

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Ana Eliza Guerra Diniz

**ANTICORPOS SINTÉTICOS PREPARADOS A PARTIR DE EPÍTOPO DO VÍRUS
SARS-COV-2 ATRAVÉS DA ELETROFIAÇÃO REATIVA**

Belo Horizonte
2024

Ana Eliza Guerra Diniz

**ANTICORPOS SINTÉTICOS PREPARADOS A PARTIR DE EPÍTOPO DO VÍRUS
SARS- COV-2 ATRAVÉS DA ELETROFIAÇÃO REATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice

Belo Horizonte

2024

D585a

Diniz, Ana Eliza Guerra.

Anticorpos sintéticos preparados a partir de epítopo do vírus SARS-CoV-2 através da eletrofiação reativa [recurso eletrônico] / Ana Eliza Guerra Diniz. – 2024.

1 recurso online (99 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Rodrigo Lambert Oréfice.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Anexos: f. 98-99.

Bibliografia: f. 90-97.

1. Materiais – Teses. 2. Ciência dos materiais – Teses. 3. Anticorpos sintéticos de cadeia única – Teses. 4. Polímeros na medicina – Teses. 5. Eletrofiação – Teses. 6. SARS-CoV-2 – Teses. I. Oréfice, Rodrigo Lambert, 1968-. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 620(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica, Materiais e de Minas



A dissertação intitulada "**Anticorpos Sintéticos Preparados a Partir de Epítipo do Vírus Sars- CoV-2 através da Eletrofiação Reativa**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pela candidata **Ana Eliza Guerra Diniz**, para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

Dr. Rodrigo Lambert Oréfice
Orientador (UFMG)

Dr. Herman Sander Mansur
(UFMG)

Dr. Diego Oliveira Miranda
(UFMG)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 19 de abril de 2024

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua generosidade em me conceder a vida, o amor e os meios para eu estar onde estou.

Ao meu marido Lucas por estar do meu lado me apoiando com todo amor e paciência do mundo.

Às minhas filhas Maria Tereza e Esther, por serem minha maior motivação para seguir adiante.

Aos meus pais Beatriz e Jorceli e aos meus sogros Niselma e Alceu, por cuidarem de Maria Tereza nas minhas ausências.

Ao meu orientador Prof. Rodrigo Oréfice, pela oportunidade, compreensão e dedicação, minha gratidão.

À Andreia Grossi, por ser um anjo que me acompanhou ao longo de todo esse processo.

Ao Diego Oliveira Miranda, pela ajuda com a câmara de radiação UV, pelo treinamento no eletrofiador.

Ao Ricardo de Oliveira, pelas análises térmicas e FTIR, além de toda ajuda com as diversas demandas que eu apresentei.

À Vanessa do ICB, pelos epítomos construídos para o projeto e pelo entusiasmo pelo projeto.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom), por cada ajuda e partilha.

Ao prof. Herman Mansur, Beatriz Senra e todo o grupo do Projeto COVID-19 UFMG pelas contribuições e motivação.

À CAPES, à FAPEMIG e ao CNPQ, pelo incentivo e pelo apoio financeiro à pesquisa desenvolvida.

A todas as pessoas que contribuíram para a minha formação acadêmica direta e indiretamente.

RESUMO

A identificação de patógenos de alto risco, como o SARS-CoV-2, é de grande ajuda no diagnóstico rápido para prevenção e combate a pandemias. “Anticorpos sintéticos” desenvolvidos através de polímeros impressos com moléculas biológicas podem fornecer uma alternativa atraente em comparação aos anticorpos naturais baseados em proteínas (por exemplo, imunoglobulinas) sob condições adversas e extremas, sendo resistentes a variações de pH, temperatura e solventes orgânicos. O objetivo deste trabalho foi produzir “anticorpos sintéticos” baseados no epítipo do vírus SARS-CoV-2 como nanofibras biofuncionalizadas para testar a hipótese de que a elevada área superficial das nanofibras impressas com o epítipo SARS-CoV-2 melhoraria a capacidade de detecção do anticorpo sintético. Para tanto, um peptídeo epítipo SARS-CoV-2 (J5) foi desenhado, simulado através de ferramentas de bioinformática (*in silico*), e sintetizado como molécula modelo para impressão. Polímeros impressos por epítipos (EIP) baseados em J5 e Polímeros Não Impressos (NIPs) foram preparados com redes poliméricas derivadas de comonômeros de acrilamida e ácido acrílico na forma de amostras “*bulk*” e fibras eletrofiadas. A albumina sérica bovina também foi utilizada como molécula modelo para a preparação de polímeros de impressão molecular (MIP) para servir como sistema de controle. As nanofibras eletrofiadas EIP foram obtidas usando-se uma configuração de eletrofiação reativa que permite a fotopolimerização e a formação de fibras simultâneas. Imagens MEV, resultados de espectroscopia infravermelha e testes de intumescimento foram realizados, mostrando que amostras “*bulk*” EIP, MIP, NIP e nanofibras eletrofiadas foram obtidas com sucesso. Testes de religação, nos quais os EIPs, MIPs e NIPs obtidos foram colocados em contato com as moléculas alvo, mostraram que os anticorpos sintéticos obtidos poderiam interagir de forma mais eficiente com as moléculas alvo do que a amostra NIP correspondente. Além disso, a capacidade de religação (Q) de EIP e MIP como nanofibras eletrofiadas mostrou maior capacidade de interação com as moléculas alvo, ou seja, J5 e albumina, respectivamente, do que os mesmos polímeros impressos como amostras “*bulk*” (Q foi $11923 \pm 1762 \mu\text{g/g}$ quando o epítipo SARS-CoV-2 foi impresso em nanofibras, enquanto Q foi $6065 \pm$

755 $\mu\text{g/g}$ para amostras “*bulk*” com as mesmas impressões de epítopo). Os resultados obtidos sugerem que os anticorpos sintéticos baseados na impressão de epítopos em fibras eletrofiadas possuem graus de afinidade e especificidade suficientemente altos para serem considerados candidatos promissores para serem aplicados no projeto de biossensores mais estáveis e acessíveis e outras ferramentas de diagnóstico para doenças, como COVID19.

Palavras-chave: polímeros com impressão molecular; epítopo; eletrofição reativa; SARS-CoV-2; anticorpo sintético.

ABSTRACT

The identification of high-risk pathogens, such as SARS-CoV-2, is of great assist in rapid diagnosis for preventing and fighting against pandemics. Developed “synthetic antibodies” through polymers imprinted with biological molecules can provide an attractive alternative compared to natural antibodies based on proteins (e.g., immunoglobulins) under adverse and hash conditions, being resistant to variations in pH, temperature, and organic solvents. The objective of this work was to produce “synthetic antibodies” based on the SARS-CoV-2 epitope as biofunctionalized nanofibers to test the hypothesis that the high surface area of nanofibers imprinted with SARS-CoV-2 epitope would improve the capability of detection of the synthetic antibody. To this end, a SARS-CoV-2 epitope peptide (J5) was designed, simulated through bioinformatics tools (*in silico*), and synthesized as a model molecule for imprinting. Epitope-imprinted polymers (EIP) based on J5 and Non-Imprinted Polymers (NIPs) were prepared with polymeric networks derived from acrylamide and acrylic acid comonomers in the form of bulk samples and electrospun fibers. Bovine serum albumin was also used as a model molecule for the preparation of molecular imprinted polymers (MIP) to serve as a control system. EIP electrospun nanofibers were obtained using a reactive electrospinning setup that allows the simultaneous photopolymerization and fiber formation. SEM images, infrared spectroscopy results, and swelling tests were performed, showing that EIP, MIP, NIP bulk samples, and electrospun nanofibers were successfully obtained. Rebinding tests, in which the obtained EIPs, MIPs and NIPs were put in contact with the target molecules, showed that the obtained synthetic antibodies could interact more efficiently with the target molecules than the corresponding NIP sample. Moreover, the rebinding capacity (Q) of EIP and MIP as electrospun nanofibers showed higher capabilities of interacting with the target molecules, i.e., J5 and albumin, respectively, than the same imprinted polymers as bulk samples (Q was $11923 \pm 1762 \mu\text{g/g}$ when SARS-CoV-2 epitope was imprinted in nanofibers, while Q was $6065 \pm 755 \mu\text{g/g}$ for bulk samples with the same epitope imprints). The obtained results suggest that synthetic antibodies based on imprinting epitopes on electrospun fibers have high enough degrees of affinity and

specificity to be considered promising candidates to be applied in the design of more stable and accessible biosensors and other diagnostic tools for diseases, such as COVID19.

Keywords: molecularly imprinted polymers; epitope; reactive electrospinning; SARS-CoV-2; synthetic antibody

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Ilustração da síntese de MIP e suas cavidades específicas para a molécula alvo. Adaptado de LEITÃO (2014).	24
Figura 3.2 Estrutura molecular dos reagentes de ligação cruzada (TARLEY <i>et al.</i> , 2005).	28
Figura 3.3 Figura 3. Estrutura molecular dos iniciadores radicalares mais comuns na síntese do MIP (TARLEY <i>et al.</i> , 2005).	30
Figura 3.4 – Espectro de infravermelho do hidrogel poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (REN, J. <i>et al.</i> , 2023).	31
Figura 3.5 Representação esquemática de um MIP de epítipo (modificado de Rachkov e Minoura, 2001)	37
Figura 3.6 Ilustração das alterações que o MIP pode sofrer durante a remoção da partícula alvo. Adaptado de LORENZO <i>et al.</i> (2011).	39
Figura 3.7 Representação da heterogeneidade das cavidades formadas no MIP (BUI <i>et al.</i> , 2010).	41
Figura 3.8 Relação entre taxa de intumescimento e razão de monômeros (a) e diagrama de intumescimento do hidrogel poli(AM-co-AAc) (b). Editado. (REN, J. <i>et al.</i> , 2023).	43
Figura 3.9 Ilustração das cargas parciais do SARS-CoV-2 (PAWŁOWSKI, 2021)....	46
Figura 3.10 Configuração simples de eletrofiação reativa. Feito pela autora.	47
Figura 3.11 Representação do efeito da umidade relativa do ar no diâmetro da fibra: a) para polímeros hidrossolúveis, b) para polímeros hidrofóbicos. Adaptado de MAILLEY; HÉBRAUD; SCHLATTER, (2021)	49
Figura 3.12 Fibras e filme de PVP eletrofiados em etanol com umidades relativas do ar em (a) 20%, b) 30%, c) 45% e 60% a 20°C. MAILLEY; HÉBRAUD; SCHLATTER, (2021).....	50

Figura 4.1 Esquema ilustrativo da produção dos hidrogéis de MIP na forma de bloco (polimerização em massa) e nanofibras (eletrofiação).....	52
Figura 4.2 Fluxograma de procedimento experimental.	53
Figura 4.3 Exemplo da identificação das amostras.	56
Figura 4.4 Síntese das amostra tipo <i>bulk</i> MIP (A) e nanofibras MIP (B). Feito pela autora.	58
Figura 4.5 Eletrofiador com câmara de radiação UV acoplado. Feito pela autora. ...	59
Figura 4.6 Suposição da formação de ligações éster entre os grupos hidroxilas do PVA e carboxilas do AAc.....	60
Figura 5.1 Síntese dos MIPs e NIPs pelo processo de polimerização em <i>bulk</i> . A) Purga com gás nitrogênio, B) fotopolimerização em câmara de radiação UV, C) após polimerização.	64
Figura 5.2 MIP BSA B1:AM50 após polimerização por UV. A) Antes da secagem, B) após secagem.	64
Figura 5.3 Formação do EIP de J5.....	65
Figura 5.4 Formação do MIP de BSA.....	66
Figura 5.5 Imagens MEV de amostras EIP B:AM20 (A, B, C), B:AM50 (D, E, F) e B:AM80 (G, I, J) em ampliações de 300, 1000 e 5000 vezes.....	67
Figura 5.6 – Imagens obtidas por MEV para as amostras NIP B1:AM20 (A, B, C), B2:AM50 (D, E, F) e B3:AM80 (G, I, J) em aumentos de 300, 1000 e 5000 vezes...	68
Figura 5.7 Ensaio de intumescimento de MIP e NIP B:AM50 com 10%EGDA m/m como reticulante. Feito pela autora.	69
Figura 5.8 Ensaio de intumescimento de MIPs de BSA B:AM50 com variações na concentração de reticulante EGDA entre 10 a 30% m/m. Feito pela autora.	70
Figura 5.9 Grau de intumescimento com as amostras MIP e NIP variando-se a composição de acrilamida em 20, 50 e 80% m/m e contendo reticulante PEGDA 10% m/m. Feito pela autora.	71

Figura 5.10 Amostras <i>bulk</i> com PEGDA como reticulante, MIP (de albumina) e EIP de J5 e NIP com acréscimo de 10%PVA m/m. Feito pela autora.....	72
Figura 5.11 Espectros no infravermelho das amostras <i>bulk</i> AM20, AM50 e AM80, das amostras sem ácido acrílico e sem acrilamida (PAM e PAAc) e do reticulante PEGDA.	75
Figura 5.12. Capacidades de religação (Q) de amostras em massa MIP e EIP.....	79
Figura 5.13 O efeito do tempo na religação do J5 no EIP (amostras em massa impressas no J5).	80
Figura 5.14 Síntese dos MIPs e NIPs pelo processo de polimerização por eletrofição reativa. A) Eletrofiador com câmara de radiação UV acoplada, B) Manta de MIP eletrodepositada em papel alumínio, C) Manta de NIP eletrodepositada em papel alumínio. Feito pela autora.	81
Figura 5.15 Amostra Nf:AM50:PVA por microscopia óptica. Sem aquecimento prévio. Umidade relativa do ar em 63%. Ampliação 100X.	81
Figura 5.16 Amostra Nf:AM50:PVA por microscopia óptica. Com aquecimento prévio da solução. Umidade relativa do ar em 32%. Ampliação 500X.	82
Figura 5.17: Imagens MEV e distribuição de tamanho das fibras obtidas	83
Figura 5.18: Espectros infravermelho de fibras das amostras Nf:AM50:PVA:J5, Nf:AM50:PVA:BSA, Nf:AM50:PVA NIP e PVA puro.	85
Figura 5.19: Capacidades de religação (Q) de amostras de nanofibras.	87
Figura I.1.: Curva de calibração para a albumina em solução aquosa ($\lambda=278$ nm)...	98
Figura I.2.: Curva de calibração para a albumina em solução metanol:ácido acético (70:30 v/v) ($\lambda=278$ nm).	98
Figura II.1.: Curva de calibração o J5 em solução aquosa ($\lambda=275$ nm, segundo pico de maior intensidade).	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Monômeros tipicamente usados no preparo de MIP, com estrutura molecular e tipo de interação com a molécula modelo (TARLEY <i>et al.</i> , 2005).....	25
Tabela 3.2 Tipos de interações não covalentes na síntese de MIPs: modelos esquemáticos, exemplos e energia de ligação (adaptado de YILMAZ; SCHIMIDT; MOSBACH, 2005).....	26
Tabela 4.1 Tabela de amostras com a variação da relação Am:AAc e da relação entre MF:MM, em que 'MM' representa molécula modelo (albumina ou epítipo J5).	56
Tabela 4.2 Monitoramento da extração da MM dos MIPs pela polimerização em <i>bulk</i> e em nanofibras.....	62
Tabela 5.1 – Número de onda em espectros FTIR referentes a este trabalho.....	73
Tabela 5.2 Valores médios de concentração de eluente (Co, Ct), capacidade de religação das amostras MIP, EIP e NIP (Q) e fator de impressão para cada uma das amostras <i>bulk</i>	79
Tabela 5.3 Valores de concentração do eluente (Co, Ct), capacidade de religação das amostras EIP, MIP e NIP (Q) e fator de impressão para cada uma das amostras eletrofiadas.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAc	Ácido acrílico
AIBN	2,2-azo-bis-isobutironitrila
Am	Acrilamida
B	Concentração de ligação
BSA	Albumina sérica bovina
C_0	Concentração inicial
C_t	Concentração restante
COVID-19	Doença de Coronavírus 2019
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
EIP	Polímero impresso por epítopo
EIS	Impedância eletroquímica
F	Concentração de alvo livre
FTIR	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier
IF	Fator de impressão
J5	Epítopo da proteína Spike do Coronavírus
M	Massa
MAA	Ácido metacrílico
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MIP	Polímero molecularmente impresso
MM	Molécula modelo
n_{alvo}	Número de mols do alvo usados no experimento
NIP	Polímero não impresso
PET	Poli(etileno tereftalato)

pH	Potencial de hidrogênio
PVA	Poli(álcool vinílico)
Q	Quantidade de religação
Q _{MIP}	Quantidade de religação do MIP
Q _{NIP}	Quantidade de religação do NIP
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa
UV	Ultravioleta
v	Volume
2-VP	2- vinil-piridina
4-VP	4-vinil-piridina
α	Fator de seletividade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Anticorpos sintéticos	22
3.2 Polímero Molecularmente Impresso	22
3.2.1 Histórico, Reagentes e Síntese	22
3.2.2 Caracterização	30
3.2.3 Desafios envolvidos na técnica de MIPs	35
3.2.4 HidroMIPS	42
3.3 Interação proteína e MIP	44
3.4 Eletrofição	46
3.4.1 Defeitos nas fibras.....	48
3.4.2 Fibras de MIPs	50
4. METODOLOGIA.....	52
4.1 Etapas do procedimento experimental.....	52
4.2 Reagentes	54
4.3 Síntese.....	55
4.3.1 Solução de epítipo J5.....	55
4.3.2 Composição das soluções	55
4.3.3 Rota de polimerização em <i>bulk</i> de MIPs de poli(acrilamida-co-ácido acrílico)	56
4.3.4 Amostras eletrofiadas carregadas por PVA	58
4.4 Caracterização.....	60
4.4.1 Intumescimento	60
4.4.2 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR).....	61
4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
4.5 Extração da molécula molde dos MIPs de albumina e dos EIP de epítipo J5	61

4.6 Ensaio de religação de BSA/J5	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Síntese e resultado da polimerização em <i>bulk</i> de MIP e NIP	64
5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
5.1.2 Intumescimento	69
5.1.3 Espectroscopia infravermelho das amostras <i>bulk</i>	73
5.2 Ensaio de religação de BSA	76
5.3 Resultado das mantas eletrofiadas.....	80
5.3.1 Síntese e resultado das mantas eletrofiadas de MIP e NIP	80
6. CONCLUSÕES	88
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9. ANEXO I.....	98
ANEXO II.....	99

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento molecular baseia-se na existência de interações atrativas específicas entre duas moléculas, representado por um molde e uma molécula modelo (FOKOUÉ *et al.*, 2020). Na natureza, é encontrado nas interações específicas entre anticorpo e antígeno, inspirando estudos de reconhecimento molecular importantes para o planejamento e desenvolvimento de entidades químicas que modulem uma partícula de interesse que geralmente é cara e apresenta baixa resistência a ambientes adversos nos quais moléculas naturais não resistiriam (BISSANTZ *et al.*, 2010; RICARDO TEIXEIRA TARLEY; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR LAURO TATSUO KUBOTA, 2005).

O desenvolvimento de sensores a partir do reconhecimento molecular é uma alternativa promissora no combate à doenças como a associada a COVID-19, causada pelo patógeno Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). Atualmente, a técnica diagnóstica de referência para a determinação de vírus é a análise em tempo real da Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR) que requer equipamentos, reagentes e instalações especializadas e normalmente leva de 3 a 4 h para a conclusão dos testes. Uma via alternativa que forneça resultados com diagnósticos simples, de baixo custo, de pequeno porte, rápidos e no local de atendimento tornou-se uma prioridade global (CENNAMO *et al.*, 2021).

Inspirado nos sistemas de reconhecimento antígeno-anticorpo natural, conhecido como sistema “fechadura e chave” de ligação seletiva com uma molécula molde-alvo (HASSEB *et al.*, 2022), inúmeros trabalhos estão sendo publicados envolvendo impressão molecular para analitos diversos e, em especial, para o diagnóstico de COVID-19, como os listados na revisão dos autores Goud *et al.*, (2021).

Os MIPs, do inglês “Molecularly Imprinted Polymers”, são polímeros sintetizados a partir de monômeros que interagem em torno de uma molécula alvo que atua como modelo. Após a polimerização dos monômeros funcionais juntamente com a molécula modelo, dentre outros componentes, e após a remoção do modelo, é obtida uma impressão no polímero em formato de cavidades (WULFF, 2013, MOSTAFA *et al.*, 2021). As cavidades são tridimensionais e são complementares à molécula modelo em tamanho, forma e disposição dos grupos funcionais e são capazes de reconhecer seletivamente a molécula modelo. As vantagens são: excelente estabilidade química e térmica, fabricação reproduzível e econômica (RAZIQ *et al.*, 2021).

A escolha da molécula alvo para a impressão molecular com o objetivo de detecção de doenças infecciosas virais pode partir de proteínas/peptídeos do vírus (GOUD *et al.*, 2021 *apud* PASHCHENKO, 2018). A impressão molecular a partir de proteínas é um desafio, pois proteínas podem sofrer mudanças conformacionais durante a fase de impressão, além da desnaturação mediante variação de temperatura e/ou pH e terem natureza hidrofílica diferente da maioria dos polímeros aplicados na formação de MIPs (RAMANAVICIUS *et al.*, 2021). A fim de resolver tais problemas, foi introduzida a abordagem de epítipo, onde um pequeno segmento de peptídeo pertencente à estrutura da proteína alvo (geralmente a sequência C-terminal) é usado no procedimento de impressão. Os EIPs (*epitope imprinted polymers*) produzidos serão capazes de reconhecer esta sequência na molécula de proteína inteira com maior grau de seletividade e ligação não específica mínima (MOSTAFA *et al.*, 2021).

A morfologia obtida para o EIP depende inevitavelmente da forma de processamento do polímero, sendo que os EIPs produzidos por método convencional de polimerização em massa sofrem de baixa capacidade de adsorção e baixas taxas de transferência de massa. A união da tecnologia EIP com eletrofiação para produzir micro/nanofibras com reconhecimento específico é extremamente atraente, pois as nanofibras são boas candidatas para adsorção e filtração devido à sua alta permeabilidade, grande área de superfície e pequeno tamanho de poro. Além disso, as nanofibras eletrofiadas são fáceis de montar, modificar e processar em diferentes

aplicações, como o caso de EIPs em sensoriamento. No entanto, os parâmetros de processamento precisam ser bem estudados e ajustados para a abordagem de EIP (PATEL *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2012).

Os EIPs, pela técnica de impressão molecular, são uma alternativa robusta para os biossensores, uma vez que estes utilizam moléculas biológicas como micro-organismos, anticorpos ou enzimas para o reconhecimento molecular durante análises de diagnóstico, monitoramento ambiental ou processamento alimentar, enquanto os EIPs, como sensores biomiméticos, atuam de forma similar dispensando o uso de moléculas biológicas. A ausência de moléculas biológicas na aplicação de EIPs traz vantagens como economia na etapa de descoberta e purificação de candidatos naturais para o biossensor, além da aplicação em variados pHs, temperaturas ou presença de solventes orgânicos (YANO *et al.*, 1999)

Este trabalho visa a utilização da abordagem de eletrografia reativa para o projeto de um EIP com impressão de epítomos da proteína de SARS-CoV-2. Espera-se que esse polímero seja capaz de realizar o reconhecimento da proteína do SARS-CoV-2, retendo-as pelas regiões de epítomos impressos no EIP, de forma a ser parte importante na manufatura de sensores voltadas para a detecção desse agente viral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver e caracterizar um polímero molecularmente impresso (MIP) baseado em poli(acrilamida-co-ácido acrílico) por meio de eletrofiação reativa para o reconhecimento molecular de epítomos da proteína do vírus SARS-CoV-2 para aplicação em diagnóstico de COVID19.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de MIP para a albumina e o EIP de epítopo do vírus SARS-CoV-2 (J5) por polimerização em “*bulk*”. Caracterizar as propriedades obtidas.
- Obtenção de EIP de epítopo do vírus SARS-CoV-2 (J5) pela técnica de eletrofiação reativa. Caracterizar as propriedades obtidas.
- Avaliar a etapa da lavagem do MIP, incluindo o tipo e a concentração da solução de lavagem e o número de ciclos, verificando a remoção completa do molde, garantindo que os locais de ligação dos MIPs não estão comprometidos.
- Comparar o MIP e o EIP com o NIP em termos de capacidade de religação (Q), indicando a capacidade de religação para as amostras em “*bulk*” e em nanofibras.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Anticorpos sintéticos

Os anticorpos naturais são biomacromoléculas com capacidade de reconhecimento específico de uma molécula-alvo, chamada antígeno. Essa tecnologia de afinidade e especificidade, pelo encaixe perfeito do antígeno no sítio de ligação do anticorpo enquanto outras estruturas intimamente relacionadas não são reconhecidas, garante aplicações em imunoenaios, biossensores e bioimagem, por exemplo (HAUPT *et al.*, 2020).

