



Desenvolvimento de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a análise de um alergénio do ovo de galinha

PEDRO MIGUEL FERNANDES PAIVA

Outubro de 2022

Desenvolvimento de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a análise de um alergénio do ovo de galinha

Outubro 2022

AUTOR

Pedro Miguel Fernandes Paiva

ORIENTAÇÃO

Dr. Hendrikus Nouws

Dr. João Pacheco

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, ramo opcional Energia e Biorrefinaria

Dissertação / Estágio

Agradecimentos

Com a finalização deste projeto de investigação realizado no GRAQ, não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, me apoiarão neste percurso. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos os responsáveis e colaboradores do GRAQ, pela oportunidade concedida que, com certeza, a partir da mesma, levarei imensas aprendizagens. Agradeço imenso aos meus orientadores, Dr. Hendrikus Nouws e Dr. João Pacheco, pelas iniciativas que demonstraram desde início, em compartilhar todos os conhecimentos e, acima de tudo, pelo bem proporcionado ambiente de trabalho.

Um obrigado muito especial à minha família e amigos, por todo o apoio incondicional ao longo desta etapa.

Obrigado assim a todos, visto que, de uma maneira ou outra, me ajudaram e acompanharam ao longo deste percurso.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) / Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais (UIDB/50006/2020, UIDP/50006/2020, LA/P/0008/2020) e através do projeto TracAllerSens - Sensores eletroquímicos para a deteção e quantificação de vestígios de alérgenos em produtos alimentares (POCI-01-0145-FEDER-030735), financiado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização na sua componente FEDER e pela FCT na sua componente nacional.



Sumário

Qualquer alimento pode desencadear uma reação alérgica, contudo, o ovo ocupa um lugar de destaque entre os mais comuns. De entre os 10 alergénios encontrados no ovo da galinha, a ovotransferrina é uma das mais importantes uma vez que pode provocar reações alérgicas mesmo na sua forma desnaturada.

A evicção alimentar é a terapia primária para a alergia alimentar, terapia essa que se complica quando se atenta no risco de contaminação cruzada, que se dá quando dois alimentos entram em contacto, podendo aquele que, à partida, não iria causar uma reação alérgica, passar a conter uma pequena quantidade do alergénio, tornando-se perigoso para o indivíduo com alergia alimentar.

A segurança alimentar ocupa, atualmente, um lugar de destaque nas principais preocupações da indústria alimentar, pelo que o número de estudos realizados no âmbito do desenvolvimento e da aplicação de sensores baseados em polímeros molecularmente impressos (MIP, *Molecularly Imprinted Polymers*) na análise de alergénios alimentares tem aumentado. Devido ao seu baixo custo, facilidade de preparação, portabilidade e sensibilidade, apresentam-se como uma boa solução para a deteção rápida de alergénios. Desta forma, foi desenvolvido um sensor eletroquímico (voltamétrico) específico, baseado num MIP, para a análise da ovotransferrina. O MIP foi sintetizado por eletropolimerização (por voltametria cíclica), utilizando uma solução contendo 4-aminofenol (monómero funcional) e ovotransferrina (template), diretamente na superfície de um elétrodo de carbono serigrafado, previamente modificado com nanopartículas de ouro.

Foram otimizadas as condições de polimerização, extração e incubação, e o desempenho do sensor foi avaliado por voltametria cíclica e voltametria de impulso diferencial. O sensor mostrou uma resposta linear entre o sinal analítico e a concentração de ovotransferrina de 0,010 a 0,50 $\mu\text{g/mL}$, com um limite de deteção de 0,047 $\mu\text{g/mL}$ e um limite de quantificação de 0,16 $\mu\text{g/mL}$. A precisão do método foi aceitável uma vez que o coeficiente de variação foi de 10 %.

Pelas características do sensor, este poderá ter utilidade para aplicação na indústria alimentar.

