogeneidade de uma amostra com base no tamanho. A polidispersão pode ocorrer devido à distribuição do tamanho numa amostra (várias populações) ou à aglomeração ou agregação da amostra durante a análise [118].

Anexo 2 - Quantificação de APTMS imobilizado nas esferas de vidro

A ninidrina é uma substância química que reage com grupos amino primários ($-NH_2$), presentes no (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS), e forma um complexo de cor roxa cuja intensidade pode ser quantificada por espectrofotometria de UV/Vis. Assim sendo, a quantidade de complexo roxo formado está diretamente relacionada com a quantidade de APTMS presente na amostra. A absorvância pode ser medida a um comprimento de onda de 585 nm [119].

Para este trabalho, foi preparada uma solução de ninidrina de $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em etanol e foi colocada em agitação durante 30 minutos. Posteriormente, foram preparadas soluções padrão de APTMS entre 0,0375 e 0,75 mM em etanol ($V = 4,0 \text{ mL}$) e recolheu-se 1,5 g de esferas de vidro (em triplicado), após silanização, tendo-se adicionado 4,0 mL de etanol e foram colocadas no ultrassons durante 30 minutos. De seguida, adicionou-se 1,0 mL da solução de ninidrina preparada anteriormente tanto aos padrões como às amostras recolhidas (100 μL) após a silanização das esferas de vidro. Colocou-se novamente as soluções contendo ninidrina no ultrassons durante 10 minutos.

Por fim, as soluções foram retiradas do ultrassons e colocadas num banho de areia pré-aquecido a 100°C , durante 30 min. Após isso, foi medida a absorvância no espectrómetro (T70 UV/VIS, PG Instruments) (a um comprimento de onda de 585 nm dos padrões, permitindo obter uma curva de calibração para determinar a quantidade de APTMS imobilizado nas esferas de vidro, utilizando os dois solventes, água e tolueno anidro (Figuras 37, 38 e 39).