Por serem proteínas, os anticorpos naturais possuem uma série de desvantagens em seu uso, desde a restrição à variação de temperatura, pH e solventes orgânicos até os altos custos de produção em larga escala. Como alternativa, os polímeros molecularmente impressos, materiais quimicamente mais estáveis, com uma espinha dorsal conectada à monômeros com grupos funcionais devidamente selecionados para a interação com a molécula-alvo, são apelidados de anticorpos sintéticos ou “imitadores de anticorpos” (HAUPT *et al.*, 2020).

3.2 Polímero Molecularmente Impresso

3.2.1 Histórico, Reagentes e Síntese

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) são materiais com o princípio de reconhecimento molecular em sua estrutura, originado pela presença de uma molécula modelo que interage com o(s) monômero(s) funcional(is) presentes durante a síntese, seguido pelo processo de extração da molécula modelo, expondo cavidades tridimensionais capazes de reconhecer seletivamente a molécula modelo (RAZIQ *et al.*, 2021). Apesar do atual uso em polímeros, o conceito de impressão molecular se

iniciou com os estudos de sílicas como matrizes seletivas para cromatografia, datado de 1937 por Polyakov e outros pesquisadores (WULFF, 2013). O uso de polímeros sintéticos com impressão molecular é relatado no início da década de 1970 por Wulff, após cerca de 20 anos sem grandes contribuições na área de sílicas molecularmente impressas (HUANG *et al.*, 2014). As pesquisas com MIPs são crescentes desde então, com aplicações em diversas áreas, como o uso em produção de sensores, extração em fase sólida (SPE), cromatografia, liberação de medicamentos, entre outros (YUSTE *et al.*, 2019).

A síntese de um MIP é constituída tipicamente por quatro tipos de reagentes, a saber: (1) o monômero funcional, que é a unidade de formação básica de todo polímero e que neste caso será criteriosamente escolhido afim de possuir grupos funcionais compatíveis com a molécula modelo; (2) o reticulante, responsável por interligar as cadeias poliméricas durante a síntese, fornecendo estabilidade mecânica após a extração da molécula modelo; (3) o iniciador da reação, que pode ser um iniciador radicalar, por radiação ultravioleta ou por temperatura, eletropolimerização ou outros de acordo com o tipo de polimerização; (4) o solvente porogênico, responsável pela dissolução dos reagentes e por favorecer uma estrutura porosa. A molécula modelo deixará impresso no polímero as cavidades que serão utilizadas para uma futura ligação (MOSTAFA *et al.*, 2021), conforme ilustra a Fig. 3.1.

A fim de comparar a afinidade das ligações formadas nas cavidades seletivas, um polímero não impresso (NIP) é produzido com os mesmos reagentes e método de síntese, com a exceção da presença da molécula modelo.

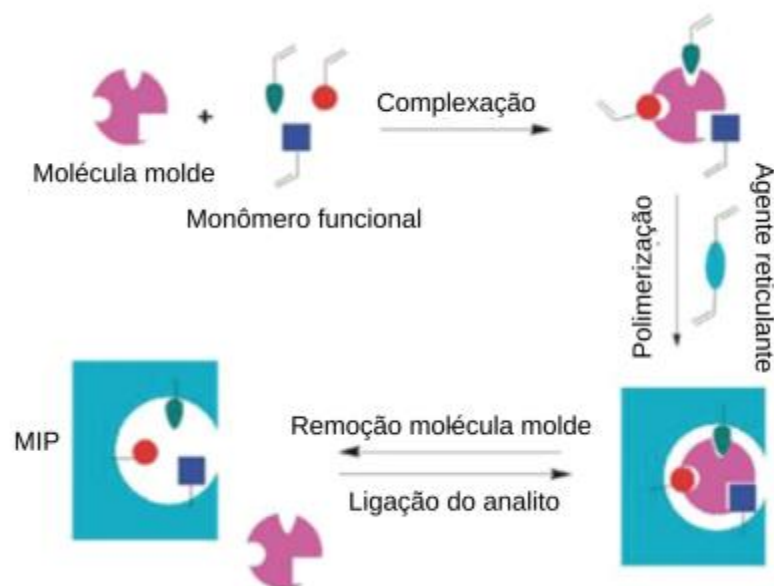


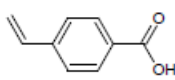
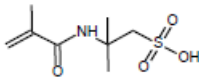
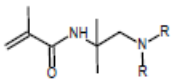
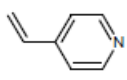
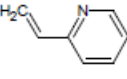
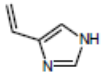

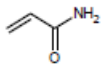


Figura 3.1 Ilustração da síntese de MIP e suas cavidades específicas para a molécula alvo. Adaptado de LEITÃO (2014).

Na síntese de um MIP, o monômero escolhido, podendo ser mais de um ou mesmo ser sintetizado um monômero específico para uma molécula modelo, fornecerá os grupos funcionais adequados para a interação com a molécula modelo, além de garantir o posicionamento correto do modelo dentro da matriz polimérica. Geralmente é adicionado em excesso (1:4 ou 1:8) para garantir a formação do complexo MF-MM (monômero funcional-molécula modelo), pois por se tratar de uma reação de equilíbrio químico, a maior concentração de monômeros desloca o equilíbrio para o sentido de consumir esses monômeros (MOSTAFA *et al.*, 2021).

A tabela 3.1 apresenta os monômeros funcionais mais usados na síntese de MIPs. As primeiras linhas tratam de monômeros de carácter ácido, seguidos por monômeros de carácter básico. Os monômeros são capazes de ceder a ligação dupla C=C para o crescimento da cadeia polimérica, a polimerização por adição. E simultaneamente, eles podem interagir com a molécula modelo por interação iônica pela desprotonação (monômeros ácidos), por interação do tipo ligação de hidrogênio ou transferência de cargas e coordenação com metais (monômeros básicos) (TARLEY *et al.*, 2005).

Tabela 3.1 Monômeros tipicamente usados no preparo de MIP, com estrutura molecular e tipo de interação com a molécula modelo (TARLEY *et al.*, 2005).






Monômero funcional	Nome do monômero	Tipo de interação com o <i>template</i>
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido meta-acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido acrilamidosulfônico	Interação iônica
	Amino metacrilamida	Interação iônica
	4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	4-Vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	1-Vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio

As possíveis interações entre monômeros e molécula molde são:

Interações não covalentes: Os monômeros funcionais e a molécula modelo formarão um complexo pré-polimerizável por meio de interações não covalentes que são relativamente fracas, como interações do tipo ligação de hidrogênio, ligações iônicas, interações de forças de van der Waals e efeito hidrofóbico. A escolha dos monômeros para a formação de ligações não covalentes com a molécula modelo são mais flexíveis, além de serem mais semelhantes com as interações biomoleculares, por

serem não covalentes, caso o sistema MIP queira simular interações do tipo enzima-substrato (WHITCOMB *et al.*, 1995). Esta abordagem é de longe a mais utilizada para a preparação de MIPs. O procedimento experimental é bastante simples e uma grande variedade de monômeros capazes de interagir com quase qualquer tipo de molde estão disponíveis comercialmente. Algumas desvantagens são oriundas do fato de que as interações molécula molde-monômero são governadas por um processo de equilíbrio. Assim, a fim de deslocar o equilíbrio para a formação do complexo molde-monômero, uma grande quantidade de monômero é utilizada. Conseqüentemente, o excesso de monômeros livres é incorporado aleatoriamente à matriz polimérica levando à formação de sítios de ligação não seletivos (TURIEL *et al.*, 2010).

Tabela 3.2 Tipos de interações não covalentes na síntese de MIPs: modelos esquemáticos, exemplos e energia de ligação (adaptado de YILMAZ; SCHIMIDT; MOSBACH, 2005)

Tipo de interação	Modelo	Exemplo	Energia de ligação (kJ.mol ⁻¹)
Eletrostática		$-\text{NH}_3^+ \cdots \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	Até ~ 60
Ligação de Hidrogênio		$\text{>N-H} \cdots \text{O=C<}$	Até ~ 40
Íon-dipolo		$-\text{NH}_3^+ \cdots \begin{array}{c} \text{H}^{\delta-} \\ \text{O} \\ \text{H}^{\delta+} \end{array}$	Até ~ 8
Dipolo-dipolo		$^+ \text{H-Cl}^- \cdots ^+ \text{H-Cl}^-$	~ 1
van der Waals		$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}^{\delta+} \cdots \text{CH}_2^{\delta-} \\ \vdots \\ \text{H}_2\text{C}^{\delta-} \cdots \text{CH}_2^{\delta+} \end{array}$	0,1 - 1

Interações covalentes: Os monômeros podem ser acoplados covalentemente à partícula de impressão antes da polimerização, exigindo assim uma síntese química antes da síntese do MIP em si. Após a polimerização, a molécula de impressão é removida por clivagem das ligações covalentes correspondentes, que são reformadas após a religação do analito. A alta estabilidade da interação molde-monômero leva a uma população bastante homogênea de sítios de ligação, minimizando a existência

de sítios não específicos. No entanto, a dificuldade de se projetar um complexo molécula molde-monômero apropriado no qual a formação de ligações covalentes e a clivagem são prontamente reversíveis sob condições brandas torna essa abordagem bastante restritiva (BUI *et al.*, 2010; TURIEL *et al.*, 2010).

Junção dos 2 tipos de interação: Uma opção intermediária é a abordagem semi-covalente. Neste caso, a molécula molde também está ligada covalentemente a um monômero funcional, mas a religação do molde é baseada apenas em interações não covalentes. (TURIEL, 2010 *apud* SELLERGREEN *et al.*, 1990). Neste caso, são utilizados monômeros com grupos funcionais que apresentam interações de mais de um tipo com a partícula alvo (BUI *et al.*, 2010). Alguns tipos de interações podem ser observados na tabela 1.

No caso de impressão covalente, amidas ou ésteres de ácido acrílico ou ácido metacrílico são mais frequentemente empregados, onde os moldes são ligados às porções vinílicas do monômero. No entanto, no caso de impressão não covalente, monômeros vinílicos semelhantes podem ser usados se contiverem grupos funcionais que possam interagir com o molde por ligações de hidrogênio. Um monômero muito popular é o ácido metacrílico (MAA), que é considerado um monômero universal devido às suas características duplas de doador e aceptor de ligações de hidrogênio. Juntamente com MAA, ácido acrílico (AA), acrilamida (Am) e vinil-piridinas (2-VP e 4-VP) são outros monômeros comumente usados que podem interagir com uma ampla variedade de moléculas moldes (MOSTAFA, 2021).

A otimização da concentração de um monômero é igualmente importante para a escolha de seu tipo. A associação entre o monômero e o molde é controlada por um equilíbrio, portanto é preferível adicionar o monômero funcional em excesso para favorecer a formação do complexo. No entanto, é importante mencionar que muito monômero também resulta na formação de múltiplos sítios de ligação heterogêneos, o que por sua vez reduz a seletividade. Portanto, é importante alcançar a razão molar

ótima, que na verdade difere de acordo com a natureza da molécula molde (MOSTAFA, 2021 *apud* TIWARI *et al.*, 2016).

Sobre o agente de ligação cruzada: um agente de ligação cruzada é a espinha dorsal da rigidez estrutural, que por sua vez permite que os MIPs preservem sua memória da molécula molde após sua remoção. O reticulador escolhido deve ter uma reatividade semelhante ao monômero funcional, isso garante que nenhum deles irá polimerizar predominantemente e que a polimerização é aleatória com distribuição uniforme de resíduos funcionais. Em segundo lugar, a concentração de reticulante não deve ser muito baixa, pois isso reduz a estabilidade mecânica dos polímeros resultantes, além disso, os locais de ligação ficarão localizados muito próximos uns dos outros, o que inibirá a ligação eficiente. Por outro lado, a maior concentração de reticulante reduz o número de sítios de ligação por unidade de massa de MIPs (YAN *et al.*, 2006). A Fig. 3.2 ilustra a estrutura dos reagentes de ligação cruzada mais comuns na síntese do MIP, como o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) (TARLEY *et al.*, 2005)

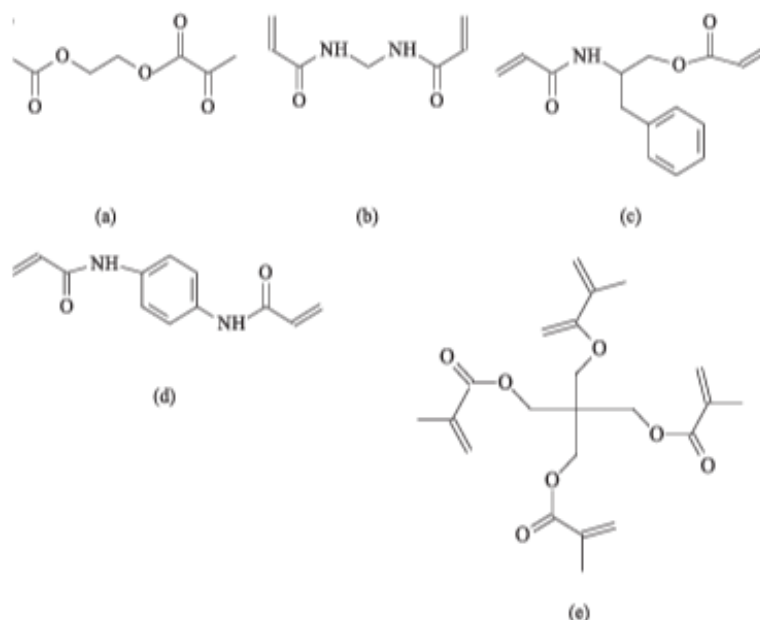


Figura 3.2 Estrutura molecular dos reagentes de ligação cruzada (TARLEY *et al.*, 2005).

(a) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA); (b) N,N'-metileno-bis-acrilamina; (c) N,O-bisacrilóila-L-fenilalaninol; (d) N,N'-fenilendiacrilamida e (e) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) (TARLEY *et al.*, 2005).

Sobre o solvente porogênico: na maioria dos casos, a mistura de polimerização contém um solvente inerte, que é necessário não apenas para dissolver todos os reagentes e, em particular, a molécula de impressão, mas também para gerar uma estrutura altamente porosa que permite a eluição da molécula de impressão e para o analito acessar os locais impressos (HAUPT *et al.*, 2000 *apud* YILMAZ *et al.*, 2000). Os solventes devem promover a formação de ligações entre molde e monômero. Os solventes mais comuns na síntese de MIPs são o clorofórmio, a acetonitrila, o tetrahidrofurano e o tolueno. Já a água é uma escolha ruim de solvente na impressão não covalente, pois rompe as ligações de hidrogênio entre o molde e o monômero (MOSTAFA *et al.*, 2021).

Sobre o iniciador radicalar: o iniciador radicalar é o reagente que fornece radicais livres para prosseguir a polimerização. Já a técnica de iniciação radiante utiliza a radiação ionizante, como a radiação de raios X, de raios gama, de ultravioleta, como fonte de energia externa necessária para iniciar o processo de síntese de polímeros. Uma grande vantagem do uso da técnica de polimerização por iniciação radiante é que as reações ocorrem a temperatura de 24°C. (MANO *et al.*, 2004). Alguns agentes oxidantes têm sido aplicados como iniciadores em trabalhos recentes, principalmente uma mistura de um agente oxidante forte e um acelerador, como persulfato de potássio e mistura de bissulfito de sódio (MOSTAFA, 2021 *apud* ZHAI *et al.*, 2020). Em todos os casos, o oxigênio dissolvido na mistura de reação deve ser removido antes da polimerização simplesmente purgando o gás inerte, como nitrogênio ou hélio. (MOSTAFA, 2021). Uma vez iniciada a polimerização, o crescimento da cadeia se desenvolve conforme a cinética do sistema. A Fig. 3.3 ilustra a estrutura dos iniciadores radicalares mais comuns na síntese do MIP, sendo o AIBN (2,2-azo-bis-isobutironitrila) o mais utilizado (TARLEY *et al.*, 2005).

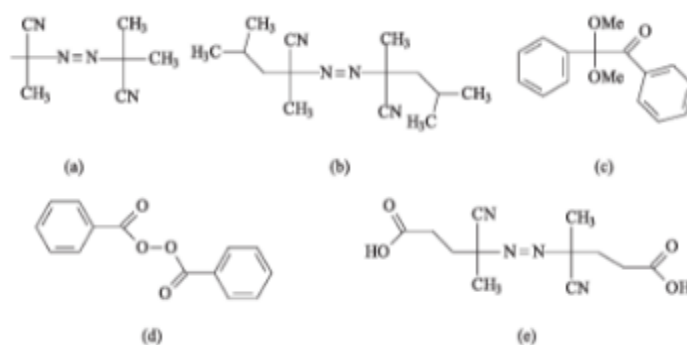


Figura 3.3 Figura 3. Estrutura molecular dos iniciadores radiculares mais comuns na síntese do MIP (TARLEY *et al.*, 2005).

(a) 2,2-azo-bis-isobutironitrila (AIBN), (b) azo-bis-dimetrilvaleronitrila (ABDV); (c) dimetilcetal de benzila; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis-(4-cianciano pentaenóico) (TARLEY *et al.*, 2005).

3.2.2 Caracterização

As análises de caracterização fornecem informações importantes sobre o MIP sintetizado de forma a prever sua funcionalidade e explicar fenômenos observados. As caracterizações morfológica, química, térmica e funcional são descritas a seguir.

Caracterização morfológica: a microscopia eletrônica é uma técnica muito popular para determinar a forma, geometria e tamanho dos MIPs. A microscopia eletrônica de varredura e a microscopia eletrônica de transmissão são geralmente usadas para comparar a morfologia dos MIPs aos NIPs ou a morfologia dos MIPs antes e depois da remoção do molde (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* BARCELO *et al.*, 2019 e DE MIDDELEER *et al.*, 2016). A microscopia eletrônica pode mostrar agregados de partículas que, se fossem analisados por técnicas de difração de laser ou dispersão dinâmica da luz poderiam ser interpretados como partículas grande ao invés de aglomerados de partículas, apesar das técnicas de difração de laser e dispersão dinâmica da luz fornecerem dados mais precisos, como tamanho médio, área de

superfície média e distribuição de tamanho (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* DE MIDDELEER *et al.*, 2016).

Caracterização química: FTIR é uma técnica espectroscópica útil que é muito popular na caracterização de MIPs. FTIR é um método útil em relação à análise de grupos funcionais; portanto, é usado para garantir a polimerização completa de MIPs. Ao comparar os espectros de monômeros de partida e molde com os espectros de MIPs, os pesquisadores podem detectar a ausência de grupos funcionais envolvidos na polimerização, como grupos vinil nos espectros de MIPs (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* BOYSEN *et al.*, 2019). Ren e colaboradores (2023) estudaram a adição de ácido acrílico em hidrogel de acrilamida e afirmaram que a adição de AA à mistura reacional leva à emergência de um pico de absorção característico em 1559 cm^{-1} pela superposição do grupo C=O do grupo amida e do grupo carboxila dos reagentes acrilamida e ácido acrílico, respectivamente.

O espectro de infravermelho apresentado por Ren e colaboradores (2023) com os grupos químicos indicativos em cada vale de transmitância está representado na Figura 3.4.

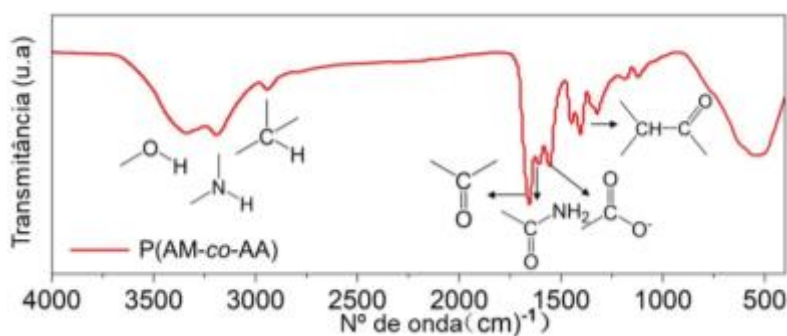


Figura 3.4 – Espectro de infravermelho do hidrogel poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (REN, J. *et al.*, 2023).

Espectroscopia UV-vis: a espectroscopia UV-visível é um método amplamente utilizado na caracterização química e estudos de pré-polimerização. É um método fácil e rápido que pode ser usado para estudar a ligação formada entre o molde e o

monômero em estudos de pré-polimerização (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* SVENSON *et al.*, 2005). Além disso, é uma excelente ferramenta para garantir a lavagem completa de MIPs, analisando a solução de lavagem quanto à presença de partícula alvo. Além disso, a espectroscopia UV-vis é o principal método usado em experimentos de religação para detectar e quantificar a partícula alvo ou moléculas competidoras em soluções sobrenadantes (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* MATTIASSON *et al.*, 2015).

A incidência de luz com comprimentos de onda referentes à região do espectro visível e a região próximo ao ultravioleta é capaz de promover ou excitar elétrons das moléculas da amostra exposta para orbitais de maior energia. O espectrômetro óptico marca as transições registrando o comprimento de onda absorvido pela amostra, gerando espectro com bandas próximas ao comprimento de onda em que há transição (REUSCH, 2013).

Na espectroscopia UV-Vis, pode-se determinar absorvidade molar como na Equação 1:

$$\varepsilon = \frac{A}{cL} \quad (\text{eq. 1})$$

em que A é absorbância, c é a concentração [mol.L⁻¹] e L o caminho ótico [cm]. Para uma mesma espessura do absorvedor (caminho ótico), quanto maior o valor de ε maior a sensibilidade do método. A absorvidade molar (ε) depende da substância, do comprimento de onda utilizado, da temperatura e do solvente (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

A relação entre a luz incidente, luz absorvida, concentração e caminho ótico pode ser feita pela equação de Beer-Lambert (Equação 2):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad (\text{eq. 2})$$

sendo ϵ absorvidade molar [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$], L o caminho ótico [cm] e c a concentração [$mol \cdot L^{-1}$];

Caracterização funcional: a caracterização funcional ou testes de religação são experimentos realizados para investigar as propriedades de ligação dos MIPs desenvolvidos. Esses testes visam medir a ligação ao alvo em fatores quantificáveis por meio de certas fórmulas matemáticas. Além disso, estima-se a ligação a analitos competitivos que são semelhantes em estrutura à partícula alvo ou que podem coexistir com ela na mesma matriz. Métodos analíticos como espectrometria UV-vis ou LC-MS são usados para monitorar o resultado de experimentos de ligação (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* MATTIASSON *et al.*, 2015). Dentro da caracterização funcional existem as caracterizações por afinidade de ligação, seletividade de ligação, cinética de ligação e isothermas de ligação, a seguir.

Afinidade de ligação: Para calcular a afinidade de ligação, é realizado um experimento de religação, no qual incuba-se um certo peso de MIPs ou NIPs com volume específico de solução com partícula alvo por um determinado período até atingir o equilíbrio.

Métodos analíticos, como espectrometria UV, são usados para determinar a concentração restante na solução após a ligação. A seguinte equação (eq. 3) é usada para calcular a afinidade de ligação para MIPs e NIPs:

$$Q = \frac{C_0 - C_t}{m} v \quad (\text{eq. 3})$$

Onde, Q é a quantidade de religação, C_0 é a concentração inicial, C_t é a concentração restante após o equilíbrio, m é a massa do polímero usado no experimento de religação e v é o volume da solução alvo adicionada. Observe que v e m devem ser os mesmos em ambos os experimentos para MIPs e NIPs.

Quanto maior o valor de Q, maior a afinidade de ligação. No entanto, o valor de Q para MIPs deve ser sempre maior que o de NIPs, devido à seletividade de MIPs para o alvo em comparação com a ligação não específica de NIPs.