Palavras-chave: Sensor Eletroquímico, Polímero Molecularmente Impresso, MIP, Alergia alimentar, Ovotransferrina, Ovo, Clara de ovo, SPCE, Elétrodo serigrafado de carbono

Abstract

Any food can trigger allergic reactions; however, eggs are among the most common sources. Among the 10 allergens found in chicken eggs, ovotransferrin is one of the most important because it can cause allergic reactions even in its denatured form.

Food avoidance is the primary therapy for food allergy. This is complicated due to the risk of cross-contamination, which occurs when two foods come into contact, and one that would not initially cause an allergic reaction contains a small amount of the allergen, making it dangerous for the individual with food allergy.

Food safety is currently one of the main concerns of the food industry. For this purpose, the number of molecularly imprinted polymers (MIP) sensors for the analysis of allergens food has increased. Due to their low cost, ease of preparation, portability, and sensitivity, these sensors present a good solution for the analysis of allergens.

In this work, an electrochemical (voltametric) MIP-based sensor was developed for the analysis of ovotransferrin. The MIP was synthesized by electropolymerization (by cyclic voltammetry) using a solution containing 4-aminophenol (functional monomer) and ovotransferrin (template) directly on the surface of a screen-printed carbon electrode, which was previously modified with gold nanoparticles.

The polymerization, extraction, and incubation conditions were optimized, and the sensor's performance was evaluated by cyclic- and differential pulse voltammetry. The sensor showed a linear relationship between the analytical signal and the ovotransferrin concentration between 0.010 and 0.50 $\mu\text{g/mL}$, with a detection limit of 0.047 $\mu\text{g/mL}$ and a limit of quantitation of 0.16 $\mu\text{g/mL}$. The precision of the method was acceptable because the coefficient of variation was 10 %.

Due to the characteristics of the sensor, it may be useful for application in the food industry.

Keywords: Electrochemical sensor, Molecularly Imprinted Polymer, MIP, Food allergy, Ovotransferrin, Egg, Egg White, Screen-printed electrode, SPCE

Índice

Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Tema e Objetivos de Estágio.....	1
1.3 Organização do Relatório.....	1
2 Fundamentos Teóricos	3
2.1 Alergia Alimentar.....	3
2.1.1 Definição da doença e caraterísticas epidemiológicas	4
2.1.2 Mecanismos imunológicos	5
2.1.3 Alimentos e alergénios alimentares.....	5
2.1.4 Manifestações clínicas e severidade.....	7
2.1.5 Tratamento e Prevenção	7
2.1.6 Métodos de análise de alergénios.....	9
2.2 Voltametria.....	9
2.2.1 Voltametria cíclica	11
2.2.2 Voltametria de impulso normal.....	12
2.2.3 Voltametria impulso diferencial.....	13
2.2.4 Voltametria de onda quadrada.....	13
2.2.5 Eléttodos.....	14
2.3 Sensores MIP	15
2.3.1 Tipos de ligação de um MIP.....	16
2.3.2 Síntese de um MIP	17
2.3.3 Mecanismos de deteção.....	20
2.3.4 Oportunidades e Desafios dos Sensores MIP.....	21
2.4 Sensores MIP para Análise de Alergénios	22
2.4.1 Aplicação para deteção de β -lactoglobina.....	22
2.4.2 Aplicação para deteção de Cor a 14	24
2.4.3 Aplicação para deteção de ovalbumina	25
3 Parte Experimental	27
3.1 Reagentes	27
3.2 Soluções	27
3.3 Equipamento	28
3.4 Preparação do Polímero Molecularmente Impresso.....	28

3.5	Estudos Eletroquímicos.....	28
4	Resultados e Discussão	31
4.1	Desenvolvimento de um sensor seletivo para a ovotransferrina	31
4.1.1	Impressão Molecular	31
4.1.2	Otimização do sensor	32
4.1.3	Caraterização do Sensor	38
4.1.4	Resposta Analítica.....	39
5	Conclusão.....	41
6	Referências.....	43