Figura 37. Espectrómetro T70 UV/VIS, PG Instruments

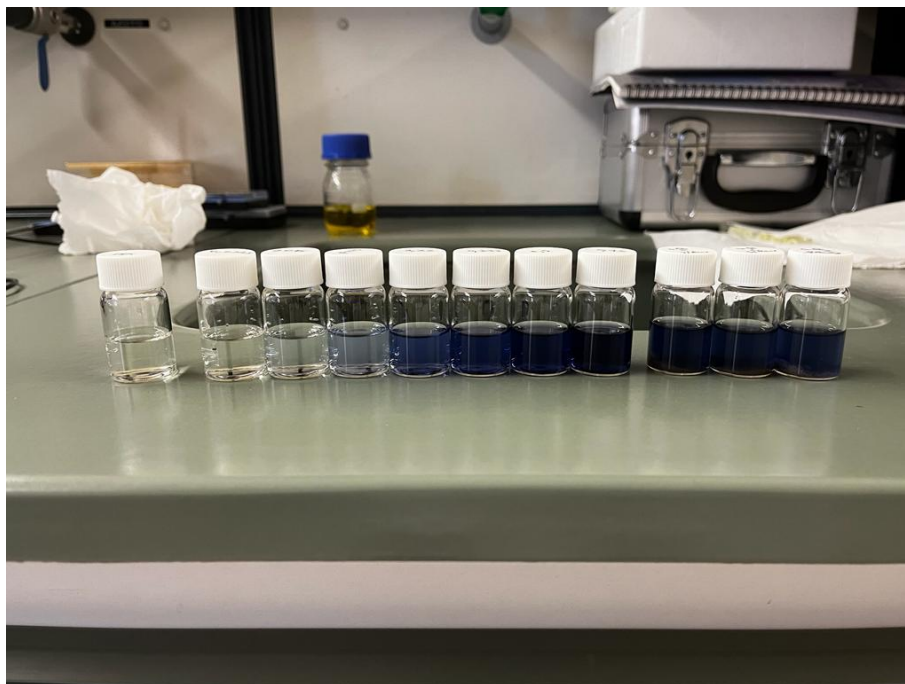


Figura 38. Determinação de silano (APTMS) com o teste da ninidrina

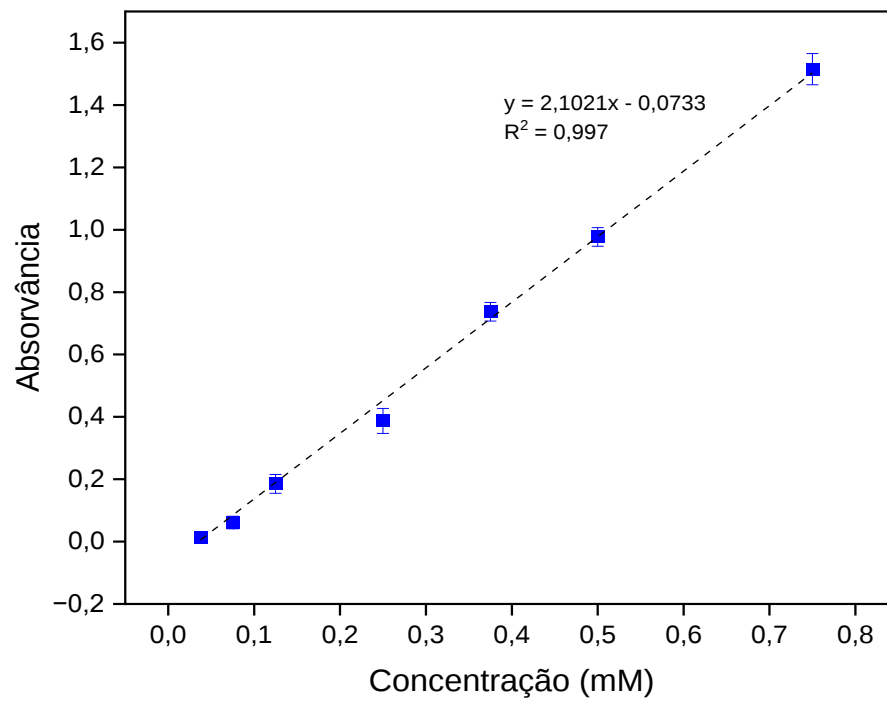


Figura 39. Curva de calibração – Teste da Ninidrina

Anexo 3 - Quantificação BSA imobilizada nas esferas de vidro

O teste de Bradford é uma técnica utilizada para determinar a concentração total de proteínas numa amostra e baseia-se na mudança de cor da solução devido à interação das proteínas com o reagente azul de *Coomassie*, que na sua forma não complexada apresenta uma coloração castanho-avermelhada. Por sua vez, a presença de proteínas leva à formação de complexos e resulta numa mudança na cor do reagente, tornando-o azul. A intensidade da coloração azul, diretamente proporcional à quantidade de proteínas presente na amostra, podendo ser quantificada medindo a absorvância da solução a cerca de 465-595 nm [120, 121].

Para este trabalho, foram preparadas soluções padrão de BSA entre os 0,20 e 0,90 mg mL⁻¹. Foram pipetados 0,050 mL de cada solução padrão e amostras recolhidas (solução de BSA antes e após a imobilização da proteína nas esferas de vidro) e adicionou-se a 1,5 mL de reagente azul de *Coomassie* (Figura 40). As soluções ficaram a incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos e posteriormente foi medida a absorvância das soluções a 585 nm. A curva de calibração obtida permitiu determinar a quantidade de BSA imobilizada nas esferas de vidro por diferença da concentração de BSA em solução antes e após a imobilização (Figura 41).



Figura 40. Determinação da quantidade de BSA utilizando o teste de Bradford.