Seletividade de ligação: MIPs tendem a ter diferentes sítios de ligação não específicos. Portanto, é essencial estimar a seletividade dos MIPs desenvolvidos para a partícula alvo para garantir que a ligação não específica não seja um problema. Um método para estudar a seletividade de ligação é comparar a ligação de MIPs com a ligação de NIPs. Esta comparação confirma a presença de sítios de ligação específicos em MIPs para o alvo que estão ausentes em NIPs. O fator de impressão (IF) é um parâmetro calculado que é definido como a razão entre a quantidade de adsorção (Q) de MIPs e a de NIPs para um determinado analito sob um conjunto específico de condições.

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (\text{eq. 4})$$

Da equação (2), o valor de IF deve ser maior que 1; quanto maior o valor de IF maior é a diferença entre MIPs e NIPs, o que por sua vez comprova a presença de sítios de ligação seletiva em MIPs.

No entanto, a comparação com os NIPs pode não ser a melhor maneira de garantir a seletividade dos MIPs. Isso pode ser atribuído a dois motivos principais. Em primeiro lugar, a estrutura de NIPs tende a ser mais compacta devido à ausência de molde durante a polimerização, portanto, o número de grupos funcionais de ligação livre disponíveis é, por natureza, menor do que MIPs. Em segundo lugar, um estudo publicado mostrou que durante a otimização da síntese de MIPs, a composição ótima de MIPs que tem a maior capacidade de ligação corresponde a NIPs que também se ligam fortemente ao alvo (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* BAGGIANI *et al.*, 2012).

Uma melhor forma de estimar a seletividade é comparar a ligação do alvo aos MIPs com a ligação a um analito competitivo sob condições experimentais idênticas.

Aqui, é calculado um fator chamado fator de seletividade (α) para cada analito concorrente testado em experimentos de ligação (eq.5).

$$\alpha = \frac{\text{QMIP partícula alvo}}{\text{QNIP analito concorrente}} \quad (\text{eq. 5})$$

O fator de seletividade (α) deve ter valor superior a 1; os altos valores de α para diferentes concorrentes testados são prova numérica da seletividade dos MIPs.

3.2.3 Desafios envolvidos na técnica de MIPs

Algumas escolhas devem ser bem estudadas antes da síntese de MIP para determinada partícula alvo, a fim de se evitar erros e baixa eficiência. O tamanho da partícula alvo, principalmente se for uma proteína; o tipo de monômero para determinado alvo; problemas na extração da partícula alvo, a liberação da partícula alvo discriminadamente (sangramento), além da heterogeneidade dos sítios de ligação são alguns pontos a serem discutidos a seguir.

Tamanho de partícula alvo (em especial, proteínas): Considerando-se os problemas experimentais associados ao uso de espécies biológicas infecciosas, como vírus, como molde durante a etapa de polimerização, a impressão de fragmentos é uma das estratégias mais interessantes e atraentes. Neste caso, para a preparação de MIPs com reconhecimento seletivo para um vírus alvo, uma proteína ou um peptídeo (isto é, um fragmento de uma proteína relevante) pode ser usado como um modelo em vez do vírus real (FRESCO-CALA *et al.*, 2021)

A impressão de proteínas na matriz polimérica não é uma tarefa fácil. O grande peso molecular das proteínas variando de alguns Daltons a milhares de kilo Daltons dificulta a difusão das moléculas de proteína através da estrutura polimérica altamente reticulada, o que resulta em uma cinética de ligação muito lenta. Além disso, o grande peso molecular também pode impedir a remoção eficiente do molde após a síntese de MIPs causando o fenômeno de sangramento do molde e reduzindo a eficiência de ligação. Também ocorre que as proteínas têm baixa solubilidade em solventes orgânicos, que são comumente usados na impressão molecular e são, por natureza, sensíveis às condições extremas necessárias para a polimerização radical, como temperaturas elevadas e pHs diferentes. Portanto, a impressão de proteínas precisa ser realizada em condições semelhantes às suas condições fisiológicas naturais, não apenas para evitar sua degradação, mas também para manter sua integridade conformacional (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* CHEN *et al.*, 2011).

As proteínas têm diferentes sítios de reconhecimento em sua superfície, incluindo aminoácidos carregados e regiões hidrofílicas ou hidrofóbicas, que podem reduzir a seletividade e aumentar a reatividade cruzada com qualquer outra molécula de proteína contendo regiões ou cargas semelhantes. (CHEN *et al.*, 2012). Devido ao tamanho das proteínas, uma alta razão molar de ligante/proteína é necessária, com proporções de 2000:1 comumente observadas (SULLIVAN *et al.*, 2019).

A polimerização em massa é considerada a escolha menos popular para a impressão de proteínas. Isso é atribuído ao fato de que proteínas em solução têm múltiplas variações conformacionais que podem resultar em uma ampla gama de sítios de ligação e ligações não seletivas. Além disso, o uso de solventes porogênicos polares favoráveis às proteínas podem reduzir a força das ligações de hidrogênio entre o molde e o monômero, resultando em eficiência de ligação reduzida (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* CHEN *et al.*, 2011).

A fim de resolver os problemas associados à impressão de proteínas, foi introduzida uma abordagem de epítipo. Em 2001, Rachkov e Minoura (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* RACHKOV *et al.*, 2001) introduziu a abordagem de epítipo como uma nova forma de impressão de proteínas. Nesta abordagem, um pequeno segmento peptídico é conduzido a partir da grande estrutura da proteína molde (geralmente a sequência C-terminal) e é usado no procedimento de impressão. Desta forma, os MIPs produzidos serão capazes de reconhecer esta sequência em toda a molécula de proteína com maior grau de seletividade e mínima ligação não específica. Uma sequência não inferior a 9 aminoácidos é escolhida a partir do C-terminal de uma proteína molde. O motivo da escolha do C-terminal é que ele é menos propenso a modificações pós-processamento, o que aumenta a chance de seu reconhecimento na amostra pelos MIPs desenvolvidos. A abordagem de epítipo é uma alternativa atraente para a impressão de modelos de proteínas volumosas (como imunoglobulinas) que oferece as vantagens de seletividade, alta afinidade e sensibilidade. Além disso, esse método é muito econômico, pois evita o uso de proteínas autênticas de alta pureza que podem ser muito caras. No entanto, encontrar o epítipo adequado para a impressão de proteínas é um procedimento complexo e requer conhecimento das conformações das proteínas para prever a estrutura exata do segmento peptídico produzido (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* NISHINO *et al.*, 2006; BAGÁN *et al.*, 2017; MOCZKO *et al.*, 2019).

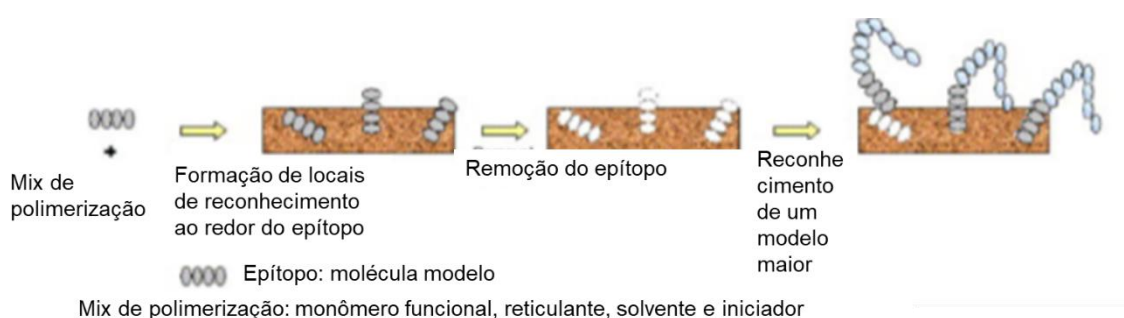


Figura 3.5 Representação esquemática de um MIP de epítipo (modificado de Rachkov e Minoura, 2001)

Problemas na extração da partícula alvo: segundo os autores LORENZO *et al.*, 2011, a remoção da partícula alvo após a polimerização do MIP é uma etapa crítica, pois a própria rede polimérica e a afinidade das cavidades impressas com a partícula alvo dificulta a sua remoção. O MIP que contém partículas alvo após sua lavagem apresentará menos cavidades disponíveis para a religação, diminuindo a sua eficiência, e se houver sangramento (liberação da partícula alvo de forma indiscriminada) durante as aplicações analíticas, ocorrerão erros.

As técnicas de extração mais utilizadas são a imersão descontínua em solventes orgânicos ou em solução salina e a extração contínua em aparelho Soxhlet. Mas não se alcança a extração de 100% da partícula alvo, mesmo com vários ciclos de lavagem, pela dificuldade de acesso do solvente às cavidades de regiões altamente reticuladas ou a solubilidade insuficiente da partícula alvo no solvente para quebrar as interações com a cavidade impressa (LORENZO *et al.*, 2011 *apud* ELLWANGER *et al.*, 2001 e SHEA *et al.*, 1989).

No caso de moléculas e proteínas grandes, a permanência de quase 25% da molécula molde original foi relatado (LORENZO *et al.*, 2011 *apud* OU *et al.*, 2004, LEVI *et al.*, 2010). Recorrer a recursos como pH ou temperatura extremos aplicados por longo tempo para a extração das partículas alvo pode levar os MIPs à distorção e até mesmo rompimento de suas cavidades durante a remoção, além de mudanças no grau de inchamento da rede MIP levando a colapso da rede, dificultando a entrada da partícula alvo, ou em distorção dos pontos de ligação ou da força das interações, conforme Fig. 3.6.



Figura 3.6 Ilustração das alterações que o MIP pode sofrer durante a remoção da partícula alvo. Adaptado de LORENZO *et al.* (2011).

Para melhorar o rendimento da recuperação da partícula alvo, alguns parâmetros podem ser ajustados, como por exemplo a quantidade e o tamanho das partículas de MIP, a natureza e o volume de solvente e o tempo de operação. A escolha da técnica de extração dependerá da natureza e estabilidade da partícula alvo e do MIP, observando a simplicidade e uso, curto tempo de operação, solventes ecologicamente corretos, quantidade mínima de solvente, baixo custo econômico e possibilidade de utilização em escala industrial (LORENZO *et al.*, 2011 *apud* KRONHOLM *et al.*, 2007).

A liberação da partícula alvo discriminadamente (sangramento): No caso de remoção ineficiente do molde, após polimerização com a partícula alvo, algumas das moléculas alvo permanecem presas aos sítios de ligação dos MIPs. Sob essas circunstâncias, as moléculas alvo aprisionadas podem ser liberadas posteriormente durante a aplicação de MIPs ao seu propósito pretendido em um fenômeno conhecido como sangramento de molde ou “vazamento de molde”. O sangramento é um problema que dificulta as aplicações de MIPs no campo de sensores e separações cromatográficas. Isso ocorre porque se as moléculas alvo anexadas forem liberadas durante o processo de detecção, um resultado falso positivo pode ser obtido. Além disso, no caso de

separações cromatográficas (LORENZO *et al.*, 2011 *apud* CHEN *et al.*, 2011; WULFF *et al.*, 2001).

Existem algumas soluções propostas para o problema de sangramento de moldes, incluindo impressão molecular de isótopos, extração assistida por micro-ondas ou a realização de uma extração em branco (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* ELLWANGER *et al.*, 2001). No entanto, entre as melhores e mais utilizadas soluções para o problema de sangramento de moldes está a impressão fictícia.

A impressão fictícia é um processo que se refere à impressão de um composto que é estruturalmente semelhante ao composto alvo em vez do próprio alvo. Existem dois tipos de impressão fictícia: em primeiro lugar, a impressão de fragmentos, que utiliza uma parte das moléculas alvo como alvo fictício (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* HE *et al.*, 2017). Em segundo lugar, a impressão de imobilização de intervalo, que utiliza um composto totalmente diferente do alvo, no entanto, este composto tem a mesma distância entre dois grupos funcionais idênticos ao composto alvo (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* MARC *et al.*, 2018).

A combinação da impressão em fase sólida com uma técnica de impressão fictícia pode apresentar uma excelente solução para o problema de sangramento do molde. No entanto, o processo de extração do molde ainda pode ser lento e alguns pesquisadores presumem que a remoção completa do molde no caso de proteínas é quase impossível (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* TOKONAMI *et al.*, 2009).

A heterogeneidade dos sítios de ligação: a seletividade de um MIP depende do acesso às cavidades formadas, da compatibilidade das ligações entre polímero-partículas alvo e da reversibilidade dessas ligações. A escolha do monômero funcional está intimamente ligada à seletividade do MIP. Os sítios heterogêneos de ligação são demonstrados na fig. 3.7.

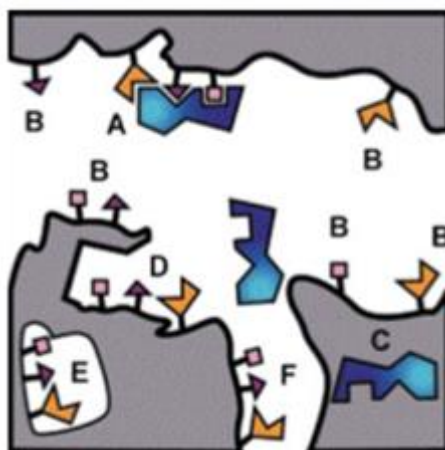


Figura 3.7 Representação da heterogeneidade das cavidades formadas no MIP (BUI *et al.*, 2010).

A descrição das situações e métodos para se evitar os defeitos, seguindo a ordem alfabética dos itens ilustrados na fig. 3.7, segundo Bui *et al.* (2010):

(A) Ligações de alta-afinidade: são formadas durante a polimerização na presença da partícula alvo e resultam em ineficaz liberação das cavidades no momento da lixiviação das partículas alvo, gerando MIPs com baixa eficiência de extração. Este problema pode ser evitado escolhendo-se monômeros com grupos funcionais adequados à partícula alvo, que formarão ligações de intensidade moderada para que o molde seja retirado da matriz polimérica no momento da lixiviação ácida.

(B) Sítios quimicamente incompatíveis com a partícula alvo: os grupos funcionais presentes nesses sítios não realizarão interações com a partícula alvo, reduzindo a eficiência desses poros. Este problema pode ser evitado escolhendo-se adequadamente monômero a ser utilizado de acordo com as interações químicas que se processarão.

(C) Partícula alvo aprisionada dentro do polímero: nessa situação a partícula alvo é englobada pelo polímero no momento da síntese, ficando impossibilitada de ser lixiviada e induzindo resultados errôneos nas análises de caracterização. Este problema pode ser evitado escolhendo-se um solvente adequado que proporcione uma morfologia porosa ao polímero.

(D) Cavidade com formato e grupos funcionais adequados à interação partícula-polímero.

(E) Sítio aprisionado: nesse caso a cavidade propícia não é acessível, reduzindo a eficiência de extração do MIP. Novamente a escolha do solvente influenciará na formação de poros, que liberarão acesso a essas cavidades fechadas.

(F) Cavidade com formato e ordenamento de grupos funcionais incompatíveis: nesse último caso o formato e a ordem que os grupos funcionais apresentam impossibilitam interações químicas e físicas entre o polímero e o molde.

A escolha do monômero funcional possui uma importância singular, sendo utilizados atualmente softwares de modelagem molecular e triagem em bibliotecas virtuais de monômeros para auxiliar nessa escolha e evitar os problemas ilustrados na figura 3.7, favorecendo maior rendimento ao processo.

A impressão de superfície é um método mais conveniente para reduzir o problema de acessibilidade do sítio de ligação, uma vez que os sítios de ligação estão todos orientados na superfície (MOSTAFA *et al.*, 2021 *apud* MATTIASSON *et al.*, 2015).

3.2.4 HidroMIPS

Os hidrogéis são estruturas de redes poliméricas insolúveis e reticuladas que têm a capacidade de absorver quantidades significativas de água (BYRNE *et al.*, 2002). Os hidroMIPs são hidrogéis produzidos com a tecnologia de impressão de partícula alvo, proporcionando a um material que tem características de expansão pela hidroflicidade de suas cadeias a combinação com a afinidade de ligação e de seletividade de um MIP. O controle da densidade de cadeias poliméricas, quantidade de agente de reticulação e balanço hidrofílico-hidrofóbico proporciona hidroMIPs com propriedades mecânicas e estruturais ajustadas para as aplicações ao qual se destinam, pois os hidrogéis reagem diferentemente quando o meio em que estão imersos tem

características distintas de pH, força iônica ou analíticos químicos (BYRNE *et al.*, 2002).

O hidrogel proposto por este trabalho será o resultado da copolimerização do ácido acrílico (AAc) com acrilamida (AAM), formando a poli(acrilamida-co-ácido acrílico), onde os grupos carboxila são integrados na espinha dorsal do hidrogel (REN, J. *et al.*, 2023).

Os hidrogéis aniônicos, que contêm grupos carboxílicos, intumescem a um pH maior que o pKa do gel, por acontecer uma ionização dentro da rede (Figura 3.8). O oposto acontece com hidrogéis catiônicos, que contêm grupos amida. Em um anfólito, que contém os grupos ácido e básico, o pH isoeletrico determina o pH de transição do intumescimento do gel (BYRNE *et al.*, 2002).

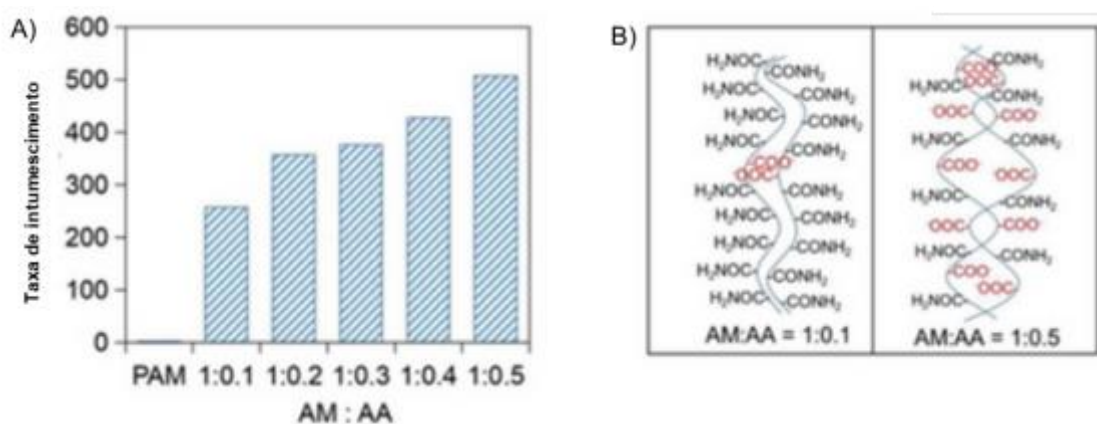


Figura 3.8 Relação entre taxa de intumescimento e razão de monômeros (a) e diagrama de intumescimento do hidrogel poli(AM-co-AAc) (b). Editado. (REN, J. *et al.*, 2023).

A capacidade de expansão/contração do gel cria uma afinidade de ligação e seletividade variável para o hidroMIP, mas o elevado uso de agente reticulante por monômero funcional reduz a massa molecular média entre ligações cruzadas, tornando o polímero mais rígido, dificultando processos de difusão (BYRNE *et al.*, 2002). ALVAREZ-LORENZO e colaboradores (2000) descreveram géis com

reconhecimento e memorização de sítios de ligação em sistemas de baixa reticulação (0,1 a 3mol%), sendo necessária uma análise da quantidade de agente reticulante para o grau de intumescimento adequado para a aplicação em biossensores.

Apesar da vantagem de se utilizar um solvente “verde”, a água, a síntese de MIPs em meio aquoso pode resultar em um polímero com reconhecimento específico de biomoléculas, estabilidade mecânica e química prejudicados, pois soluções aquosas reduzem significativamente a força de ligação das interações não covalentes monômero-modelo (HAWKINS; STEVENSON; REDDY, 2005).

Sobre o monômero funcional para a síntese do hidromIP, a acrilamida é uma opção favorável por ser um membro nitrogenado da família dos polímeros acrilatos, que tem sido identificada como uma matriz de impressão adequada para moléculas biológicas, pois é solúvel em água, barata, facilmente produzida e pode ser projetada para possuir parâmetros estruturais atraentes (HAWKINS, 2005 *apud* LIAO, 1996). O ácido acrílico é altamente solúvel em compostos polares e a presença de insaturação e do grupo carboxila torna a molécula altamente reativa à processos de hidrogenação, hidratação, esterificação e transesterificação (OHARA, 2011).

3.3 Interação proteína e MIP

As proteínas são similares a polímeros, pois são compostas de n unidades monoméricas, chamadas aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Cada aminoácido tem um único grupo de resíduos (hidrofílico ou hidrofóbico, com propriedades eletrostáticas variáveis, doador ou receptor de ligações de hidrogênio etc.), contribuindo para a conformação da proteína final (BYRNE *et al.*, 2002).

A albumina, utilizada na primeira parte desse trabalho, é a proteína plasmática mais abundante no sangue, em torno de 50% das proteínas totais, e suas características são de proteína ácida, solúvel em água, extremamente robusta: estável na ampla faixa

de pH de 4,0 a 9,0 e suporta temperaturas até 60°C por 10h (KRATZ, 2008), com ponto isoelétrico de ~4,7, apresentando carga negativa líquida em pH neutro (MALAMUD, 1978), pico de absorbância no espectrômetro UV-vis em $\lambda = 277\text{nm}$ (KRYSCIO *et al.*, 2012) e diâmetro hidrodinâmico de 14nm (KRYSCIO *et al.*, 2012 *apud* PUTNAM *et al.*, 1975). Na segunda parte desse trabalho é utilizado o epítipo J5 oriundo da proteína do vírus SARS-CoV-2 (SANTOS *et al.* 2022).

A albumina é uma proteína de grande tamanho molecular (MW 66,0 kDa, segundo GAI *et al.*, 2011) comparado com o epítipo J5 utilizado neste trabalho (MW 1980,22 Da). Conforme GAI e colaboradores (2010) especularam sobre a BSA possuir transições conformacionais mais flexíveis comparado com a lisina, resíduo cinco vezes menor, frustraram-se que as ligações de hidrogênio formadas no complexo BSA-monômero foram muito fracas. Consideraram, então, a interação eletrostática entre monômero e BSA, afirmando melhor interação da BSA com monômeros básicos, por razão da BSA ser uma proteína ácida. Os autores PANG e colaboradores (2006) utilizaram esferas de gel de poliacrilamida para a impressão de albumina, pois possuíam grupos eletrostáticos funcionais utilizados na impressão molecular da BSA. As esferas de gel impressas com albumina apresentaram boa capacidade de adsorção de albumina com fator de separação de 4,71.

O epítipo J5, oriundo da glicoproteína Spike do SARS-CoV-2, com 18 resíduos, tem peso molecular 1980,22 Dalton, carga positiva 1 e ponto isoelétrico 7,94.

Segundo Pawłowski (2021), a somatória de cargas elétricas no SARS-CoV-2 do envelope (E), da membrana (M) e do nucleocapsídeo é positiva. Toda a carga da proteína Spike é negativa, mas localmente, no RBD, é positiva, conforme ilustra a Figura 3.9.

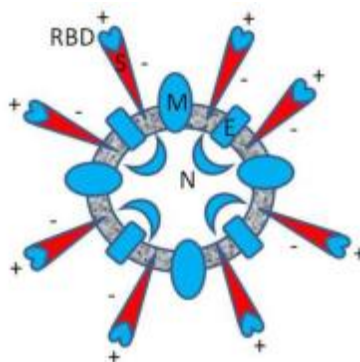


Figura 3.9 Ilustração das cargas parciais do SARS-CoV-2 (PAWŁOWSKI, 2021)

A revisão de Kryscio (2012) indicou que a síntese de MIPs utilizando proteínas relacionadas na literatura apresenta a albumina BSA como uma das proteínas mais usadas, a acrilamida (AAm) como um dos monômeros funcionais mais usados além do ácido acrílico e o etilenoglicol dimetacrilato na lista dos dois reticulantes mais utilizados.

3.4 Eletrofiação

A síntese abordada neste projeto será a eletrofiação reativa, apresentada a seguir.

A eletrofiação, técnica usada para produção de micro/nanofibras, que, por serem de escala nanométrica, apresentam área superficial extremamente alta para determinado volume, melhores desempenhos mecânicos (por exemplo, resistência à tração), alta porosidade e distribuição ajustável do tamanho de poros e, como acréscimo, a versatilidade para a decoração da superfície com grupos químicos específicos (PATEL *et al.*, 2020 *apud* JIANG *et al.*, 2015). A eletrofiação reativa é uma combinação de eletrofiação com fotopolimerização, onde, perante uma fonte de calor ou luz ultravioleta, as reações de polimerização e a formação de ligações cruzadas acontecem simultaneamente com a formação das nanofibras entre a agulha e o coletor, conforme MIRANDA *et al.*, 2020.