Índice de Figuras

Figura 2.1- Estrutura da Ovotransferrina	7
Figura 2.2- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria cíclica [10].....	12
Figura 2.3- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria de impulso normal [10]	12
Figura 2.4- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria de impulso diferencial [10].....	13
Figura 2.5- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria de onda quadrada [10]	14
Figura 2.6- Representação esquemática dos processos de impressão molecular através de ligações não covalentes e ligações covalentes [10].....	17
Figura 4.1- Eletropolimerização por CV. Voltamogramas da polimerização do MIP e NIP.....	32
Figura 4.2- Variação do Δi_p em função da concentração de 4-aminofenol, no MIP.....	33
Figura 4.3- Variação do Δi_p em função da concentração de ovotransferrina, no MIP	34
Figura 4.4- Variação do Δi_p em função do número de ciclos, no MIP.....	35
Figura 4.5- Valores de i_p (Gráfico de barras) e Δi_p (Gráfico de linhas) obtidos com os solventes de extração estudados.....	36
Figura 4.6- Variação do Δi_p em função do tempo de extração, no MIP.....	37
Figura 4.7- Variação do Δi_p em função do tempo de incubação, no MIP	38
Figura 4.8- Caracterização da construção, passo a passo, do sensor MIP.....	39
Figura 4.9- Reta de calibração do sensor MIP para a análise de ovotransferrina	40

Lista de Abreviaturas

- Au-NCS – Nanoaglomerados de ouro, do inglês *Gold nanoclusters*
- AuNP/SPCE – Eléctrodo Serigrafado de Carbono modificado com nanopartículas de ouro, do inglês *Screen-Printed Carbon Electrode with gold nanoparticles*
- CV – Voltametria cíclica, do inglês *Cyclic Voltammetry*
- DEQ – Departamento de Engenharia Química
- DISEST – Dissertação/Estágio
- DPV – Voltametria de impulso diferencial, do inglês *Differential pulse Voltammetry*
- ELISA – Ensaio de Imuno-Absorção Enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- EU – União Europeia
- GRAQ – Grupo de Reação e Análises Químicas
- IgE – Imunoglobulina E
- ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- MIP – Polímero Molecularmente Impresso, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*
- PEI – Polietilenoimina
- rGO – óxido de grafeno reduzido, do inglês *reduced graphene oxide*
- SPCE – Eléctrodo Serigrafado de Carbono, do inglês *Screen-Printed Carbon Electrode*
- WAO – Organização Mundial da Alergia, do inglês *World Allergy Organization*

1 Introdução

1.1 Enquadramento

Este projeto de investigação foi realizado no âmbito da unidade curricular Dissertação/Estágio (DISEST) do Mestrado em Engenharia Química – Energia e Biorrefinaria, pertencente ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP)

A realização do projeto envolveu uma parte de investigação, realizada ao longo de 6 meses, realizada no laboratório de eletroquímica do Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ), assim como uma parte de pesquisa sobre o tema.

1.2 Tema e Objetivos de Estágio

O principal objetivo deste projeto passou pelo desenvolvimento de um sensor eletroquímico molecularmente impresso, aplicável à deteção da ovotransferrina, de modo a desenvolver competências no âmbito da eletroquímica e da área de investigação, assim como na consolidação de conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

1.3 Organização do Relatório

O presente documento encontra-se dividido em 5 capítulos que, por sua vez, se subdividem noutros tópicos.

No primeiro capítulo é realizada uma introdução, contextualizando-se o tema em questão. Seguidamente, são apresentados aspetos relacionados com o enquadramento e objetivos do projeto.

O segundo capítulo expõe e esclarece alguns conceitos teóricos, fundamentais à compreensão do tema abordado, assim como do trabalho experimental realizado.

No terceiro capítulo apresentam-se os procedimentos experimentais, assim como os reagentes, soluções e equipamentos utilizados. É também explicado como foi realizada a construção do sensor baseado num polímero molecularmente impresso, e que medições eletroquímicas foram efetuadas.