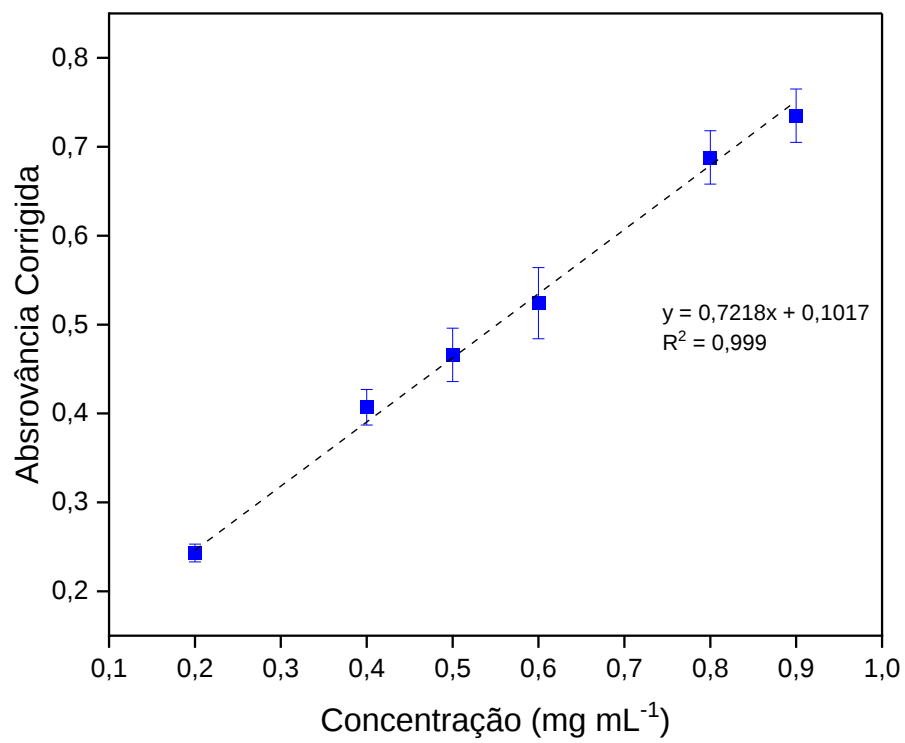


Figura 41. Curva de calibração - Teste Bradford

Anexo 4 - Teste BCA para a quantificação da BSA

O kit comercial BCA contém o ácido bicinconínico (BCA) e iões de cobre (Cu^{2+}). Quando este reagente é misturado com proteínas, num ambiente alcalino, ocorre uma reação na qual as proteínas reduzem os iões de cobre (Cu^{2+}) a iões de cobre (Cu^{1+}) que reagem com ácido bicinconínico para formar um complexo roxo. A intensidade da cor roxa é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra e pode ser determinada por espectrofotometria UV/VIS a um comprimento de onda aproximadamente de 562 nm [122].

Para tal, foi utilizado o kit de ensaio BCA Pierce™, da Thermo Fisher e foram preparadas soluções padrão da BSA entre os 5,0 e os 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (em PB 0,010 mol L⁻¹ pH 7,4). Posteriormente, o reagente de trabalho foi preparado fazendo uma mistura de 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de cada solução padrão e amostras a 2 mL do reagente de trabalho. Foram realizados estudos em triplicado.

As soluções foram incubadas num banho de areia a 37 °C durante 30 minutos. Após esse passo, arrefeceram-se as soluções à temperatura ambiente. Finalmente, foi medida a absorvância a 562 nm de todos os padrões e amostras num curto espaço de tempo (<10 minutos) . As amostras foram diluídas em PB para a deteção (Figura 42).

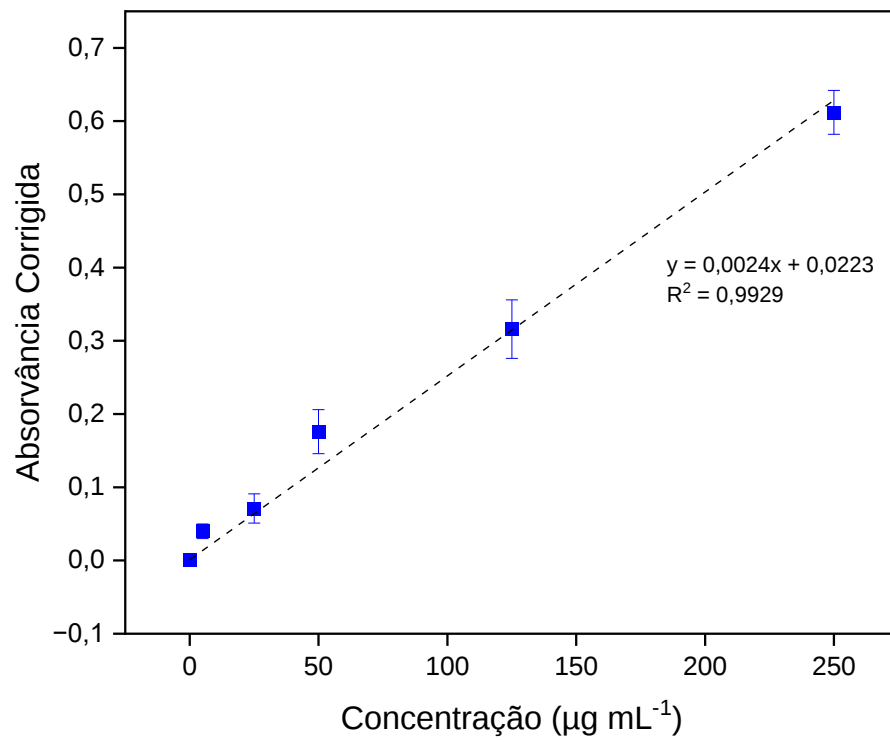


Figura 42. Curva de calibração - Teste BCA