A maioria dos polímeros sintéticos e naturais pode ser eletrofiada após a dissolução em solventes apropriados tendo apenas a ação de forças eletrostáticas empregadas para gerar fibras, com base na aplicação de uma tensão elétrica a uma solução polimérica ou fundido. Uma configuração simples de eletrofição é representada na Fig. 3.10, e envolve uma seringa (recipiente de solução) com ponta de aço inoxidável ou outra agulha condutora, uma bomba, uma fonte de energia de alta tensão e um coletor (PATEL *et al.*, 2020 *apud* MIRJALILI *et al.*, 2016, YANG *et al.*, 2005).

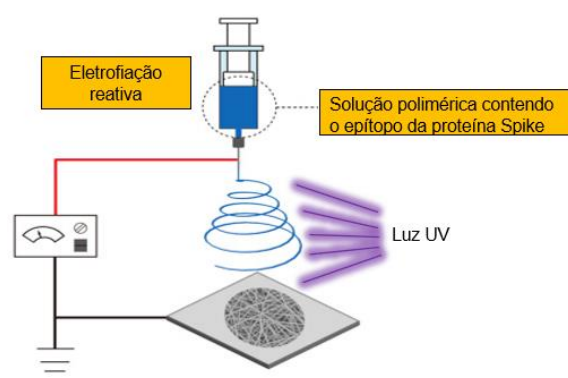


Figura 3.10 Configuração simples de eletrofição reativa. Feito pela autora.

A solução de polímero é bombeada a uma vazão constante e a uma tensão aplicada definida e distância entre a agulha e o coletor, resultando na produção dos materiais desejados. Dependendo dos parâmetros de eletrofição, podem ser produzidas fibras (nano ou micro) ou partículas (PATEL *et al.*, 2020 *apud* YANG *et al.*, 2005).

O mecanismo de eletrofição envolve o acúmulo de cargas na superfície do líquido devido à repulsão eletrostática causada pelo campo elétrico aplicado; uma vez que essas forças de repulsão eletrostática superam a tensão superficial do líquido, o menisco é deformado em uma estrutura de formato cônico (cone de Taylor) (PATEL *et al.*, 2020 *apud* REZNIK *et al.*, 2004). Este jato de líquido carregado é então ejetado em direção ao coletor (por exemplo, placas planas, tambores rotativos). Dependendo da viscosidade da solução, fibras sólidas serão formadas à medida que o solvente evapora do movimento de chicoteamento que ocorre durante o tempo de voo da

gotícula estirada para o coletor, resultando assim na deposição de uma esteira de fibra não tecida (PATEL *et al.*, 2020).

3.4.1 Defeitos nas fibras

Defeitos como os “beads”, variação no diâmetro das filhas, poros e sprays têm relação com fatores como umidade do ar, concentração da solução, condutividade elétrica da solução, distância do coletor, tensão aplicada.

O primeiro efeito da umidade do ar é na variação do diâmetro da fibra, afetando a estabilidade do jato e a consolidação da fibra (Fig. 3.11). Para os polímeros hidrofóbicos sob atmosfera de alta umidade, a absorção de água no jato leva a consolidação precoce devido à precipitação, resultando em morfologia de cordão, os “beads”. Para os polímeros hidrossolúveis, a solidificação é retardada, devido a evaporação mais lenta, afinando o jato, deixando-o instável (MAILLEY; HÉBRAUD; SCHLATTER, 2021).

A umidade relativa do ar ideal para se evitar a formação de “beads” está na faixa <50%, segundo o estudo de Mailley e colaboradores (2021).



Figura 3.11 Representação do efeito da umidade relativa do ar no diâmetro da fibra: a) para polímeros hidrossolúveis, b) para polímeros hidrofóbicos. Adaptado de MAILLEY; HÉBRAUD; SCHLATTER, (2021)

Uma solução polimérica com baixa condutividade elétrica não pode produzir fibras porque a superfície da gota não carrega carga elétrica suficiente para formar um cone de Taylor. Por outro lado, soluções poliméricas com alta condutividade elétrica tendem a produzir fibras de pequeno diâmetro, até um valor crítico de condutividade acima do qual as soluções poliméricas se tornam extremamente instáveis e resultam em ampla divergência de diâmetro de fibra sob o forte campo elétrico aplicado (PATEL *et al.*, 2020 *apud* DING *et al.*, 2014).

Outras variáveis, como a distância do coletor à agulha, podem resultar em nenhuma deposição de fibra (se muito longa) ou em possível arco (se muito curta). O arco também pode ocorrer se a tensão aplicada for muito alta, enquanto a tensão muito baixa não produzirá fibras porque as forças de repulsão eletrostática serão incapazes de superar a tensão superficial da solução. Da mesma forma, a concentração de polímero na solução pode dificultar a produção de fibras (se muito alta, devido à alta viscosidade), ou resultar na formação de glóbulos de polímero (se muito baixa).

Glóbulos de polímero também se formarão caso a vazão seja muito alta; inversamente, se a taxa de fluxo for muito baixa, isso resultará em deposição inconsistente das fibras no coletor (PATEL *et al.*, 2020).

A formação de filme é um fenômeno que acontece quando o solvente não é totalmente evaporado, ocorrendo a deposição das fibras no coletor quando ainda não estão solidificadas completamente (Fig. 3.12).

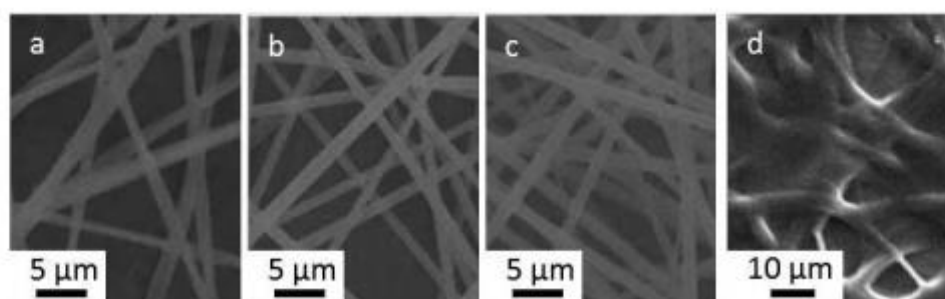


Figura 3.12 Fibras e filme de PVP eletrofiados em etanol com umidades relativas do ar em (a) 20%, b) 30%, c) 45% e 60% a 20°C. MAILLEY; HÉBRAUD; SCHLATTER, (2021)

3.4.2 Fibras de MIPs

Existem quatro formas de se preparar nanofibras de MIP eletrofiadas, a saber: impressão molecular durante o processo de eletrofição; desenvolvimento de uma camada MIP na superfície da micro/nanofibra eletrofiada; abordagens de impressão em fase sólida e dispersão/conjugação de nanopartículas de MIP em micro/nanofibras eletrofiadas (PATEL *et al.*, 2020).

A impressão molecular durante o processo de eletrofição é a forma mais complicada e difícil de ser realizada, pois a estrutura de um polímero reticulado, por definição, não é solúvel, portanto, não pode ser eletrofiada. Uma alternativa seria a exploração das fortes interações entre as principais cadeias poliméricas a fim de não ser utilizado

agente reticulador. Mas a ausência de reticulação pode resultar em alteração estrutural das cavidades (PATEL *et al.*, 2020 *apud* CHRONAKIS *et al.*, 2006). Os autores Chronakis *et al.*, (2006) são os primeiros a relatarem a produção de sítios de reconhecimento de impressão molecular durante a eletrofiação de PET e poliamina com o ácido 2,4-D, utilizando as interações dipolo-dipolo entre os elétrons π dos anéis de benzeno do ácido com os grupos carbonila do PET.

No processo de eletrofiação com fotoiniciador, a radiação ultravioleta pode ser aplicada antes, durante ou após a eletrofiação, sendo que a eletrofiação reativa utiliza a radiação ultravioleta durante a eletrofiação, resultando em uma reticulação *in situ* fornecendo viscosidade, morfologia da fibra e estabilidade distinta dos outros métodos de irradiação (LI *et al.*, 2019).

4. METODOLOGIA

4.1 Etapas do procedimento experimental

Este trabalho foi organizado para a síntese e estudo de MIPs e NIPs de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) com reticulante PEGDA utilizando BSA e o epítipo J5 como moléculas modelos na produção dos MIPs. As amostras foram produzidas por dois processos distintos, a saber: polimerização em *bulk* e eletrofiação, gerando filmes e mantas eletrofiadas, respectivamente, conforme ilustra a Figura 4.1. As etapas do procedimento experimental, as amostras sintetizadas em triplicatas e as composições estão compiladas no fluxograma da Figura 4.2.

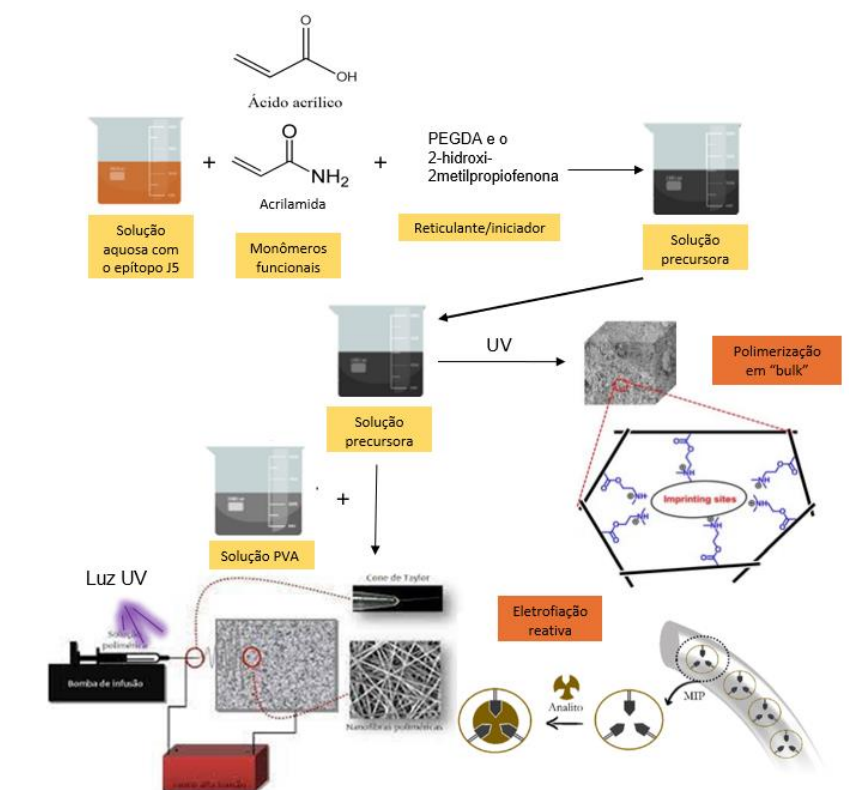


Figura 4.1 Esquema ilustrativo da produção dos hidrogéis de MIP na forma de bloco (polimerização em massa) e nanofibras (eletrofiação). Feito pela autora.

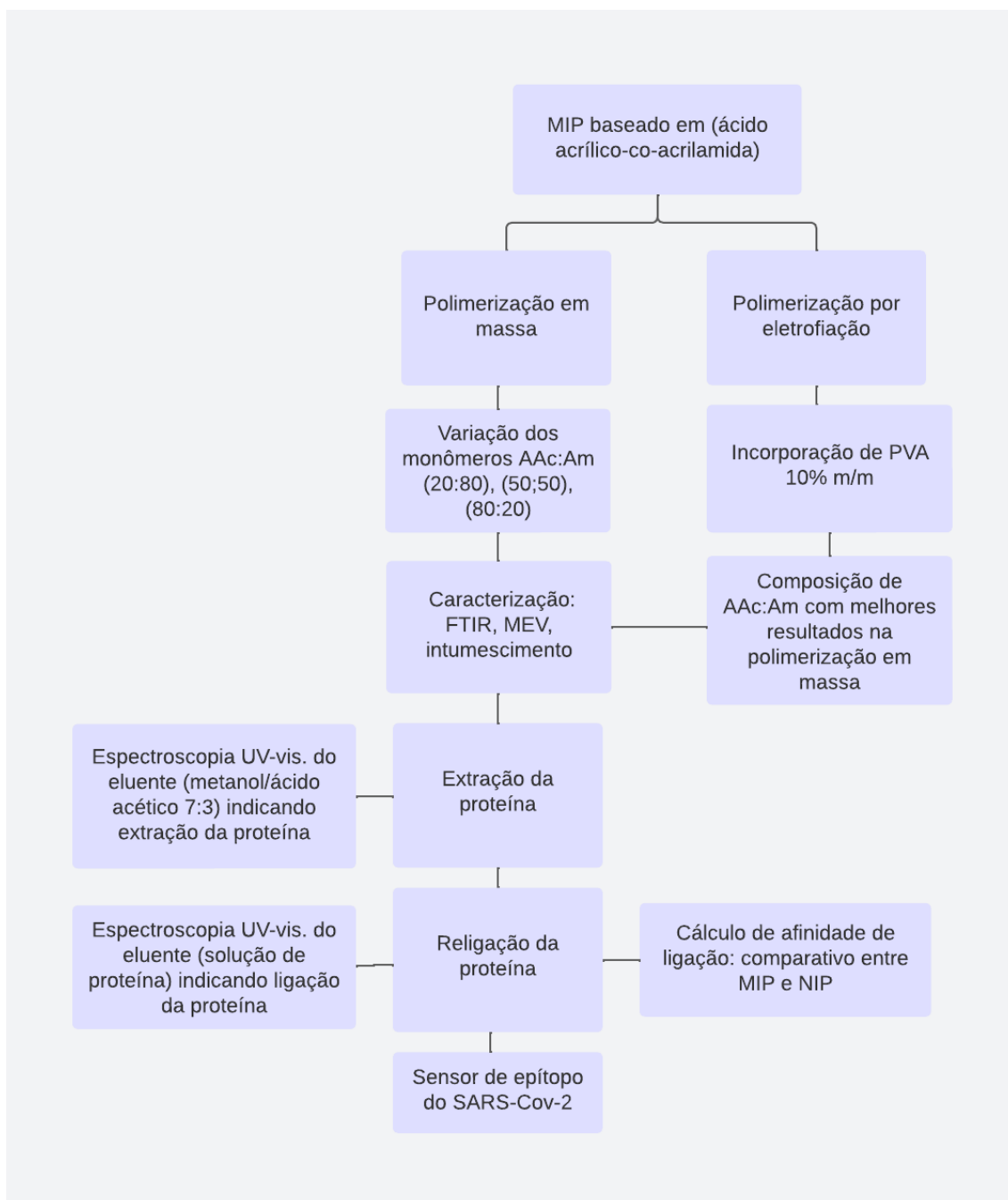


Figura 4.2 Fluxograma de procedimento experimental.

Antes da síntese com o epítipo J5, estudos conduzidos com a polimerização em massa de MIPs de albumina do soro bovino >98% da Sigma-Aldrich, proteína mais disponível, avaliaram a proporção de AAC:Am entre 20:80% m/m, 50:50% m/m e 80:20% m/m que resultasse em menor expansão quando imerso em água e melhor resultado de afinidade de ligação, respectivamente. A expansão do hidrogel gera

espaçamento entre as cadeias poliméricas distorcendo as cavidades presentes no MIP, que não é interessante para este trabalho.

Os monômeros funcionais ácido acrílico (AAc) e acrilamida (Am) foram escolhidos por fornecerem grupos carboxilas e amidas que possuem grande probabilidade de formarem interações eletrostáticas com regiões básicas e ácidas da proteína, respectivamente, como citado no tópico 3.2 da Revisão bibliográfica.

As amostras eletrofiadas utilizaram poli(álcool vinílico) (PVA) como carreador dos monômeros AAc e Am. Como eletrofiar um polímero reticulado é uma tarefa difícil, a reticulação foi realizada em um momento posterior à eletrofiação, segundo a técnica de eletrofiação reativa apresentada por MIRANDA (2017), com a fotopolimerização das nanofibras durante o processo de eletrofiação ao serem expostas à luz ultravioleta composta por uma lâmpada UVA de 8W e uma lâmpada UVC de 8W.

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados estão relacionados a seguir:

Ácido acrílico (AAc, Sigma-Aldrich), acrilamida (Am, Sigma-Aldrich), albumina bovina (Sigma-Aldrich), dimetilformamida (DMF, Sigma-Aldrich), dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), polietileno glicol diacrilato Mn 575 g/mol (Sigma-Aldrich), etileno glicol diacrilato (EGDA, Sigma-Aldrich), fotoiniciador 2-hidroxi-2metilpropiofenona 97% (Sigma-Aldrich), poli(álcool vinílico) PVA 98-99% hidrolisado, massa molar 146000-186000 g/mol (Sigma-Aldrich), usados como recebidos. Água deionizada foi obtida pelo equipamento Direct-Q 3 MILLIPORE (17.0M Ω .cm @25°C). Para o EIP, a molécula molde foi o epítipo J5, fornecido para o grupo de pesquisa do Projeto CAPES-COVID19 da UFMG.

O PVA escolhido, de alta massa molar, possui a função de aumentar a viscosidade da solução polimérica pelo processo de esterificação, para a formação de fibras no processo de eletrospinning, explicado no tópico 4.3.4.

4.3 Síntese

4.3.1 Solução de epítipo J5

O laboratório de produção de peptídeos do ICB – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG - sintetizou o epítipo nomeado de J5, que posteriormente foi utilizado na síntese e análise dos EIP de J5.

Foram entregues pelo laboratório do ICB tubos Falcon com o epítipo liofilizado com massas determinadas. O preparo da solução foi feito adicionando em cada tubo Falcon 100µL de DMF e 100µL DMSO para a solubilização do epítipo. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 5min e completou-se o volume desejado com água deionizada para as sínteses de MIPs e para as curvas de calibração do UV-vis, apresentadas no Anexo II.

4.3.2 Composição das soluções

Foi utilizada água deionizada como solvente porogênico, ácido acrílico e acrilamida como monômeros funcionais, polietileno glicol diacrilato como reticulante e o 2-hidroxi-2metilpropiofenona 97% como fotoiniciador. A relação em massa entre molécula modelo (MM): monômero (MF): agente de ligação: fotoiniciador foi de 1:176:25:0,3 em 2mL de solvente (água). As composições são mostradas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Tabela de amostras com a variação da relação Am:AAc e da relação entre MF:MM, em que 'MM' representa molécula modelo (albumina ou epítipo J5).

Amostra	Reagentes						
	MM (mg)	AAc (mg)	AM (mg)	PI(μ L)	PEGDA (mg)	H ₂ O (μ L)	PVA (mg) 10% <i>m/m</i>
B:Am20:BSA	1,6	225,3	56,3	6,0	32,0	2000	-
B:Am50:BSA	1,6	140,8	140,8	6,0	32,0	2000	-
B:Am80:BSA	1,6	56,3	225,3	6,0	32,0	2000	-
B:Am50:BSA:PVA	1,6	140,8	140,8	6,0	32,0	2000	0,032
B:Am50:J5:PVA	1,6	140,8	140,8	6,0	32,0	2000	0,032
Nf:Am50:BSA:PVA	1,6	140,8	140,8	6,0	32,0	2000	0,032
Nf:Am50:J5:PVA	1,6	140,8	140,8	6,0	32,0	2000	0,032

A identificação das amostras é feita utilizando a inicial B para amostras “*bulk*” obtidas via polimerização em massa e Nf para mantas compostas de nanofibras pelo processo de eletrofiação. O número seguinte é sequencial. Após esse número é mostrado a porcentagem de acrilamida utilizada na amostra, seguido pela informação da presença de PVA e do tipo de molécula modelo (Figura 4.3), e toda a nomenclatura é precedida pela informação NIP ou MIP.

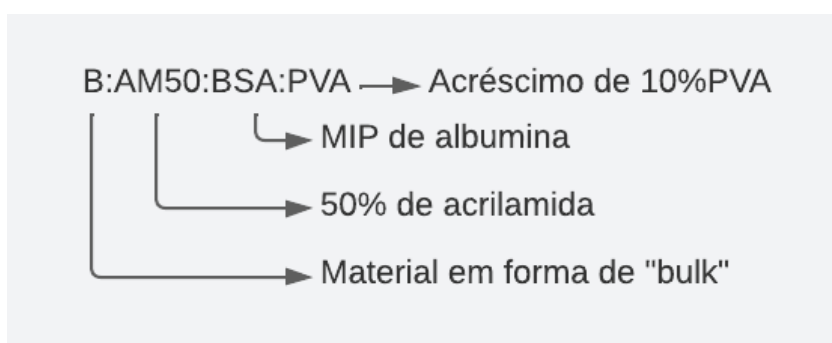


Figura 4.3 Exemplo da identificação das amostras.

4.3.3 Rota de polimerização em *bulk* de MIPs de poli(acrilamida-co-ácido acrílico)

As amostras de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) na forma de blocos (*bulk*) foram produzidas medindo 2,0ml de água deionizada e colocando-a em um frasco reacional de 4ml. Adicionou-se o ácido acrílico, a acrilamida, o reticulador PEGDA e o fotoiniciador segundo valores da tabela 4.1, utilizando balança analítica da marca Mettler Toledo e micropipetas da marca Digipet de 100-1000 μL , 10-100 μL e 0,5-10 μL . Para a produção do MIP/EIP foi adicionado ao solvente o epítipo J5 (ou albumina) com o ácido acrílico e a acrilamida para a formação do complexo MM-MF, sendo postos para dissolverem e interagirem sob agitação por 10 min. Adicionou-se o agente reticulante e o fotoiniciador em seguida, deixando o frasco reacional sob fluxo de nitrogênio por 5 min. O nitrogênio tem a função de retirar o oxigênio dissolvido da solução que pode reagir com o fotoiniciador e atrapalhar a polimerização (CUNNINGHAM et al, 2000). Após os 5 min, o frasco foi colocado sob incidência de radiação ultravioleta UVA e UVC por cerca de 5min para a completa polimerização. A Figura 4.4 ilustra o processo de síntese dos MIPs e NIPs.

Para as amostras *bulk* que possuíam PVA em sua composição, a síntese aconteceu de forma similar ao ilustrado na Figura 4.4, com o acréscimo de solução aquosa de PVA 10% m/m antes do acréscimo da solução proteica, aquecimento até início da ebulição para a formação de ligações ésteres (explicado na seção 4.3.3), resfriamento rápido até a temperatura ambiente e continuação da preparação com o acréscimo da solução de proteína, de reticulante, de fotoiniciador, purga e fotopolimerização.

Foi realizada a mesma síntese na ausência de epítipo para a produção dos NIPs, “*non imprinted polymers*”, com a finalidade de verificar se a retenção do modelo nos MIPs ocorre devido reconhecimento molecular ou por interação superficial por ligação não seletiva.

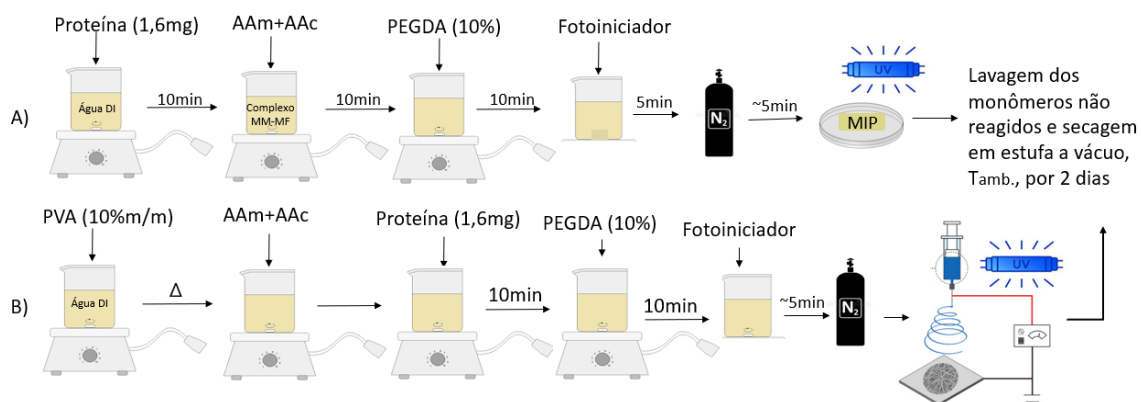


Figura 4.4 Síntese das amostra tipo *bulk* MIP (A) e nanofibras MIP (B). Feito pela autora.