O quarto capítulo dedica-se aos resultados obtidos, assim como à discussão dos mesmos. Por último, no quinto capítulo são apresentadas as conclusões do trabalho, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros.

2 Fundamentos Teóricos

Neste capítulo, são apresentados alguns fundamentos teóricos, essenciais à compreensão do tema em questão.

2.1 Alergia Alimentar

Um alimento é toda a substância comestível, utilizada para nutrir os seres vivos, e que contribui, conseqüentemente, para assegurar os materiais necessários à formação, crescimento e reparação das células e tecidos, assim como os constituintes orgânicos necessários à produção de energia.

O processo de seleção de alimentos resulta das preferências, da disponibilidade, da aprendizagem e das limitações de cada indivíduo, permitindo-lhe selecionar e distribuir as refeições ao longo do dia, de acordo com os seus hábitos e condições pessoais.

De acordo com a *World Allergy Organization* (WAO), uma alergia alimentar decorre de um “efeito adverso para a saúde, derivado de uma resposta imunológica específica, que decorre consecutivamente à exposição a um dado alimento”. É uma problemática crescente, sendo estimado que cerca de 8 em cada 100 crianças sofram de alergia alimentar, sendo que, nos adultos, a prevalência é de 5 %. Na última década a alergia alimentar aumentou 18 % e no caso particular das crianças esse aumento foi de 50 %. Assim sendo, a alergia alimentar constitui um impacto socioeconómico significativo, a par de uma debilidade na qualidade de vida dos pacientes [1].

No entanto, é de salientar que 80 a 90 % das crianças superam as suas sensibilidades alimentares até aos 3 a 5 anos de idade. Tem-se verificado que, enquanto as alergias infantis envolvendo ovo, leite de vaca, soja e trigo tendem a desaparecer com o passar dos anos, as alergias aos frutos de casca rijas, legumes, peixe e marisco tendem a perdurar toda a vida do indivíduo [2].

Desde 2014, com a aplicação do regulamento (UE) N.º 1169/2011, que todos os estabelecimentos de venda de produtos alimentares ao público têm de fornecer informações relativas à presença de alguns alimentos ou ingredientes, que possam causar alergias alimentares, designados por alergénios [1].

O regulamento tem por objetivo estabelecer a base para garantir um elevado nível de defesa do consumidor, no que se refere à informação sobre os géneros alimentícios. Desta forma, estabelece os princípios, requisitos e responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e, em particular, a rotulagem dos mesmos. Assim, constam as práticas leais de informação, de forma a que esta não induza em erro,

especialmente no que respeita às características do género alimentício, nomeadamente no que se refere à sua natureza, composição e método de fabrico ou produção. Além disso, esta informação deve ser exata, clara e figurar numa linguagem facilmente compreensível para o consumidor [3].

No que diz respeito à rotulagem de certas substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias, o nome da substância ou do produto deve ser realçado através de uma grafia que a distinga claramente da restante lista de ingredientes, sendo que nenhum outro elemento interferente pode esconder, dissimular ou desviar a atenção dessa informação. Além disso, na lista de menções obrigatórias, é necessária a indicação de todos os ingredientes auxiliares tecnológicos, derivados de uma substância ou produtos que provoquem alergias ou intolerâncias, utilizados no fabrico ou na preparação de um género alimentício e que continuem presentes no produto acabado, mesmo sob uma forma alterada [3].

2.1.1 Definição da doença e características epidemiológicas

A alergia alimentar é uma reação adversa, resultante de uma resposta específica e reprodutível do sistema imunológico, quando este é exposto a um certo alimento. Esse alimento é então identificado como agressor ao organismo e a fração desse alimento responsável pela reação, uma proteína, é designada por alergénio.