As amostras preparadas foram retiradas do frasco e imersas em água deionizada para a lavagem de monômeros não reagidos, sendo trocada essa água de lavagem a cada 12h durante 72h. Ao final, as amostras foram secas em estufa a vácuo a temperatura ambiente de 24°C.

Avaliou-se o intumescimento das amostras produzidas e o fator de impressão, sendo que a composição com melhores resultados, baixo intumescimento e alto fator de impressão, foi a escolhida para a síntese por eletrofiação reativa.

4.3.4 Amostras eletrofiadas carreadas por PVA

Os MIPs e NIPs preparados pela rota de eletrofiação reativa utilizaram o PVA de massa molar 146000-186000 g/mol como carreador dos monômeros e como uma forma de se ajustar a viscosidade da solução para a eletrofiação acontecer.

O equipamento de eletrofiação foi baseado na Fonte de Alta-Tensão Gamma High Voltage Research e dois atuadores hidráulicos para controlar o fluxo de alimentação das seringas (MIRANDA, 2017).

Os parâmetros utilizados foram: agulhas de 0,6mm com bisel cortado, potencial positivo de alta tensão aplicado na agulha, coletor giratório aterrado, fluxo contínuo da solução de 8ml/h, distância coletor-agulha de 15cm e tensão de 15KV. A seringa foi revestida com papel alumínio para se evitar a polimerização antes da eletrofiação.

A câmara de radiação ultravioleta utilizada na produção de amostras pela polimerização em massa foi utilizada na eletrofiação reativa, como propôs Miranda (2017), direcionando a luz para o caminho das nanofibras entre a agulha e o coletor com parte do coletor giratório dentro do reator para garantir a polimerização, conforme mostra a foto na Figura 4.5 do conjunto montado.

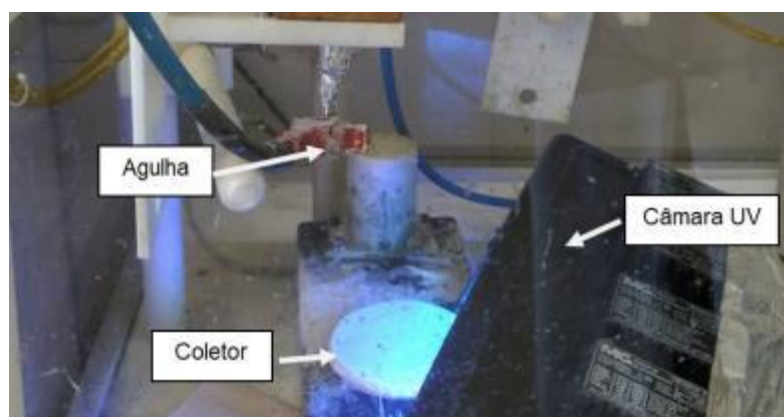


Figura 4.5 Eletrofiação com câmara de radiação UV acoplada. Feito pela autora.

A solução de PVA de 10% do total da massa da solução utilizada na polimerização em massa foi preparada dissolvendo-se 0,032g de PVA em 1,0ml de água, sob agitação em banho maria a 80°C. Em seguida, foi acrescentado à solução de PVA 1mL da solução precursora com os monômeros, sob agitação. Nesta etapa foi realizado um procedimento para a formação de ligações éster a partir da reação entre os grupos hidroxila do PVA e os grupos carboxila do AAc, conforme Fig. 4.6, pelo aquecimento da solução até o início da ebulição e resfriamento rápido para a temperatura ambiente. Esse processo, citado por Miranda (2017) e Jim (2005), aumenta a espinabilidade da solução, reduzindo a produção de gotas durante a eletrofiação.

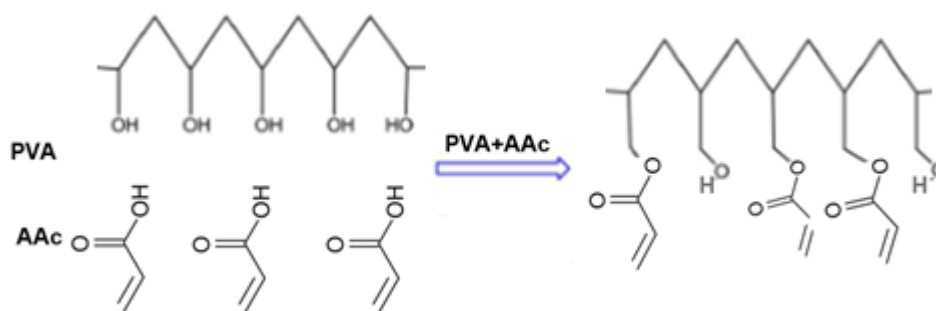


Figura 4.6 Suposição da formação de ligações éster entre os grupos hidroxilas do PVA e carboxilas do AAc (MIRANDA, 2017 *apud* SHEHZAD *et al.*, 2014)

4.4 Caracterização

As caracterizações das amostras MIP de albumina, EIP de epítipo J5 e NIP são especificadas a seguir.

4.4.1 Intumescimento

Para o ensaio de intumescimento, MIPs produzidos por polimerização em *bulk* utilizando albumina como molécula modelo e NIPs nas proporções de 20:80, 50:50 e 80:20 %m/m de AM:AAc foram cortados em quadrados de 5x5mm de área superficial e espessura variando de 1,5mm a 3,5mm. As amostras foram pesadas em balança Shimadzu modelo AY 220 e mergulhadas em um volume de 25mL de água deionizada por tempos pré-determinados (1min, 5min, 15min, 30min, 60min, 180min e 1440min). Para cada composição, três amostras foram ensaiadas para cada intervalo de tempo. Antes de cada pesagem o excesso de umidade foi retirado com auxílio de lenço de papel. Os resultados das pesagens obtidos para cada tempo de imersão foram utilizados para o cálculo do grau de intumescimento (GI) por meio da Equação 4.1, em que M_s é a massa da amostra seca, M_i é a massa da amostra intumescida.

$$GI (\%) = \frac{M_i - M_s}{M_s} \times 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

4.4.2 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

As amostras, após lavagem dos monômeros não reagidos e secagem a vácuo em temperatura ambiente, foram submetidas à análise por FTIR pelo espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Nicolet 6700 no modo de reflexão total atenuada (ATR).

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos polímeros produzidos, MIP e NIP, em “*bulk*” e em mantas de nanofibras, foi analisada por microscopia eletrônica de varredura utilizando-se um sistema de mini Sputter (PI Suplies – Sputter coater) para a metalização das amostras e o Microscópio Eletrônico de Varredura da marca FEI, modelo Inspect S50. As imagens obtidas foram processadas pelo software ImageJ.

4.5 Extração da molécula molde dos MIPs de albumina e dos EIP de epítipo J5

Após a síntese dos MIPs/EIP, é necessário extrair a molécula molde para liberar as cavidades impressas para os ensaios de religação, aplicação final do MIP e do EIP.

Foram feitas lavagens sucessivas com uma solução de metanol: ácido acético (70:30 v/v). Foi testado sem sucesso o sistema de extração por Soxhlet (amostras se expandiam e aderiam às paredes do cartucho de celulose utilizado na montagem do sistema), sendo adotado, então, tubos Falcon para a imersão do polímero na solução ácida, com leitura de alíquotas de 4mL no espectrofotômetro UV-vis a cada 4 horas e o processo de renovar o solvente eluente foi repetido até não constar picos no

comprimento de onda de 278nm para os MIPs de albumina e 275nm para o EIP de J5, conforme indicado na Tabela 4.2.

Além de reduzir o pH geral da solução, o ácido acético serve para interromper as ligações intramoleculares de hidrogênio dentro da molécula de proteína e, assim, ajuda a desnaturar a proteína (HAWKINS *et al.*, 2005).

Tabela 4.2 Monitoramento da extração da MM dos MIPs pela polimerização em *bulk* e em nanofibras

Tempo (h)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	B:AM20:BSA	B:AM50:BSA	B:AM80:BSA	B:AM50:J5:PVA	Nf:AM50:BSA:PVA	Nf:AM50:J5:PVA
4	163,83	662,17	147,17	286,00	502,17	172,67
8	<0,01	290,50	<0,01	179,33	2,17	<0,01
12	<0,01	78,83	<0,01	19,33	<0,01	<0,01
16	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Após a retirada da molécula molde, foi feita a lavagem do excesso de ácido com metanol, seguido de lavagem com água deionizada e as amostras foram colocadas em estufa a vácuo para a secagem a 30°C. O mesmo processo foi realizado com os NIPs.

4.6 Ensaio de religação de BSA/J5

Para a realização deste teste foram utilizados os MIPs e EIP em bloco de Am:AAc 50:50%*m/m* e 10% reticulante, assim como os NIPs sintetizados nas mesmas condições que os MIPs citados, com exceção da adição da molécula molde.

Foram pesadas massas de 0,10g, em triplicata, de cada MIP, EIP e NIP. Na sequência, adicionou-se com o auxílio de micropipeta automática 7mL de solução

aquosa de J5 (ou BSA) com concentração de $228\mu\text{g.mL}^{-1}$ (massa de J5: 1,6mg) em tubos falcon por 2h40min (período até o equilíbrio).

Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e levado para leitura em espectrofotômetro UV-Visível (modelo TCC-24OA, Shimadzu Corporation) a 275nm. Para a realização dessa leitura, uma curva analítica da solução de proteína foi preparada, conforme Figura II.1, ANEXO II.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e resultado da polimerização em *bulk* de MIP e NIP

Os *bulks* de MIPs e NIPs foram obtidos conforme o processo de síntese descrito na Metodologia (subitem 4.3.2), conforme é visto na Figura 5.1.

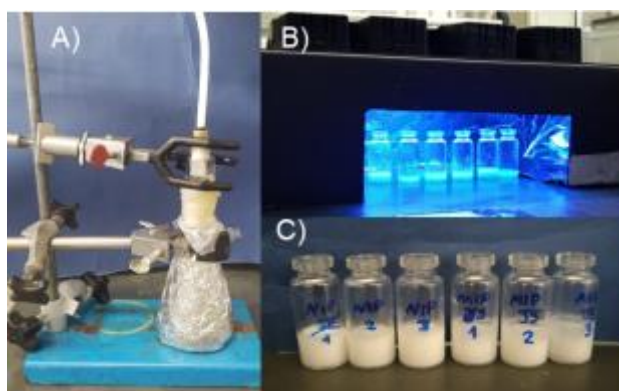


Figura 5.1 Síntese dos MIPs e NIPs pelo processo de polimerização em *bulk*. A) Purga com gás nitrogênio, B) fotopolimerização em câmara de radiação UV, C) após polimerização. Feito pela autora.

Uma fotografia do MIP de BSA com 50% de acrilamida antes e após secagem é vista na Figura 5.2. Tanto os MIPs quanto os NIPs sintetizados por polimerização em *bulk* apresentam aspecto esbranquiçado logo após a síntese e aspecto transparente e consistência aparentemente rígida após secagem.

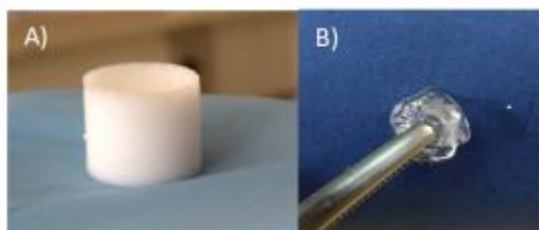


Figura 5.2 MIP BSA B1:AM50 após polimerização por UV. A) Antes da secagem, B) após secagem. Feito pela autora.

Os monômeros funcionais utilizados, o ácido acrílico e a acrilamida, baseados no trabalho de Miranda (2017) possuem caráter ácido e básico, ideal para as interações com os grupos funcionais básicos e ácidos da albumina e do epítipo J5, respectivamente, como apresentado na Tabela 1 da Revisão Bibliográfica. Existe, deste modo, a possibilidade de interações eletrostáticas entre os grupos amida e a albumina (conforme apresentado na Revisão bibliográfica, seção 3.2) e a formação de ligações de hidrogênio.

MIPs de BSA e EIP de J5 foram sintetizados usando AM e AAc como monômeros funcionais, com variação na relação AM:AAc conforme descrito anteriormente. Os NIPs foram preparados de forma semelhante, mas na ausência da proteína modelo. Experimentos com albumina foram realizados para identificar os melhores resultados nos ensaios de religação, que foram então aplicados no desenho de experimentos associados à preparação de nanofibras com o epítipo da proteína Spike do coronavírus. Uma disposição aleatória dos monômeros AM e AAc no copolímero é ilustrada no esquema de síntese usando J5 como molécula modelo na Figura 5.3 e o BSA como molécula modelo na Figura 5.4.

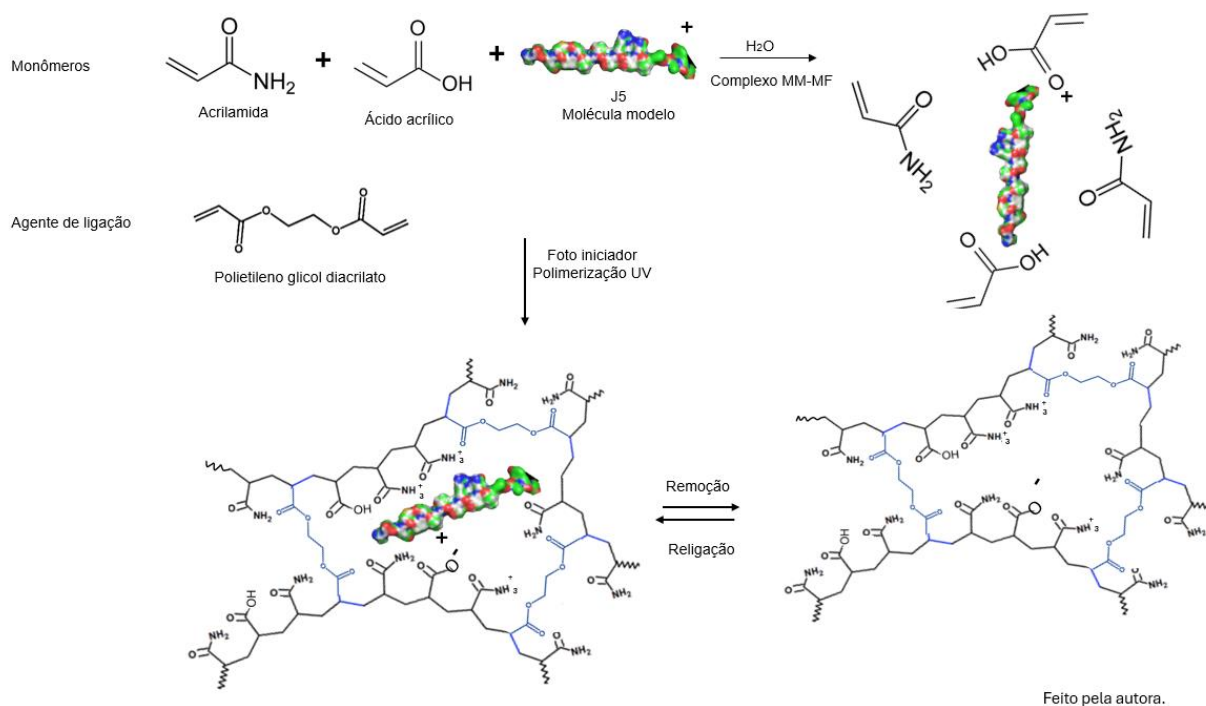


Figura 5.3 Formação do EIP de J5. Feito pela autora.

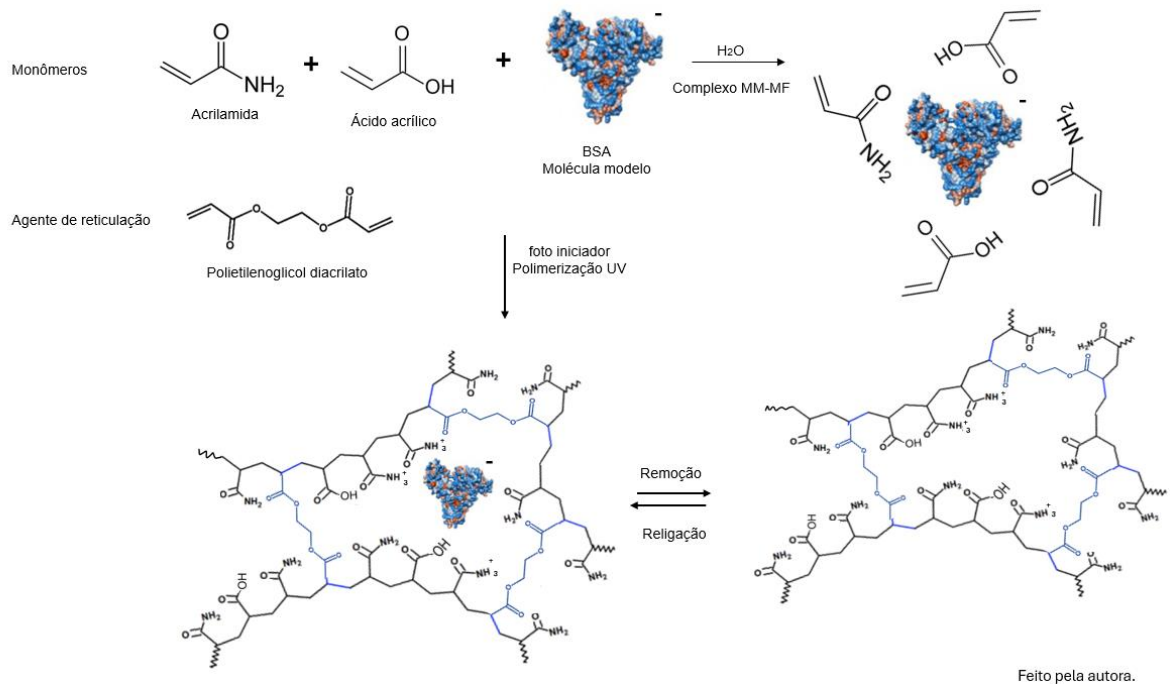


Figura 5.4 Formação do MIP de BSA. Feito pela autora.

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise das amostras obtidas por polimerização em *bulk* por meio de microscopia eletrônica de varredura revelou diferenças na topografia do MIP e do NIP, conforme Figura 5.5 e Figura 5.6.

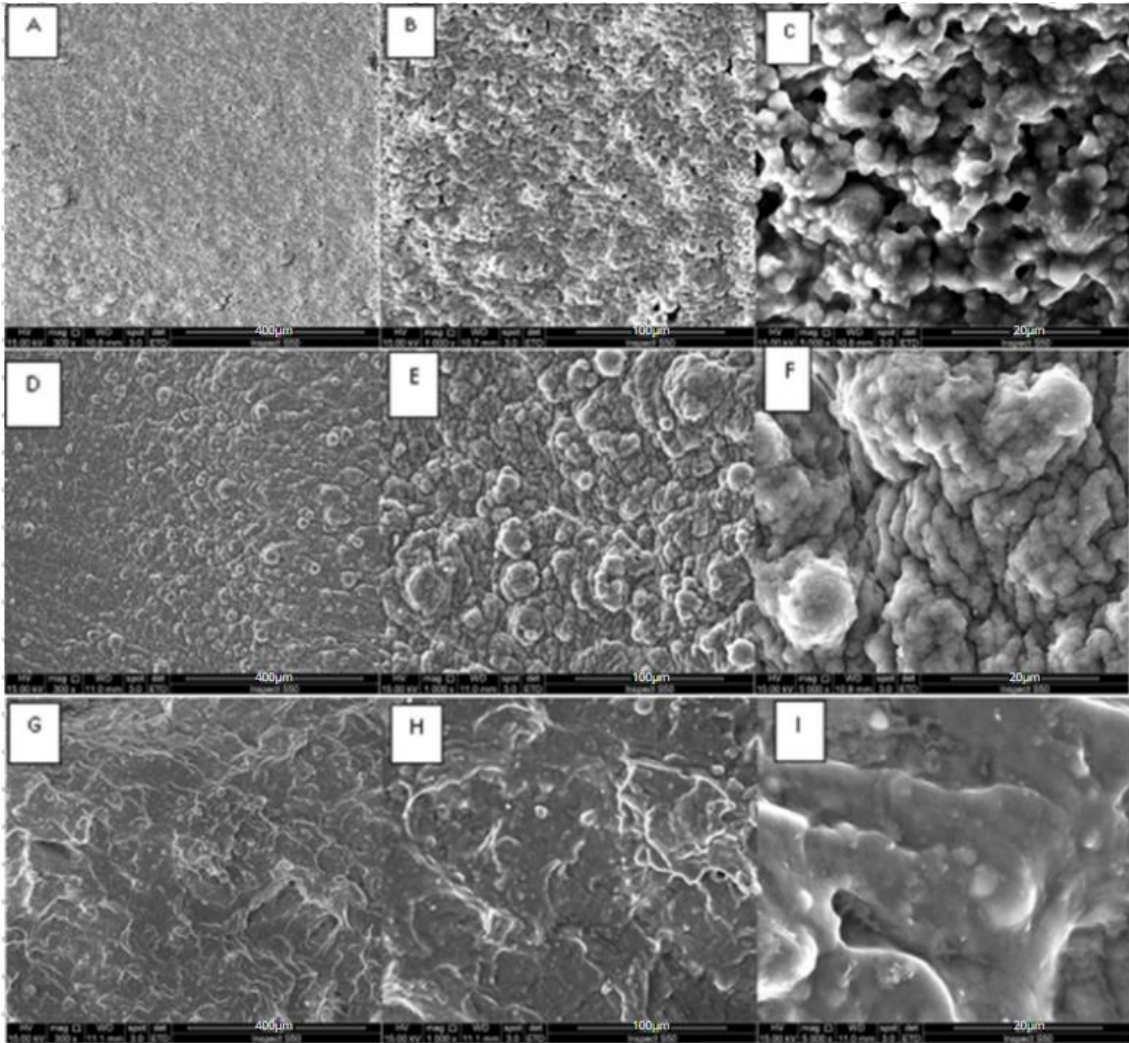


Figura 5.5 Imagens MEV de amostras EIP B:AM20 (A, B, C), B:AM50 (D, E, F) e B:AM80 (G, I, J) em ampliações de 300, 1000 e 5000 vezes.

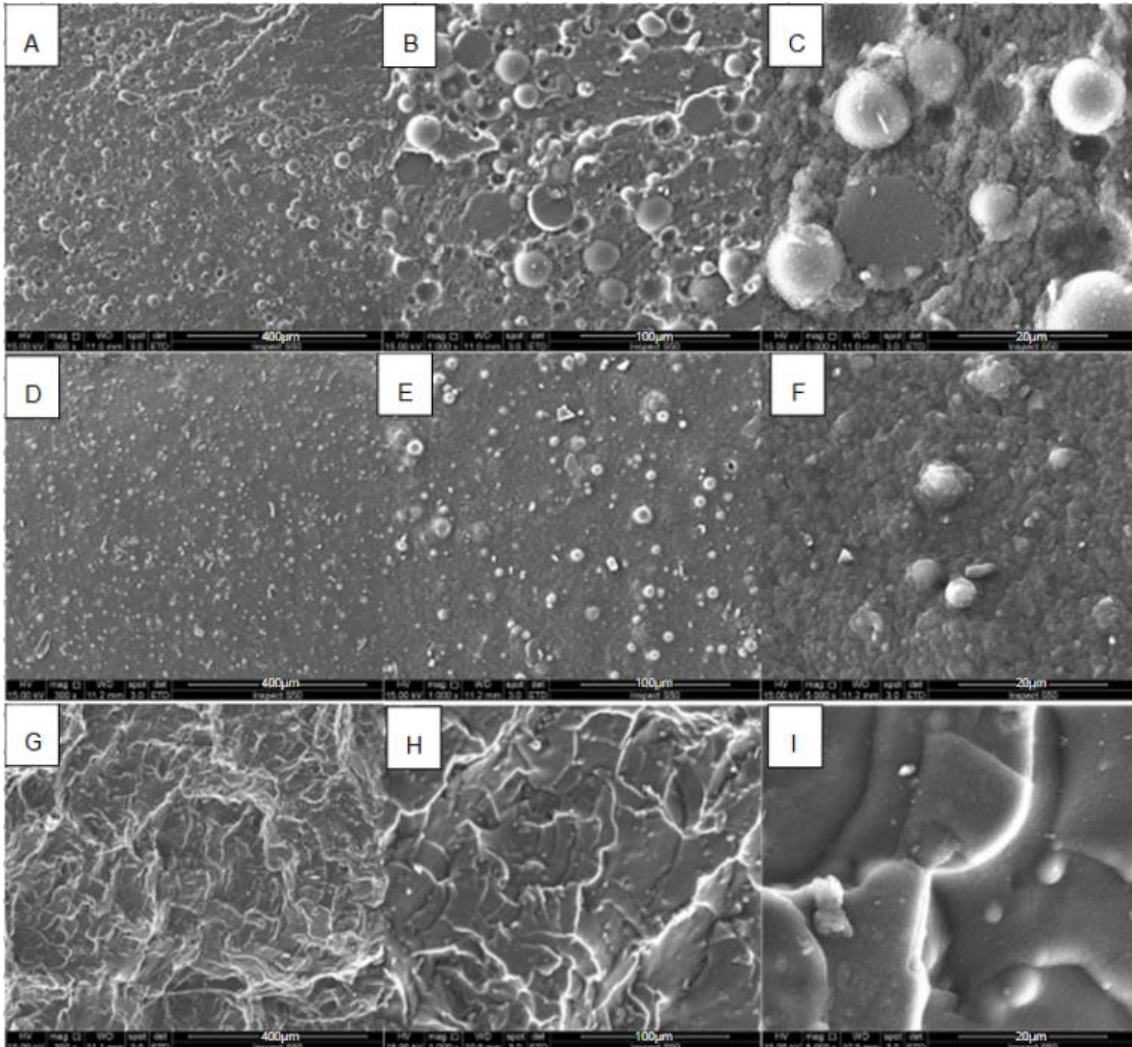


Figura 5.6 – Imagens obtidas por MEV para as amostras NIP B1:AM20 (A, B, C), B2:AM50 (D, E, F) e B3:AM80 (G, I, J) em aumentos de 300, 1000 e 5000 vezes.

Conforme mostrado nas imagens MEV da Figura 5.5, as amostras “bulk” EIP (baseadas em J5) parecem homogêneas em aspecto, não possuem poros visíveis nessas ampliações e tendem a aumentar a rugosidade relativa com a redução da acrilamida nas formulações. Pode-se inferir que amostras com menores quantidades de acrilamida apresentam maior área superficial (CIARDELLI *et al.*, 2001).

Comparando-se as micrografias para o MIP B:AM20 e NIP B:AM50, nota-se que o processo de extração da BSA afetou a morfologia do MIP, deixando a superfície com aspecto mais poroso (Fig. 5.6).

Como será apresentado no item 5.1.1 da seção Resultados e discussão, o intumescimento das amostras MIP é superior às amostras NIP, resultado previsto pela análise das micrografias das amostras, revelando maior área superficial e poros para as amostras MIP com a partícula molde extraída da matriz.

Os MIPs que possuem maior área superficial e volume de poros tendem a adsorver maior quantidade de partícula molde, resultado apresentado no item 5.3 desta seção.

5.1.2 Intumescimento

A composição dos MIPs e NIPs produzidos para os testes preliminares utilizava o reticulante EGDA, muito relatado na literatura para a produção de MIPs. Mas os ensaios de intumescimento com as amostras com EGDA apresentaram valores de GI (grau de intumescimento) superiores a 200% para os MIP e próximo de 600% para os NIP, Fig. 5.7, o que gerou o questionamento se realmente o EGDA seria um reticulante eficaz para o sistema proposto.

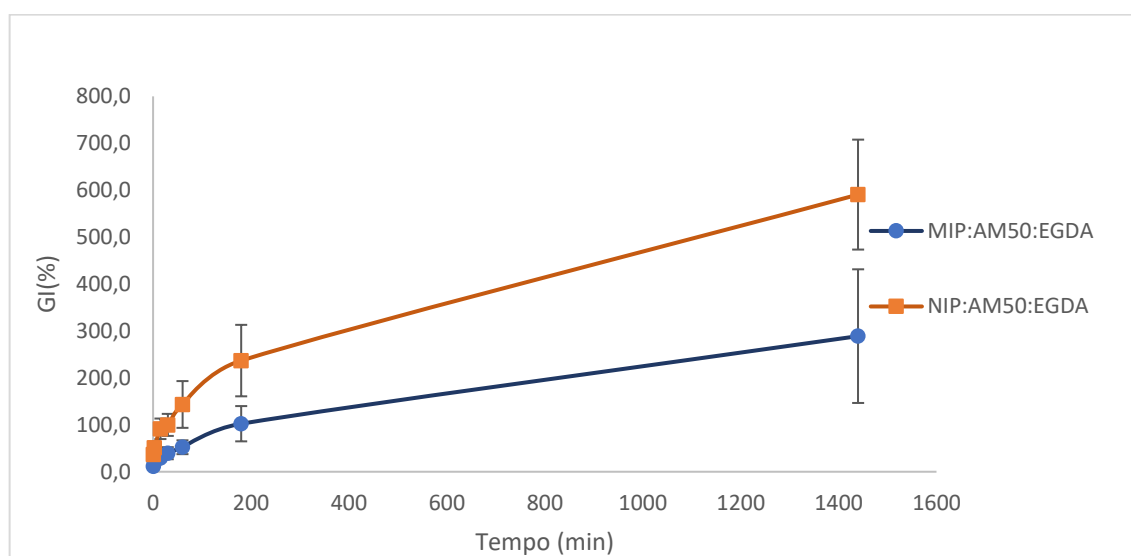


Figura 5.7 Ensaio de intumescimento de MIP e NIP B:AM50 com 10%EGDA m/m como reticulante. Feito pela autora.

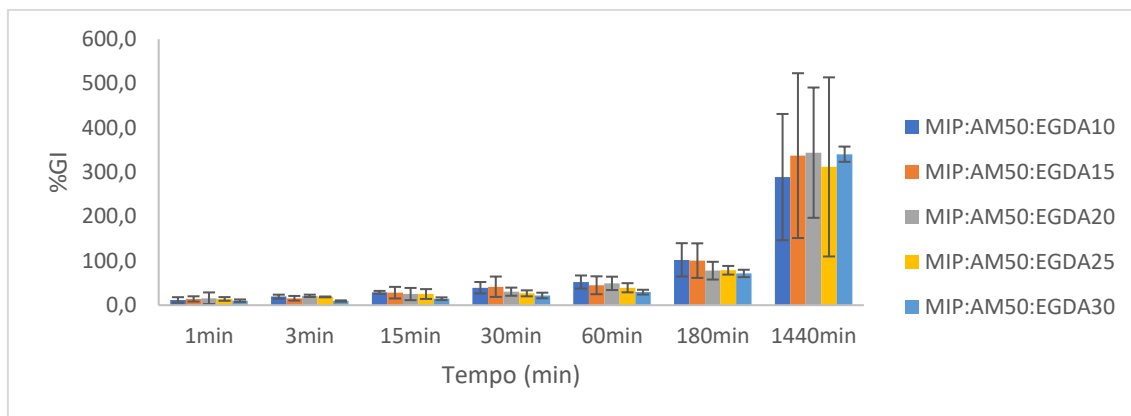


Figura 5.8 Ensaio de intumescimento de MIPs de BSA B:AM50 com variações na concentração de reticulante EGDA entre 10 a 30% m/m. Feito pela autora.

Os resultados de %GI para os MIPs produzidos com EGDA ficaram elevados (superiores a 300%) mesmo com o aumento da concentração de reticulante de 10 para 30% EGDA (Fig. 5.8). Foi decidido pela substituição do reticulante EGDA pelo PEGDA.

Os procedimentos de intumescimento com o reticulante PEGDA dos NIPs e MIPs de albumina (amostras B:Am20:BSA; B:Am50:BSA e B:Am80:BSA) foram realizados a 24°C. Os valores de grau de intumescimento (GI) obtidos para os intervalos de 1min, 5min, 15min, 30min, 60min, 180min e 1440min encontram-se apresentados na Figura 5.9.

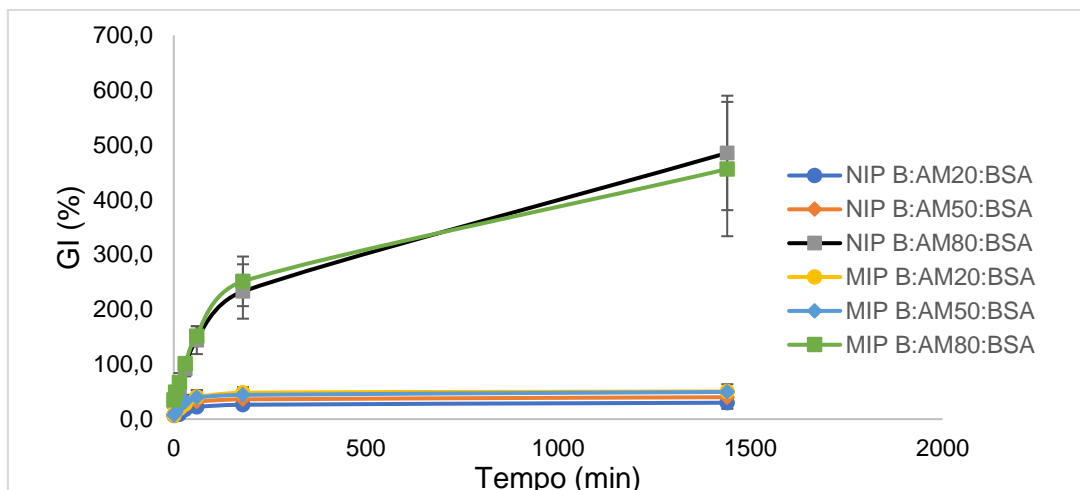


Figura 5.9 Grau de intumescimento com as amostras MIP e NIP variando-se a composição de acrilamida em 20, 50 e 80% m/m e contendo reticulante PEGDA 10% m/m. Feito pela autora.

Os resultados dos testes de intumescimento das amostras “*bulk*” derivadas de BSA e J5 com reticulante PEGDA são mostrados na Figura 5.9 Na Figura 5.9, as amostras B:AM80:BSA (MIP e NIP) não estabeleceram limite de inchamento dentro do período estipulado, o que não é interessante para a aplicação do material como anticorpo sintético, pois pode indicar uma instabilidade da rede polimérica. Além disso, os graus de intumescimento destas amostras com elevados teores de acrilamida foram muito elevados (superiores a 300%). Graus de intumescimento muito elevados podem causar instabilidades dimensionais das cavidades formadas pelas biomoléculas que pode reduzir a especificidade dos MIPs preparados. Como visto na Figura 5.9, BSA MIPs e NIPs tiveram um tempo de intumescimento de equilíbrio de 180 minutos, com valores de GI% de $48\% \pm 12$ para amostra MIP B:AM20, $26\% \pm 5$ para amostra NIP B:AM20, $44\% \pm 14$ para a amostra MIP B:AM50 e $36\% \pm 15$ para a amostra NIP B:AM50. É interessante notar na Figura 5.9 que os graus de intumescimento de todas as amostras NIP foram inferiores às amostras MIP, o que pode ser justificado pela presença de cavidades nos MIPs, que aumenta a área superficial do material, favorecendo a impregnação do solvente e a expansão das redes.

As amostras *bulk* com PVA apresentaram o perfil de intumescimento como consta na Fig. 5.10. Após a adição de PVA, um polímero importante para a etapa de eletrofiação, as amostras de EIP preparadas com J5 apresentaram um tempo de intumescimento de equilíbrio também próximo de 180 minutos, com valores de GI% de $154\% \pm 22$ para a amostra EIP B:AM50:PVA:J5, $170\% \pm 11$ para a amostra EIP B:AM50:PVA:J5 e $130\% \pm 4$ para a amostra NIP B:AM50:PVA:BSA. As amostras contendo PVA na Fig. 5.10 tenderam a apresentar valores mais elevados de graus de intumescimento em comparação com amostras de composição semelhante (mas sem PVA) na Fig. 5.9, possivelmente devido ao fato de que o PVA pode interferir na formação de ligações cruzadas, levando a redes com densidades de ligações cruzadas mais baixas.

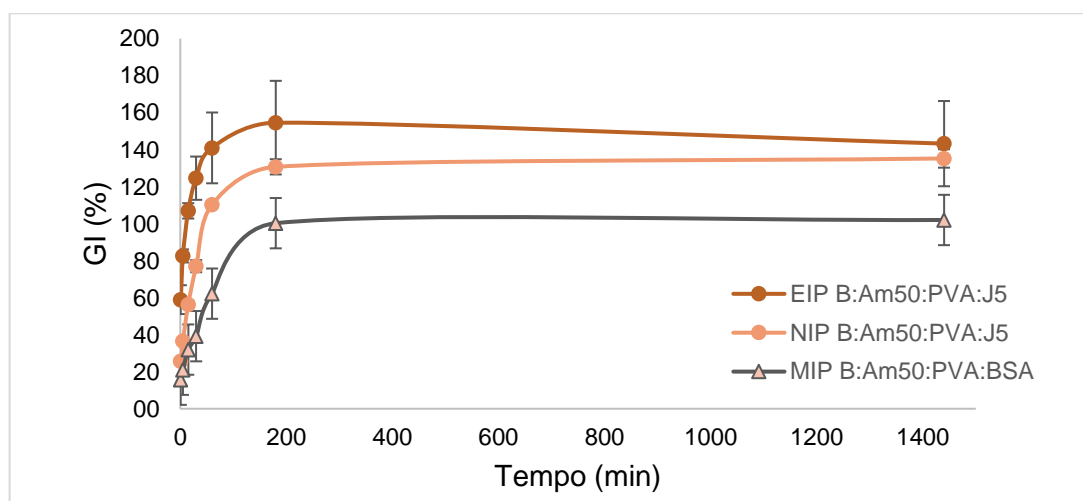


Figura 5.10 Amostras *bulk* com PEGDA como reticulante, MIP (de albumina) e EIP de J5 e NIP com acréscimo de 10%PVA m/m. Feito pela autora.

Como citado na seção na Revisão da literatura, tópico 3.1.6, os hidroMIPs de monômeros aniônicos, como o ácido acrílico, estarão parcialmente desprotonados em pH neutro, como o da água do ensaio de intumescimento, formando íon carboxilato (COO^-) dentro da rede polimérica, resultando em repulsão eletrostática entre as cadeias, permitindo maior hidratação. As amostras com PVA em sua composição apresentaram intumescimento maior e uma explicação é a presença de um composto hidrofílico na rede (PVA),

5.1.3 Espectroscopia infravermelho das amostras *bulk*

A literatura apresenta o espectro de infravermelho do hidrogel poli(acrilamida-co-ácido acrílico), Figura 3.12, e a tabela 5.1 apresenta um compilado com os valores de número de onda dos principais grupos químicos presentes nas amostras deste trabalho.

Tabela 5.1 – Número de onda em espectros FTIR referentes a este trabalho

Número de onda (cm⁻¹)	Grupo químico	Polímero correspondente	Referência
3000-3600	Estiramento -OH	PVA	MANSUR, H <i>et al.</i> , (2004)
3404	Estiramento N-H	PAM	SINGHAL, N. A., (2007)
3340	Estiramento O-H	PAAc	CIARDELLI, G. <i>et al.</i> , (2001)
3191	Estiramento N-H	PAM	TOMAR, R. S. <i>et al.</i> , (2007)
3125	Estiramento O-H	PAA	LIM, M. <i>et al.</i> , (2016)
2943	Vibrações de alongamento C-H		BAI.J.; LI, Y. <i>et al.</i> , (2007)
2923	Estiramento CH ₂	PVA	MANSUR, H <i>et al.</i> , (2004)
2877	Estiramento C-H e CH ₂	PEGDA	CHEN, X. <i>et al.</i> , (2007)

1724	C=O	PEGDA	FARSHID, Z. <i>et al.</i> , (2007)
1721	Estiramento C=O	PAA	CIARDELLI, G. <i>et al.</i> , (2001)
1656	Vibrações de estiramento C=O	PAM	TOMAR, R. S. <i>et al.</i> , (2007)
1636	C=C	PEGDA	CHEN, Z.P. <i>et al.</i> , (2009)
1600	Dobramento NH ₂	PAM	CRACIUN, G. <i>et al.</i> , (2015)
1455	Dobramento angular CH ₂	PEGDA/PAA	CHEN, Z.P. <i>et al.</i> , (2009)
1454	Vibração de cisalhamento - CH ₂	PAA/PEGDA	LIM, M. <i>et al.</i> , (2016)
1107	C-O-C	PVA	IMANI, M. <i>et al.</i> , (2007)

A Figura 5.11 apresenta os espectros no infravermelho das amostras *bulk*, o espectro do reticulante, além do espectro de uma amostra sem acrilamida e outra amostra sem ácido acrílico, mas mantendo os reagentes utilizados no processo *bulk*, como reticulante, fotoiniciador e solvente (amostras PAAc e PAM, respectivamente).

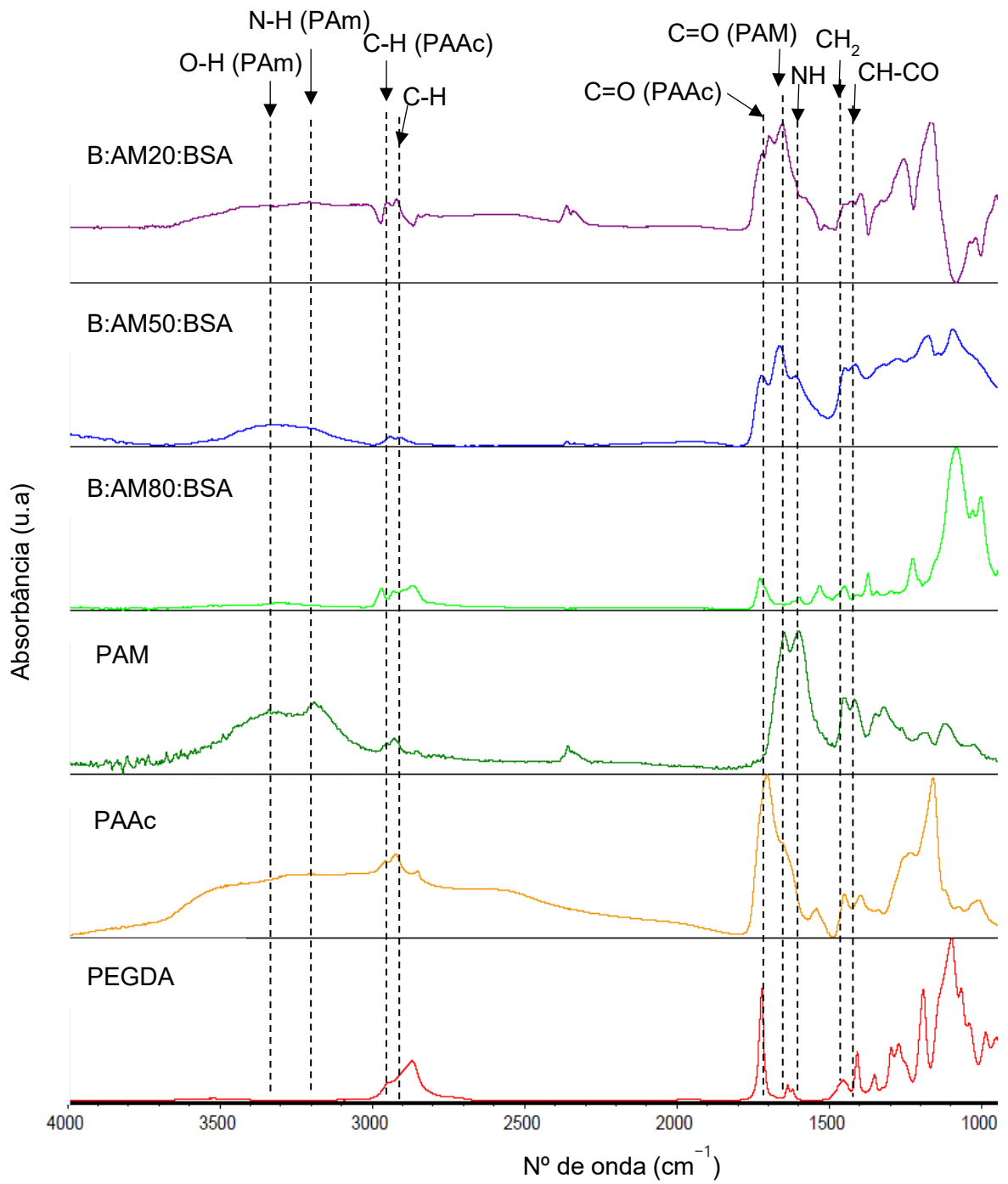


Figura 5.11 Espectros no infravermelho das amostras *bulk* AM20, AM50 e AM80, das amostras sem ácido acrílico e sem acrilamida (PAM e PAAc) e do reticulante PEGDA.

Esses espectros apresentam bandas de absorção em 3340, 3191 e 2.943 cm^{-1} relacionadas às vibrações de alongamento O-H, NH e CH, respectivamente. Conforme visto na Figura 5.11, as bandas de absorção referentes ao grupo C=O do ácido acrílico e acrilamida (1721 e 1656 cm^{-1}) estão presentes nas amostras *bulk*, além da banda NH₂ da acrilamida (1600 cm^{-1}). Estes são os grupos funcionais que se espera que interajam com a molécula alvo (albumina ou J5). Os resultados de FTIR foram úteis para demonstrar que as redes poliméricas obtidas continham os monômeros selecionados (AAc, AM e PEGDA). Infelizmente, a quantidade de albumina e epítipo utilizada na preparação de MIPs e EIPs (perto de 0,5% em peso) foi inferior ao limite de detecção desta técnica de caracterização. Portanto, nenhuma informação sobre as moléculas alvo pôde ser observada nos espectros de FTIR de MIPs e EIPs que não passaram pelos procedimentos de lavagem (espectros não mostrados na Figura 5.11).

5.2 Ensaio de religação de BSA

O ensaio de religação foi executado de forma a avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros sintetizados. Assim, a religação da BSA nos polímeros MIPs (após a extração) e NIPs foi verificada.

A concentração da solução de BSA utilizada foi proporcional à quantidade de cavidades presentes na massa de polímero utilizado neste ensaio, considerando que cada molécula de proteína presente produziu uma cavidade, de acordo com a Equação 5.1.

$$\frac{0,0016g \text{ BSA}}{0,352g \text{ reagentes}} \times 0,01g \text{ de amostra} = 45 \times 10^{-6}g \text{ BSA ou } 45\mu g \text{ de BSA} \quad \text{Eq. 5.1}$$

Onde massa de reagentes envolve a soma dos monômeros, reticulante, fotoiniciador e, nas amostras eletrofiadas, PVA.

Como as cubetas de UV-vis comportam em torno de 3mL, o volume utilizado para a religação de cada amostra foi de 4mL, sendo necessária uma solução de, pelo menos, 11,25 µg/mL.

Deste modo, foram adicionadas amostras de 0,01g em contato com a solução de 20 µg/mL de BSA por 3h (tempo indicado pelo ensaio de intumescimento – Resultados e Discussão, tópico 5.1.1). Após esse período de espera as amostras foram centrifugadas por 5min e alíquotas de 4mL foram lidas no espectrofotômetro UV-vis.

Neste trabalho, amostras *bulk* MIP preparadas com albumina foram produzidas e testadas para obter informações importantes sobre a composição e condições de polimerização que produziriam maiores capacidades de religação (Q) com a molécula alvo. Esta informação foi então útil para a produção de nanofibras eletrofiadas com o epítipo SARS-CoV-2 Spike.