Estas proteínas podem ser adicionadas intencionalmente aos produtos alimentares, como ingrediente, ou incorporadas acidentalmente, como resultado de contaminação cruzada [4].

As alergias alimentares podem ainda ser subcategorizada em respostas alérgicas características, como a mediada por imunoglobulina E (IgE), as não mediadas por IgE como, por exemplo, as mediadas por células, e as reações alérgicas de mediação mista, que são uma combinação de ambas. Os sintomas causados por estas reações irão depender da quantidade ingerida e da própria sensibilidade do paciente [5].

A maioria das reações alérgicas a alimentos, nomeadamente as mais graves, são reações mediadas pela IgE, e são caracterizadas por um conjunto de sintomas agudos, que se desenvolvem até duas horas após a ingestão ou exposição ao alimento instigador e que, normalmente, envolvem a pele, o trato gastrointestinal e o sistema respiratório [2].

As reações não mediadas por IgE incluem as enterocolites induzidas por proteínas alimentares, proctocolites e as síndromes de enteropatia. As crianças são o grupo que é maioritariamente afetado por estas condições, apresentando queixas como vômitos,

diarreia, entre outros. Como exemplos de reações mediadas, em simultâneo, por IgE ou não, encontram-se a esofagite eosinofílica e a dermatite atópica [2].

Por último, os sintomas relacionados à mediação mista incluem dermatite atópica, gastroenterite e asma [5].

Existem, no entanto, outras reações a alimentos que são, erradamente, confundidas com alergias alimentares, tornando-se essencial esclarecer as suas diferenças. Reação adversa é um termo amplamente utilizado para designar um conjunto de reações clínicas anormais, relacionadas com a ingestão de alimentos, podendo estas ser divididas em duas classes, intolerâncias alimentares ou alergias alimentares, com base nos mecanismos envolvidos, na sua gravidade e no tratamento [5].

Embora alguns sintomas sejam bastante semelhantes, intolerância alimentar refere-se a um efeito colateral do consumo de alimentos que podem ter a si associada uma contaminação por toxinas ou ingredientes farmacologicamente ativos, podendo ainda estar relacionada com certas características do consumidor, do foro metabólico, psicológico ou distúrbios que incluem deficiências enzimáticas. São reações não reprodutíveis e podem variar de acordo com a ingestão, sendo que não envolvem o sistema imunitário [5].

Em contraste, alergia alimentar é uma resposta imune, anormal, derivada da ingestão de alimentos, que ocorre de uma forma reprodutível.

2.1.2 Mecanismos imunológicos

As alergias alimentares envolvem, principalmente, reações mediadas por IgE, embora as não mediadas por IgE também possam suceder. As reações mediadas por IgE são, no entanto, mais fáceis de diagnosticar, devido à sua prevalência [2].

Após uma exposição inicial do organismo ao alergénio, ocorre uma sensibilização, que se traduz numa produção de grandes quantidades de IgE pelo sistema imunológico, como resposta à exposição a determinado alergénio pela primeira vez. Posteriormente, aquando de um segundo contacto com o alergénio, o sistema imunológico reage, desencadeando a reação alérgica [1].

2.1.3 Alimentos e alergénios alimentares

Embora qualquer alimento possa desencadear uma resposta alérgica, as alergias mais comuns, e responsáveis por 90 % das reações, são o leite de vaca, ovo, frutos gordos e oleaginosas (conhecidos como “frutos secos”), peixe, marisco, trigo e soja. Existem, no

entanto, outros alergénios menos prevalentes, mas que são obrigados de constar na rotulagem de produtos alimentares, como o aipo, mostarda ou tremço [1].

Os alergénios alimentares são normalmente glicoproteínas solúveis em água e estáveis em pH ácido. Na sua grande maioria, podem provocar reações quando ingeridos crus ou depois de cozinhados ou digeridos, contudo, outros como os das frutas e vegetais, provocam reações, principalmente, se ingeridos crus. Em contrapartida, o aquecimento pode aumentar a alergenicidade de certas proteínas, através da indução de modificações covalentes, conduzindo a novos antigénios ou a uma estabilidade melhorada [2].