Como pode ser visto na Figura 5.12, os maiores valores de Q (próximos a 28.000 µg/g) foram observados para MIPs sem PVA e com alta concentração de acrilamida (mas com comportamento de inchamento que indica instabilidade da rede que não é adequada para a aplicação pretendida, como comentado antes). Os segundos maiores valores de Q foram observados para amostras com proporção de 50% de acrilamida/ácido acrílico (valores próximos a 20.000 µg/g). Já, MIPs e EIPs contendo PVA apresentaram valores de Q inferiores e próximos de 10.000 µg/g. Esta diminuição em Q pode ser devida à redução na densidade de ligações cruzadas nas redes obtidas com PVA (ZHANG *et al.*, 2005), e os resultados da Figura 5.10 mostram o grau de intumescimento das amostras com PVA, superiores às amostras sem PVA. Graus mais elevados de intumescimento podem danificar as cavidades do MIP, reduzindo a capacidade geral de interagir especificamente com a biomolécula alvo. A reação de esterificação entre o PVA e o ácido acrílico também pode ter afetado a especificidade das cavidades formadas, reduzindo o número de grupos carboxílicos disponíveis. A Tabela 5.2 apresenta os valores médios da concentração do eluente (Co, Ct),

capacidade média de religação das amostras EIP e NIP (Q) e fator de impressão (IF). Os valores de Q das amostras globais (MIP, EIP e NIP) foram testados estatisticamente utilizando testes de Tukey e Anova (confiança de 95%). Observou-se que os valores de Q da MIPs e EIPs foram estatisticamente diferentes dos NIPs correspondentes. O resultado geral mostrou que foram obtidos MIPs e EIPs em “*bulk*” com IF superior a 1, indicando que as interações entre esses materiais e as biomoléculas alvo têm maior especificidade do que os NIPs correspondentes. Este resultado também indica a viabilidade do uso de epítomos derivados do SARS-CoV-2 como molécula imprimível para produzir anticorpos sintéticos para o diagnóstico de COVID19. A redução no valor Q da amostra EIP (B:AM50:PVA:J5) baseada em J5 em comparação com as amostras MIP derivadas de albumina e com os mesmos conteúdos de acrilamida e PVA (B:AM50:PVA:BSA) pode estar relacionado ao fato de que alguns grupos carboxílicos das unidades de ácido acrílico foram consumidos durante a reação com o PVA, levando a uma carga final da superfície mais positiva e menos estimulada a interagir com J5 (que também é carregado positivamente).

A Figura 5.13 mostra a religação de J5 em função do tempo nos EIPs preparados em “*bulk*” impressos em J5. Como pode ser visto nesta figura, a capacidade de adsorção do J5 tendeu a aumentar com o tempo e atingiu um valor de saturação aos 180 min. O tempo de 180 min envolve o tempo necessário para ocorrer o intumescimento e o tempo gasto no processo de religação. É possível que este tempo de saturação possa ser drasticamente reduzido usando-se amostras inchadas em vez de amostras secas.

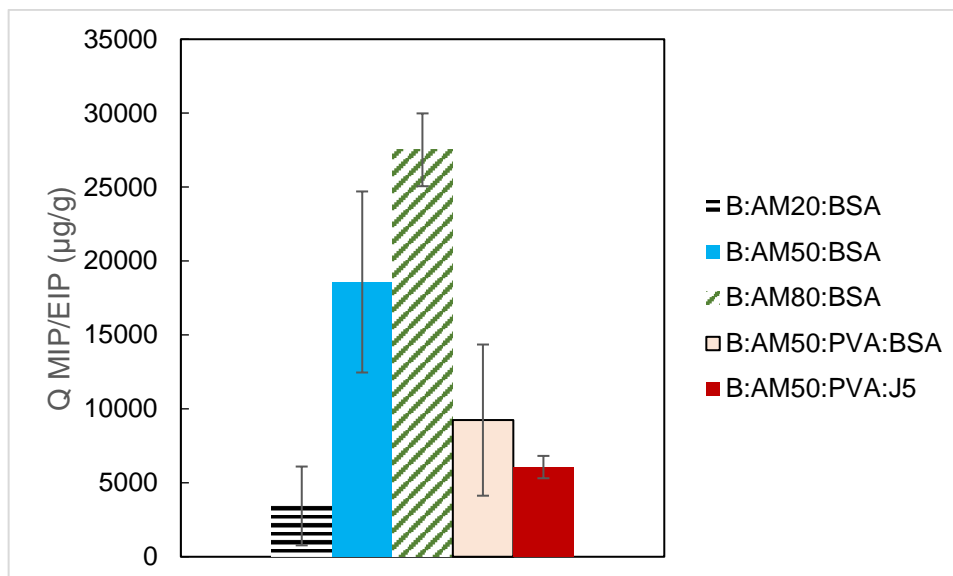


Figura 5.12. Capacidades de religação (Q) de amostras em massa MIP e EIP.

Tabela 5.2 Valores médios de concentração de eluente (C_0 , C_t), capacidade de religação das amostras MIP, EIP e NIP (Q) e fator de impressão para cada uma das amostras *bulk*.

Amostra	C_0 (µg/mL)	C_t EIP (µg/mL)	C_t NIP (µg/mL)	Q EIP (µg/g)	Q NIP (µg/g)	IF
B:AM20:BSA	11,4	1,4	6,1	3437	1738	2,1
Desvio padrão	-	>1,4	2,3	2664	388	1,9
B:AM50:BSA	69,4	37,4	26,1	18583	7023	2,7
Desvio padrão	-	7,2	9,5	6122	1404	0,9
B:AM80:BSA	69,4	39,4	20,7	27523	13523	2,1
Desvio padrão	-	2,0	1,2	2461	2481	0,5
B:AM50:PVA:BSA	69,4	41,4	38,1	9241	6804	1,4
Desvio padrão	-	4,0	4,6	5112	3636	0,3
B:AM50:PVA:J5	31,9	22,2	26,2	6065	4568	1,4
Desvio padrão	-	0,4	0,4	755	602	0,3

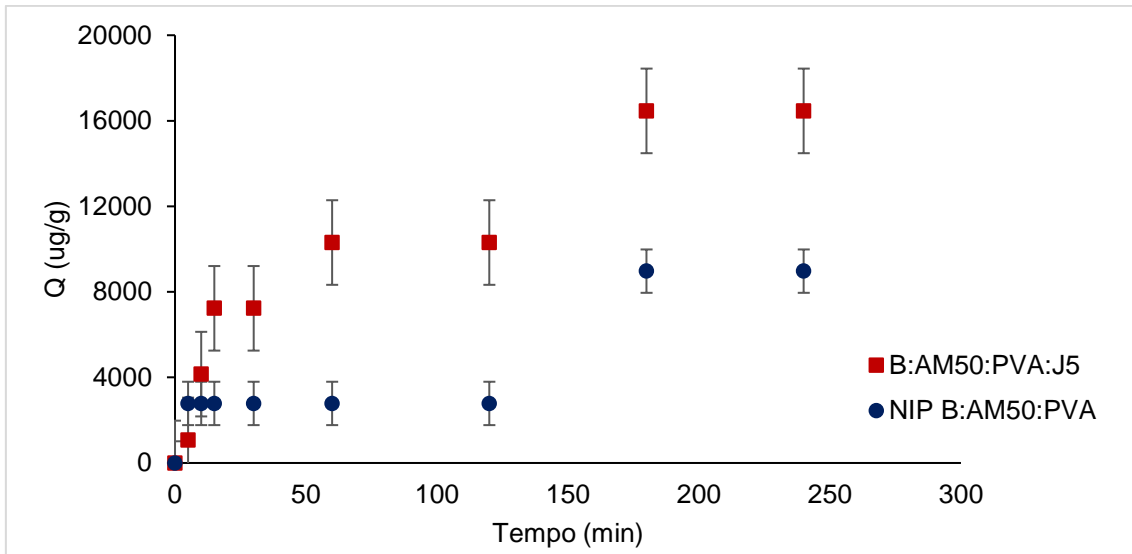


Figura 5.13 O efeito do tempo na religação do J5 no EIP (amostras em massa impressas no J5).

5.3 Resultado das mantas eletrofiadas

5.3.1 Síntese e resultado das mantas eletrofiadas de MIP e NIP

As mantas eletrofiadas de MIPs e NIPs foram obtidas conforme o processo de síntese descrito na Metodologia (subitem 4.3.3), conforme é visto na Figura 5.14.

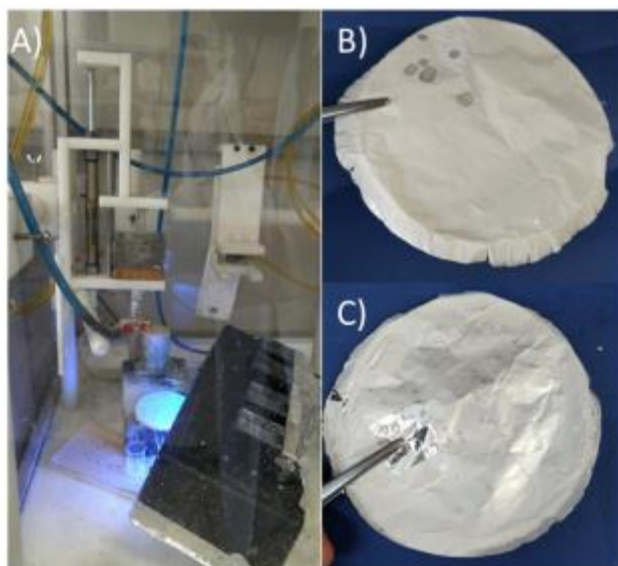


Figura 5.14 Síntese dos MIPs e NIPs pelo processo de polimerização por eletrospiação reativa. A) Eletrofiador com câmara de radiação UV acoplada, B) Manta de MIP eletrodepositada em papel alumínio, C) Manta de NIP eletrodepositada em papel alumínio. Feito pela autora.

O grande desafio desta etapa do projeto foi a obtenção de fibras, pois as primeiras amostras obtidas possuíam morfologia de gotas, conforme imagens obtidas por microscópio óptico apresentadas na Figura 5.15.

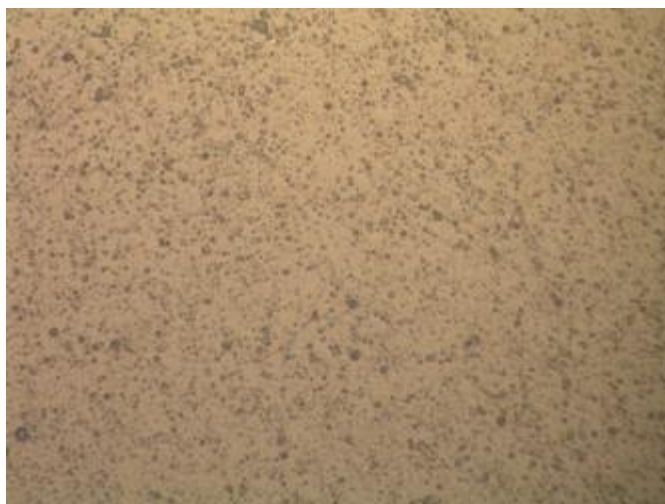


Figura 5.15 Amostra Nf:AM50:PVA por microscopia óptica. Sem aquecimento prévio. Umidade relativa do ar em 63%. Ampliação 100X.

Foi necessário fazer o aquecimento da amostra com PVA, conforme cita MIRANDA (2017), induzindo a formação de ésteres, conforme ilustra a Fig.4.6, antes de adicionar a MM para prevenir de desnaturalizá-la com a temperatura.

Além do aquecimento da solução com PVA, foi importante observar a umidade relativa do ar durante a eletrofiação. Melhores resultados foram obtidos para umidades em torno de 30 a 40%. Para esse objetivo foram adicionados dentro do eletrofiador recipientes com sílica gel e, no laboratório, foi ligado um desumidificador de ar – Arsec. A microscopia óptica após essas medidas são mostradas na Figura 5.16.

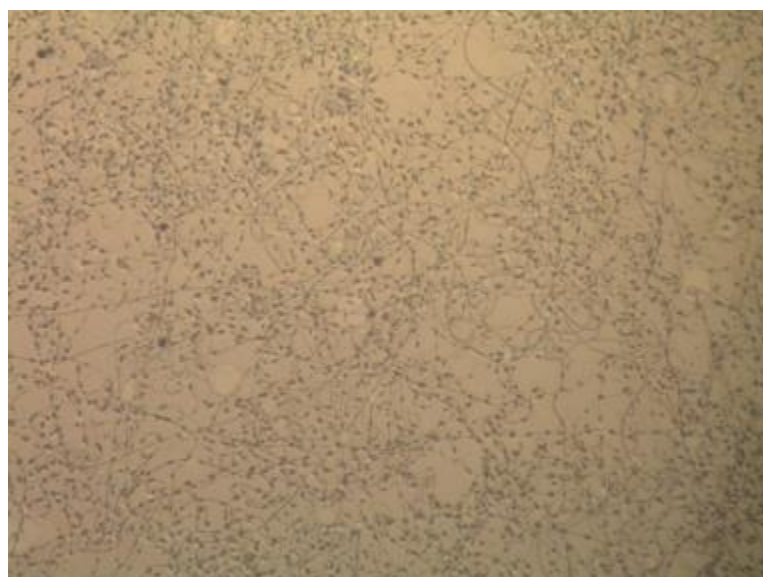


Figura 5.16 Amostra Nf:AM50:PVA por microscopia óptica. Com aquecimento prévio da solução. Umidade relativa do ar em 32%. Ampliação 500X.

Estudo de caracterização: Na Figura 5.17, são mostradas imagens MEV das fibras eletrofiadas de tamanho nanométrico MIP, EIP e NIP preparadas com albumina, J5 e sem biomoléculas, respectivamente. Nas Figuras 5.17A, 5.17B e 5.17C, fibras Nf:AM50:BSA com diâmetro médio de 400nm podem ser vistas com muitos defeitos como grânulos. A presença desses grânulos em fibras interligadas pode indicar que a viscosidade da solução precursora foi adequada para produzir uma rede de fibras não tecidas, mas baixa para evitar a formação dos grânulos (YUAN *et al.*, 2012). A

presença de grânulos nanométricos interligados não é prejudicial para a aplicação pretendida como MIP e EIP, uma vez que esses grânulos muito pequenos ainda podem ter cavidades derivadas de moléculas que são úteis para fins de detecção. Além disso, não foram tomadas ações para aumentar a viscosidade da solução aumentando-se a concentração de PVA, uma vez que esta estratégia poderia levar a uma rede polimérica menos estável e com menor especificidade para interações com as biomoléculas alvo.

A amostra eletrofiada EIP (Figura 5.17F) apresentou fibras com diâmetro médio menor (em torno de 70 nm) e alta dispersão nos valores de diâmetro quando comparada às fibras MIP e NIP. É possível que o epítipo J5 de baixo peso molecular tenha agido como um plastificante, reduzindo a viscosidade da solução global e da rede polimérica que resultaria numa redução do diâmetro das fibras eletrofiadas. Além disso, a carga líquida positiva do J5 (SANTOS, B. *et al.*, 2022) pode afetar a condutividade elétrica da solução, o que poderia resultar em gotas de solução altamente esticadas durante a aplicação do potencial elétrico e em fibras mais finas.

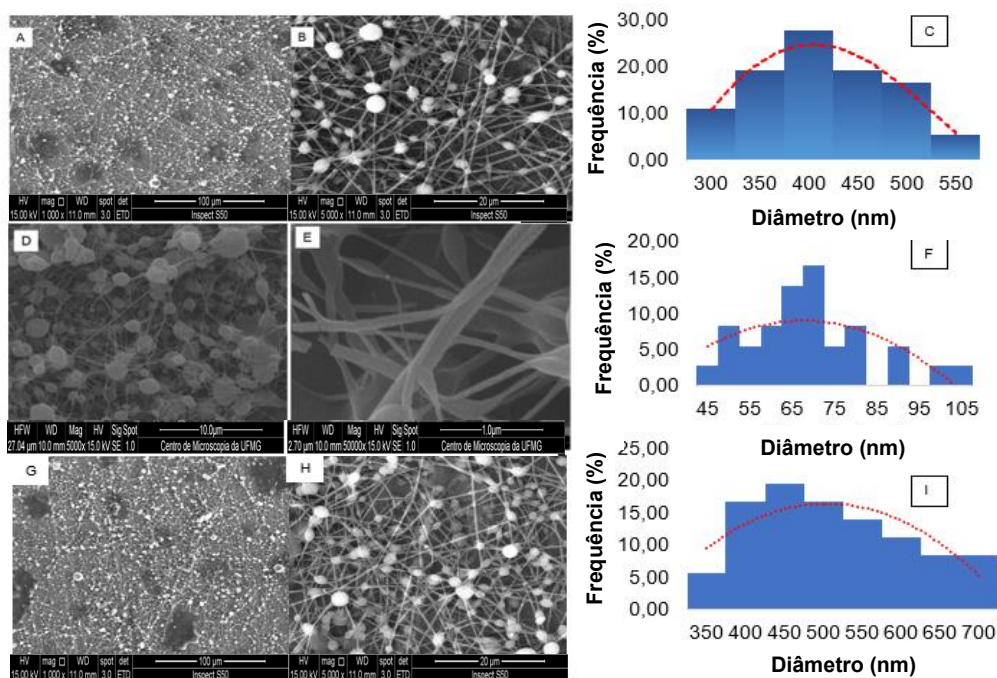


Figura 5.17: Imagens MEV e distribuição de tamanho das fibras obtidas: A) Nf:AM50:BSA, ampliação 1000x, B) Nf:AM50:BSA ampliação, 5000x, C) Nf:AM50:BSA, distribuição de

diâmetro, D) Nf: AM50:J5, ampliação 5000x, E) Nf:AM50:J5, ampliação 50000x, F) Nf:AM50:J5, distribuição de diâmetro, G) Nf:AM50 NIP, ampliação 1000x, H) Nf:AM50 NIP, ampliação, 5000x, I) Nf:AM50 NIP, distribuição de diâmetro.

Os espectros de infravermelho das amostras eletrofiadas são mostrados na Figura 5.18. As bandas de absorção referentes ao grupo C-O-C do PVA (1107 cm^{-1}) estão presentes nas amostras de nanofibras, assim como as bandas características da acrilamida, C=O em 1656 cm^{-1} , NH_2 em 1600 cm^{-1} e ácido acrílico em 3125, 2923, 2943 e 1721 cm^{-1} relacionadas às vibrações de estiramento O-H, C-H e CH_2 e C=O, respectivamente. Os espectros na Figura 5.18 são semelhantes aos mostrados na Figura 5.11 relacionados às amostras em massa correspondentes, com exceção da presença de bandas características de PVA nas amostras eletrofiadas. Esses resultados indicam que a composição projetada das fibras foi realmente obtida.

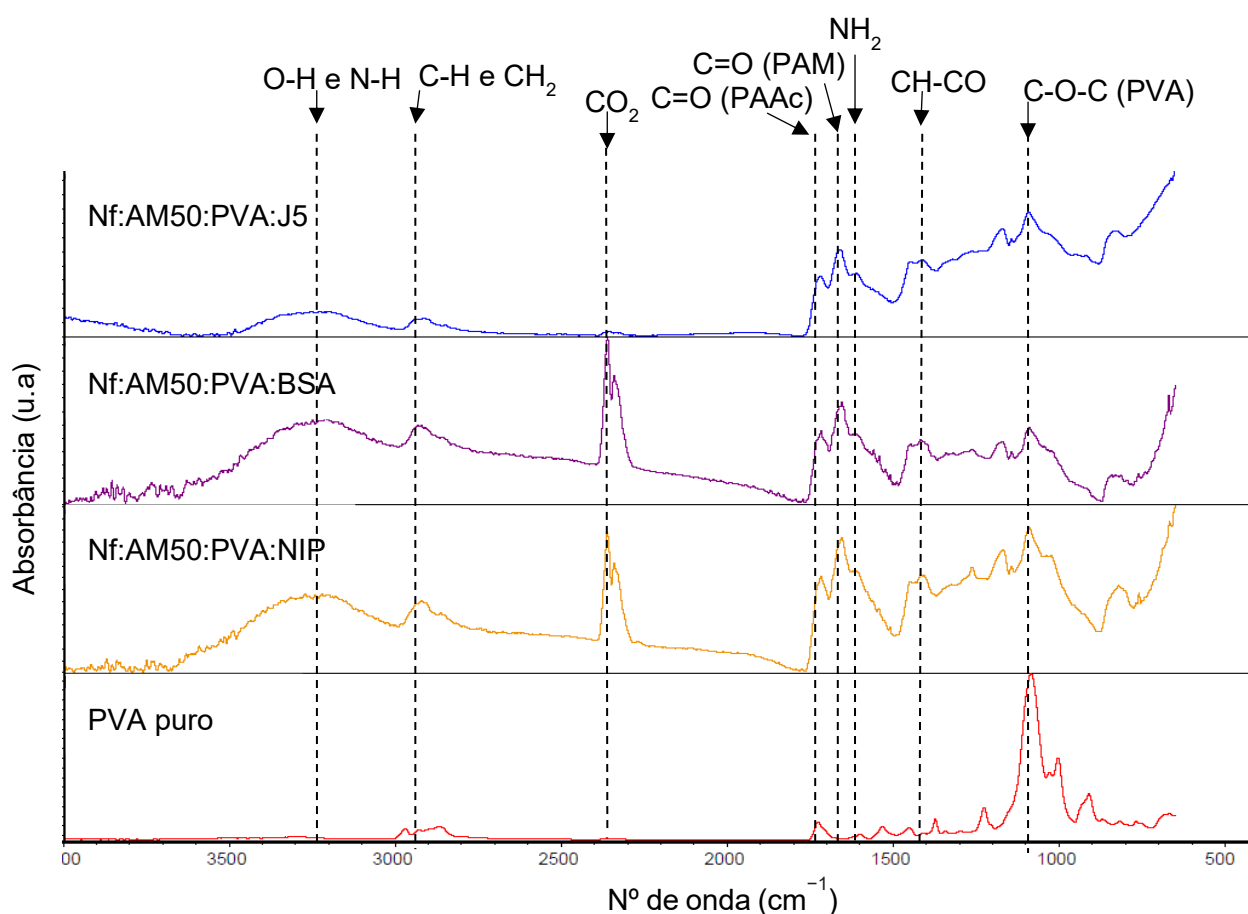


Figura 5.18: Espectros infravermelho de fibras das amostras Nf:AM50:PVA:J5, Nf:AM50:PVA:BSA, Nf:AM50:PVA:NIP e PVA puro.

Estudo de religação de BSA e J5 em amostras eletrofiadas: conforme visto na Figura 5.19, a amostra Nf:AM50:PVA:BSA apresentou o maior valor de Q, em torno de 49.000 $\mu\text{g/g}$. Quando o epítipo J5 foi empregado como modelo molecular, Nf:AM50:PVA:J5, a amostra apresentou um valor de Q de 12.000 $\mu\text{g/g}$, enquanto as nanofibras não impressas apresentaram um Q de cerca de 5.000 $\mu\text{g/g}$. Uma análise estatística aplicada a estes dados Q mostrou que estes valores são todos estatisticamente diferentes entre si (testes Tukey e Anova, confiança de 95%).

As nanofibras impressas com BSA provavelmente obtiveram valores de religação Q mais elevados em comparação com as amostras impressas com o epítipo SARS-CoV-2 porque possuem cavidades de tamanho relativo maior que podem ser menos

suscetíveis à distorção durante o inchaço do que pequenas cavidades derivadas da impressão J5. Outro fator a ser levado em consideração é a composição do copolímero, que, devido à reação de esterificação entre grupos PVA e grupos ácido acrílico, necessária para atingir uma viscosidade adequada para tornar a solução fiável, reduziu os grupos -COOH disponíveis para interação com o epítipo, mas não interferiu na quantidade de grupos -NH₂ protonados que interagem com a albumina, com carga negativa parcial.

Em comparação com as amostras “*bulk*”, as nanofibras MIP com impressões de BSA apresentaram valores de Q mais elevados do que as amostras MIP “*bulk*” também impressas com BSA (Q.B.:AM50:PVA:BSA foi de cerca de 9.000 µg/g). Já, valores de Q muito mais semelhantes, mas ainda mais elevados, foram observados para nanofibras EIP impressas com o epítipo J5 quando comparados com EIP em “*bulk*” (QB:AM50:PVA:J5 foi de 6.000 µg/g). Esta tendência de aumento de Q de amostras *bulk* para amostras eletrofiadas sugere que a alta área superficial das fibras pode levar a níveis mais elevados de interação de biomoléculas, uma vez que uma fração maior das cavidades de impressão pode ser exposta e adequada para o processo de religação de biomoléculas.

A Tabela 5.3 apresenta os valores de concentração do eluente (Co, Ct), capacidade de religação das amostras EIP e NIP (Q) na morfologia das nanofibras e fator de impressão (IF). Como foi comentado para as amostras a *bulk*, os resultados obtidos mostram que as nanofibras MIPs e EIPs apresentaram um IF superior a 1, o que indica um maior grau de especificidade entre a biomolécula alvo e os MIPs e EIPs eletrofiados do que os NIPs correspondentes. Os valores de IF de MIPs e EIPs preparados como amostras “*bulk*” ou fibra foram semelhantes.