Os alergénios alimentares são divididos em duas classes genéricas. Na classe I, constam as glicoproteínas termoestáveis e resistentes a meio ácido, que induzem a sensibilização através do trato gastrointestinal, podendo causar anafilaxia, onde se inclui as alergias ao leite de vaca, amendoim, peixe, marisco, entre outros. A classe II é correspondente às proteínas inaladas pela via respiratória, como o pólen da bétula, tendo reatividade cruzada através de epítomos (menor fração de antigénio, com potencial de gerar uma resposta imune) homólogos de alergénios de origem vegetal, como frutas e vegetais crus [2].

Os alimentos contêm uma panóplia de proteínas, contudo, apenas algumas são alergénicas, sendo que a razão pela qual algumas proteínas são altamente alergénicas e outras não ainda não é plenamente entendida. No entanto, algumas propriedades físico-químicas aparentam estar associadas a um potencial alergénico, sendo que a maioria dos alergénicos possuem massa atómica compreendida entre 10 e 70 kDa, são geralmente solúveis em água, e são tipicamente estáveis às alterações de pH e temperatura [2].

O ovo é um alimento, de origem animal, consumido há milhares anos, por todo o mundo, independentemente da religião ou grupo étnico, podendo ser de diversas espécies animais, incluindo aves, répteis ou peixes. Os ovos mais consumidos pelos humanos são os de galinha, devido ao facto de serem excelentes fontes de proteínas, lípidos, vitaminas e minerais. O ovo consiste em três componentes principais, a casca (9-12 %), a clara (60 %) e a gema (30-33 %) [6].

A clara de ovo contém várias proteínas funcionais, entre as quais se destacam a ovalbumina (54 %), ovotransferrina (12 %), ovomucoide (11 %) e lisozima (3,5 %) [6].

A ovotransferrina é constituída por uma cadeia única de glicopeptídeos, contendo 686 aminoácidos, possuindo uma massa molecular de 77,90 kDa, sendo que a sua estrutura se apresenta na Figura 2.1 [7].

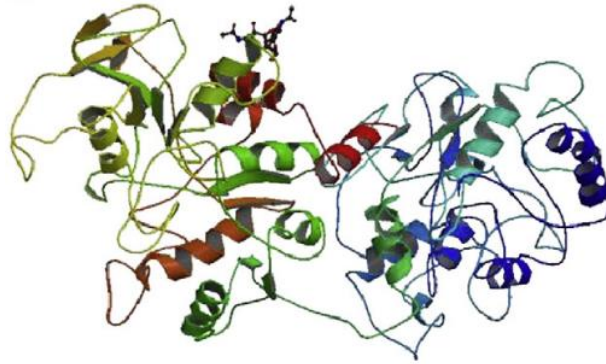


Figura 2.1- Estrutura da Ovotransferrina [7]

De entre os 10 alérgenos encontrados no ovo da galinha, a ovotransferrina, também designada por Gal d.3, é a que possui massa molecular mais elevada. Em alguns estudos, realizados em pacientes alérgicos à clara de ovo, conclui-se que a proteína, mesmo na forma desnaturada, continua a provocar reações alérgicas [8].

2.1.4 Manifestações clínicas e severidade

A probabilidade de uma alergia alimentar se desencadear está relacionada com a quantidade de IgE disponível, no entanto, a sua severidade varia em função da quantidade ingerida, co-ingestão de outros alimentos e o seu processamento [2]. As reações alérgicas podem variar, de moderadas a casos fatais, sendo que os sintomas surgem entre alguns minutos até duas horas após a ingestão do alérgeno, e incluem manifestações cutâneas, respiratórias, gastrointestinais e cardiovasculares, podendo ocorrer de forma isolada ou combinadas [1].