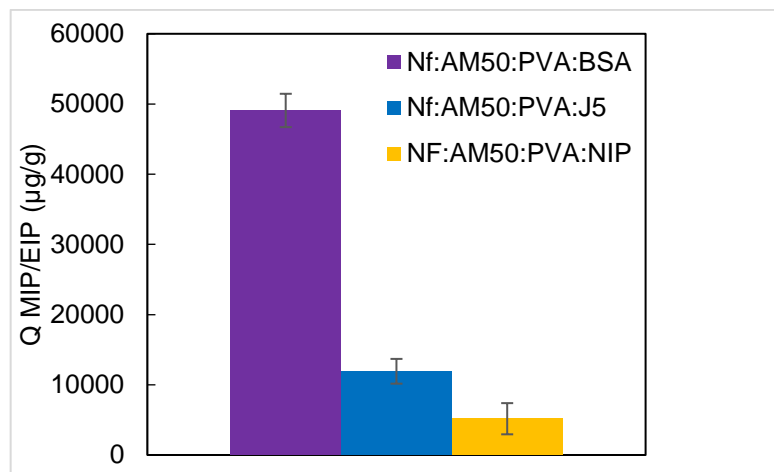


Figura 5.19: Capacidades de religação (Q) de amostras de nanofibras.

Tabela 5.3 Valores de concentração do eluente (Co, Ct), capacidade de religação das amostras EIP, MIP e NIP (Q) e fator de impressão para cada uma das amostras eletrofiadas.

Amostra	Co (µg/mL)	Ct EIP (µg/mL)	Ct NIP (µg/mL)	Q EIP (µg/g)	Q NIP (µg/g)	IF
Nf:AM50:PVA:BSA	31,9	21,7	22,6	49074,8	27093,1	2,0
Desvio padrão	-	0,4	2,9	2374,6	9182,0	0,9
Nf:AM50:PVA:J5	31,9	26,9	27,7	11923,0	5163,3	2,7
Desvio padrão	-	0,7	0,4	1762,5	2221,1	1,3

Os valores de Q EIP e Q NIP tanto para as amostras *bulk* quanto para as amostras em nanofibras passaram por teste de variância Anova (confiança de 95%) apresentando p-valor menor do que 0,05, indicando que os resultados são distintos entre si. (Amostras *bulk* com p-valor de 0,00011 e amostras eletrofiadas com p-valor de $3,7 \times 10^{-7}$).

6. CONCLUSÕES

A partir da revisão da literatura e dos resultados obtidos, conclui-se que foi demonstrada a possibilidade de preparar polímeros impressos em epítopo (EIP) para atuarem como anticorpos sintéticos, utilizando o epítopo da proteína spike do SARS-CoV-2 como modelo molecular (denominado J5). Além disso, EIPs com J5 impresso também foram preparados usando um processo de eletrofiação reativa que produziu com sucesso fibras eletrofiadas EIP através da combinação de eletrofiação e fotopolimerização de monômeros à base de acrilamida/ácido acrílico. A fim de explorar e testar as condições de processamento, a albumina de soro bovino (BSA) também foi utilizada como molécula modelo para produzir polímeros de impressão molecular (MIP) na forma de amostras “*bulk*” e fibras. Os resultados de FTIR mostraram que a composição das amostras preparadas por *bulk* e eletrofiadas foi obtida conforme planejado. Imagens MEV mostraram que as fibras eletrofiadas com diâmetros nanométricos e contendo grânulos de tamanho nanométrico foram obtidas com sucesso pela estratégia de eletrofiação reativa. As fibras preparadas com J5 como molécula impressa tinham diâmetros (cerca de 70 nm) muito menores que as fibras eletrofiadas com BSA (cerca de 400 nm), como possível consequência da carga positiva associada ao J5 que pode aumentar a condutividade elétrica da solução de eletrofiação, além do epítopo J5 de baixo peso molecular poder ter agido como um plastificante, reduzindo a viscosidade da solução global e da rede polimérica que resultaria numa redução do diâmetro das fibras eletrofiadas. Tanto MIPs quanto EIPs em massa (“*bulk*”) e nanofibras apresentaram fatores de impressão superiores a 1, o que pode significar que os materiais obtidos estão na verdade agindo como anticorpos sintéticos com especificidades associadas às biomoléculas definidas. A capacidade de religação (Q) que mede a quantidade de biomolécula que pode se ligar aos polímeros impressos foi maior para amostras preparadas com a morfologia de fibra de tamanho nanométrico quando comparada com as amostras em massa (“*bulk*”) correspondentes, particularmente quando BSA foi usada como molécula impressa: Q para amostras de fibra impressas em BSA foi $49074 \pm 2374 \mu\text{g/g}$, enquanto Q para amostras “*bulk*” impressas em BSA foi $9241 \pm 5112 \mu\text{g/g}$. A capacidade de religação (Q) também foi maior quando J5 foi impresso em nanofibras ($Q = 11923 \pm 1762 \mu\text{g/g}$)

do que J5 impresso em amostras *bulk* ($Q = 6065 \pm 755 \mu\text{g/g}$). Esse resultado pode implicar que as biomoléculas impressas em fibras de tamanho nanométrico podem levar a níveis mais elevados de cavidades expostas (derivadas das moléculas impressas) que podem interagir com a biomolécula alvo. Finalmente, os resultados deste trabalho indicam que anticorpos sintéticos baseados na impressão de epítomos (como no caso do epítomo do SARS-CoV-2) em fibras eletrofiadas podem ser úteis como um componente importante em biossensores mais estáveis, processáveis e reproduzíveis para monitorar e detectar uma série de doenças, como a COVID19.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um perfil de estudo das ligações químicas: cinética de ligação, isoterma de ligação, seletividade de ligação (nos testes de seletividade, escolher proteínas que coexistam com o alvo na mesma amostra, podendo causar erros reais na análise).
- Avaliar a estabilidade do polímero ao longo de um determinado período de semanas, para verificar o desempenho no uso de sensores, estabelecendo um prazo em que os resultados do sensor serão considerados confiáveis e reproduzíveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAI,J.; LI, Y.; DU, J.; WANG, S.; ZHENG, J.; YANG, Q.; CHEN, X. One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite, *Materials Chemistry and Physics*, p. 412-415, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.06.021>>.

BYRNE, Mark E; PARK, Kinam; PEPPAS, Nicholas A. Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 1, p. 149-161, 2002.

BISSANTZ, Caterina; KUHN, Bernd; STAHL, Martin. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 14, p. 5061–5084, 2010.

BUI, Bernadette Tse Sum. Molecularly imprinted polymers: synthetic receptors in bioanalysis. Review. *Springer*, v. 398, p. 2481–2492. September, 2010.

CENNAMO, Nunzio *et al.* Proof of concept for a quick and highly sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 by plasmonic optical fibers and molecularly imprinted polymers. *Sensors*, v. 21, n. 5, p. 1–17, 2021.

CHEN, Zhiyong; YE, Lei. Controlling size and uniformity of molecularly imprinted nanoparticles using auxiliary template. *Journal of Molecular Recognition*, v. 25, n. 6, p. 370–376, 2012.

CHEN.Z.P., Zhang.Y e Ning.G.U, “Effects of Proteins from Culture Medium on Surface Property of Silanes- Functionalized Magnetic Nanoparticles,” *Nanoscale Research Letters*, pp. 204-209, 2009.

CHEN.X, Bai.J e Wang.S, “One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite,” *Materials Chemistry and Physics*, pp. 412-415, 2007.

CHRONAKIS *et al.* Generation of Molecular Recognition Sites in Electrospun Polymer Nanofibers via Molecular Imprinting. *Macromolecules*, 39, 1, p.357–361, 2006.

CIARDELLI, G.; BARBANI, N.; RAINALDI, I.; GIUSTI, P.; CRISTALLINI, C. Kinetics and reaction mechanism of template polymerization investigated by conductimetric measurements Part 4. Radical polymerization of acrylic acid in the presence of poly(vinylalcohol): characterization of resulting polymer blends, *Polymer International*, n. 50, p. 588-596, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pi.670>>.

CRACIUN.G.; IGHIGEANU, D.; MANAILA, E.; STELESCU, M. D. Synthesis and Characterization of Poly(Acrylamide-Co-Acrylic Acid) Flocculant Obtained by Electron Beam Irradiation, *Materials Research*, v. 18, p. 1516-1439, 2015. Available in: <<https://doi.org/10.1590/1516-1439.008715>>.

CUNNINGHAM, M.F. *et al.* Measuring the effects of dissolved oxygen in styrene emulsion polymerization. *Polymer*, v. 41, n. 14, p. 5385-5392, 2000.

FARSHID.Z., HAMID.M. e MOHAMMAD.I, “Monitoring of Polyethylene Glycoldiacrylate-based Hydrogel Formation by Real Time NMR Spectroscopy,” *Iranian Polymer Journal*, nº 16, pp. 13-20, 2007.

FOKOUE, Harold H. *et al.* Is there anything new about the molecular recognition applied to medicinal chemistry? *Química Nova*, v. 43, n. 1, p. 78–89, 2020.

FRESCO-CALA, Beatriz *et al.* Development and characterization of magnetic SARS-CoV-2 peptide-imprinted polymers. *Nanomaterials*, v. 11, n. 11, 2021.

GAI, Q. *et al.* The preparation of bovine sérum albumin surface-imprinted superparamagnetic Polymer with the assistance of basic functional monomer and its application of protein separation, *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 22, p. 3489-3495, 2011.

GOUD, K. Yugender *et al.* Electrochemical diagnostics of infectious viral diseases: Trends and challenges. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 180, n. January, p. 113112, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113112>>.

HASSEB, Alaa A. *et al.* Application of molecularly imprinted polymers for electrochemical detection of some important biomedical markers and pathogens. *Current Opinion in Electrochemistry*, v. 31, p. 100848, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100848>>.

HAUPT, Karsten; MOSBACH, Klaus. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews*, v. 100, n. 7, p. 2495–2504, 2000.

HAWKINS, D. M.; STEVENSON, D.; REDDY, S. M. Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs). *Analytica Chimica Acta*. Anais...Elsevier, 22 jun. 2005.

HUANG, Dan Lian *et al.* Application of molecularly imprinted polymers in wastewater treatment: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 2, p. 963–977, 2015.

IMANI, M.; SHARIFI, S.; MIRZADEH, H.; ZIAEE, F. Monitoring of Polyethylene Glycoldiacrylate-based Hydrogel Formation by Real Time NMR Spectroscopy, *Iranian Polymer Journal*, n 16, p. 13-20, 2007.

JIM, X. *et al.* pH-responsive swelling behavior of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) bi-component fibrous hydrogel membranes. *Polymers*, v. 46, n. 14, p. 5149-5160, 2005.

YANO, K. *et al.* Molecularly imprinted polymers for biosensor applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 3, p. 199-204, 1999.

KRATZ, Felix. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 132, n. 3, p. 171-183, 2008.

KRYSCIO, D. R.; PEPPAS, N. A. Surface imprinted thin Polymer film systems with selective recognition for bovine sérum albumin. *Analytica Chimica Acta*, v. 718, n. 9, p. 109-115, 2012.

KRYSCIO, D. R.; PEPPAS, N. A. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 2, p. 461-473, 2012.

LEITE, S. A.F *et al.* “Síntese e caracterização de hidrogéis de acrilamida copolimerizados com metacrilato de lítio, sódio, potássio e amônio”. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009.

LI, Y. *et al.* Effect of crosslinking stage on photocrosslinking of benzophenone functionalized poly(2-ethyl-2-oxazoline) nanofibers obtained by aqueous electrospinning. *European Polymer Journal*, v. 112, p. 24-30, 2019.

LIU, Haiqing *et al.* Electrospun Nanofiber Membranes Containing Molecularly Imprinted Polymer (MIP) for Rhodamine B (RhB). *Advances in Chemical Engineering and Science*, v. 2, n.2, 2012.

LORENZO, Rosa A. *et al.* To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 7, p. 4327–4347, 2011.

MALAMUD, D.; DRYSDALE, T.W. Isoelectric points of proteins: A table. *Analytical Biochemistry*, v. 86, n 2, p. 620-647, 1978.

MAILLEY, D.; HÉBRAUD, A.; SCHLATTER, G. A Review on the Impact of Humidity during Electrospinning: From the Nanofiber Structure Engineering to the Applications. *Macromolecular Materials and Engineering*. John Wiley and Sons Inc, 1 jul. 2021.

MANO, Eloisa Biasotto. Química experimental de polímeros. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MANSUR, H *et al.* Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer*, v. 45. 2004.

MIRANDA, D. O. “Desenvolvimento e Estudo do Efeito de Diferentes Nanoestruturas no Desempenho de Dispositivos Baseados em Hidrogéis Contendo Polímeros Conjugados”, 2017. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

MIRANDA, D. O *et al.* One-step process for the preparation of fast-response soft actuators based on electrospun hybrid hydrogel nanofibers obtained by reactive electrospinning with in situ synthesis of conjugated polymers. *Polymers*, v. 200. 2020.

MOSTAFA, Aya 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*, v. 144, p. 116431, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116431>>.

OHARA, T. *et al.* Acrylic acid and derivatives. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (Ed.). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.

PATEL, Kapil D. *et al.* Molecularly Imprinted Polymers and Electrospinning: Manufacturing Convergence for Next-Level Applications. *Advanced Functional Materials*, v. 30, n. 32, 2020.

PANG, X. *et al.* Synthesis of polyacrylamide gel beads with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of bovine sérum albumin. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 384, p. 225-230, 2006.

PAWŁOWSKI, P. H. Additional Positive Electric Residues in the Crucial Spike Glycoprotein S Regions of the New SARS-CoV-2 Variants. *Infection and Drug Resistance*, v. 14, p. 5099–5105, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IDR.S342068>>.

RAMANAVICIUS, Simonas; JAGMINAS, Arunas; RAMANAVICIUS, Arunas. Advances in molecularly imprinted polymers based affinity sensors (review). *Polymers*. [S.l.]: MDPI AG. , 2 mar. 2021

RAZIQ, Abdul *et al.* Development of a Portable MIP-Based Electrochemical Sensor for Detection of SARS-CoV-2 Antigen. [S.l.: s.n.], 2021.

REN, J. *et al.* Regulated the Swelling Properties of Poly(acrylamide-co-acrylic acid) Hydrogel by Changing the Charge Density. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 224, n. 22, 2023. Disponível em: <<https://doi-org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1002/macp.202300266>>.

REUSCH, W. Visible and ultraviolet spectroscopy. Disponível em: <<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>>.

RICO-YUSTE, Alberto; CARRASCO, Sergio. Molecularly imprinted polymer-based hybrid materials for the development of optical sensors. *Polymers*, v. 11, n. 7, 2019.

SANTOS, B. S. A. S.; CUNHA J. L. R.; CARVALHO I. C.; COSTA J. M. C.; LONGO B. C.; GALINARI G. C. F.; DINIZ P. H. S. M.; MENDES G. M. M.; FONSECA F. G.; ABRAHÃO J. S.; MANSUR A. A. P.; LEITE M. F.; ORÉFICE R. L.; LOBATO Z. I. P.; MANSUR H. S. Nanotechnology meets immunology towards a rapid diagnosis solution: the COVID-19 outbreak challenge. *RSC Advances*, v. 12, n. 49, p. 31711–31728, 4 nov. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/D2RA05096J>>.

SINGHAL, N. A., R, GUPTA. I. E S. R., Synthesis of poly(acrylamide-co-acrylic acid)-based super-absorbent hydrogels by gamma radiation: study of swelling behaviour and network parameters. *Designed Monomers and Polymers*, vol. 10, p. 49–66, 2007.

TARLEY, César Ricardo Teixeira; SOTOMAYOR, Maria Del Pilar Taboada; KUBOTA, Lauro Tatsuo. POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. PARTE 1: PREPARO E APLICAÇÕES DE MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) EM TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p.1076–1086, 2005.

TOMAR, R. S. *et al.* Synthesis of poly(acrylamide-co-acrylic acid)-based super-absorbent hydrogels by gamma radiation: study of swelling behaviour and network parameters. *Designed Monomers and Polymers*, v. 10, n. 1, p. 49-66, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163/156855507779763685>>.

TURIEL, Esther; MARTÍN-ESTEBAN, Antonio. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 668, n. 2, p. 87–99, 2010.

WULFF, Günter. Forty years of molecular imprinting in synthetic polymers: Origin, features and perspectives. *Microchimica Acta*, v. 180, n. 15–16, p. 1359–1370, 2013.

YAN, Hongyuan; KYUNG, Ho Row. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 7, n. 5–6, p. 155–178, 2006.

YUAN, J.; MO, H.; WANG, M.; LI, I.; ZHANG, J.; SHEN, J. Reactive electrospinning of poly(vinyl alcohol) nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 124, p.1067–1073, 2012. Disponível em:< <https://doi.org/10.1002/app.33889>>.

ZHANG, T. *et al.* Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, v. 41, n. 3, p. 423-432, 2005.

9. ANEXO I: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ALBUMINA EM SOLUÇÃO AQUOSA, CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ALBUMINA EM SOLUÇÃO METANOL:ÁCIDO ACÉTICO 70:30 V/V

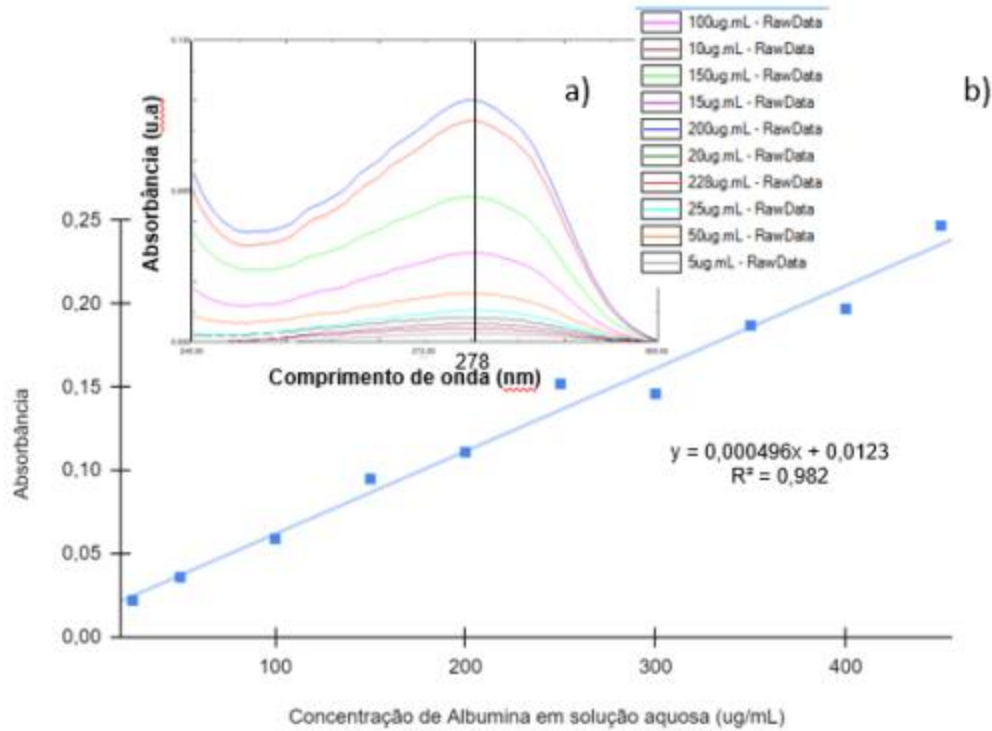


Figura I.1.: Curva de calibração para a albumina em solução aquosa ($\lambda=278$ nm).

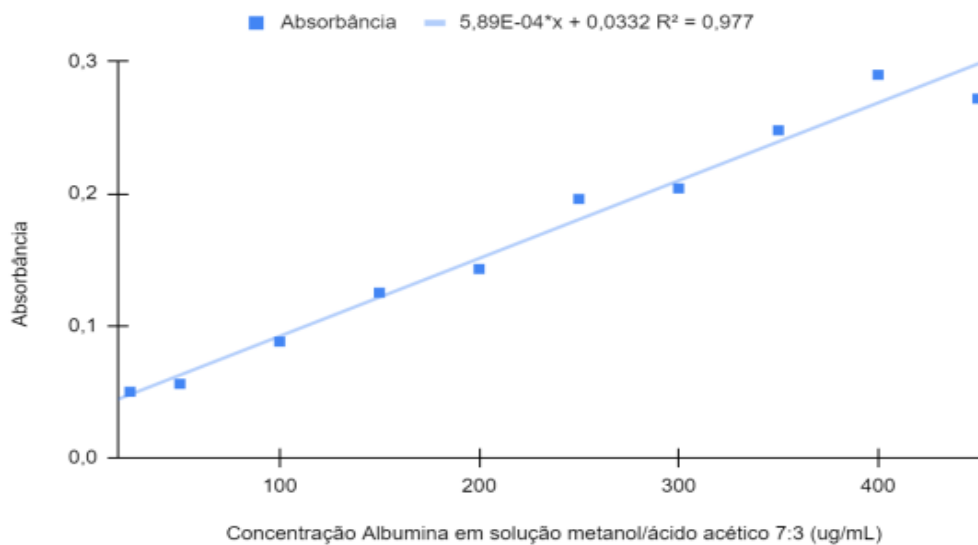


Figura I.2.: Curva de calibração para a albumina em solução metanol:ácido acético (70:30 v/v) ($\lambda=278$ nm).

ANEXO II: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O J5 EM SOLUÇÃO AQUOSA, CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O J5 EM SOLUÇÃO METANOL:ÁCIDO ACÉTICO 70:30 V/V

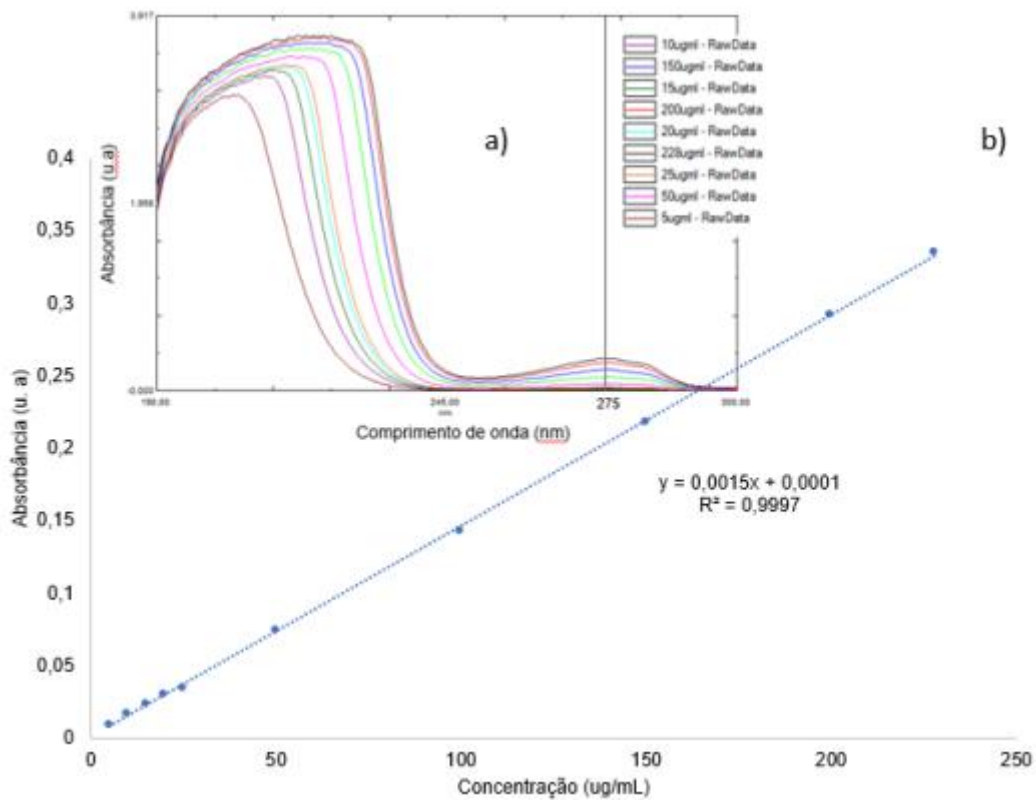


Figura II.1.: Curva de calibração o J5 em solução aquosa ($\lambda=275$ nm, segundo pico de maior intensidade).