As reações mais severas envolvem o sistema respiratório e cardiovascular, podendo levar à perda de consciência, asfixia ou morte. A anafilaxia é uma reação alérgica multissistémica que requer intervenção médica imediata. Neste contexto, o tipo mais grave de anafilaxia é designado por choque anafilático, surgindo poucos minutos após a ingestão do alérgeno, manifestando-se por taquicardia e hipotensão [2]. Este tipo de reações pode ocorrer não só quando o alérgeno é ingerido, mas também quando este é inalado, ou através do contacto direto com a pele. Normalmente, está associada às alergias ao leite de vaca, ovo, peixe, marisco e frutos de casca rija [1].

2.1.5 Tratamento e Prevenção

Atualmente, a terapia primária para a alergia alimentar passa pela evicção alimentar, por outras palavras, a exclusão não só de todos os alimentos diretamente responsáveis, como também daqueles que poderão conter o alérgeno na sua composição. Uma educação

preventiva passa por uma especial atenção à leitura de rótulos, cuidados na obtenção de alimentos por parte de estabelecimentos de restauração e por evitar o contacto cruzado dos alimentos.

A informação e interpretação correta dos rótulos alimentares são ponto chave na gestão da alergia alimentar, sendo que uma fração considerável das exposições acidentais é atribuída a uma rotulagem inapropriada, ou a uma leitura incorreta dos rótulos. Os avisos na rotulagem apesar de, por vezes, insuficientemente informativos, são importantes na medida em que são ferramentas utilizadas pela indústria alimentar quando determinado alergénio não é ingrediente intencional, mas pode estar presente no alimento, por contaminação (por exemplo: Pode conter vestígios de...). [1].

No entanto, o plano alimentar de exclusão é um processo particularmente difícil, principalmente quando se atenta no risco de contaminação cruzada, sendo essencial quer a identificação de alergénios potencialmente escondidos, quer de práticas de risco. A contaminação cruzada dá-se quando dois alimentos entram em contacto, e o alimento que à partida não iria causar uma reação alérgica, passa a conter uma pequena quantidade, por ínfima que seja, do alergénio proveniente do outro alimento, tornando-se perigoso para o indivíduo com alergia alimentar. Tal pode acontecer por contacto direto, quando um alimento é colocado por cima do outro, ou por contacto indireto, através das mãos ou equipamentos. É de salientar que os alimentos processados também podem incluir alergénios decorrentes da contaminação cruzada, que pode ocorrer nas linhas de produção quando se utiliza a mesma linha para alimentos com e sem alergénios, sem limpeza adequada entre tais alimentos [1].

Desta forma, a necessidade da exclusão total de alguns alimentos gera elevados níveis de ansiedade, não só nos pacientes, como também no seu círculo social, perante o constante risco de uma exposição acidental. As contaminações cruzadas e os erros cometidos nos estabelecimentos de embalamento e restauração, constituem um obstáculo adicional. Assim, o impacto na redução da qualidade de vida, associada a esta doença, não se cinge às manifestações clínicas, mas também à limitação das atividades sociais, relacionadas com a alimentação [1].

Existe uma variedade de medicamentos que podem auxiliar no alívio de certos aspetos das reações alérgicas, como os anti-histamínicos, que podem aliviar parcialmente os sintomas cutâneos, mediados por IgE, ou as terapias anti-inflamatórias, que podem ser

benéficas para a gastroenterite. No entanto, no caso da anafilaxia, o único tratamento é a administração imediata de epinefrina [2].

2.1.6 Métodos de análise de alergénios

É notável, ao longo dos anos, o aumento da incidência das alergias alimentares, tornando-se um problema de saúde pública. Assim, surge a necessidade de desenvolver métodos para a análise de alergénios que sejam robustos e que forneçam resultados precisos e exatos, de forma a garantir que a indústria alimentar possui os instrumentos necessários para produzir alimentos isentos de alergénios, para a segurança dos seus consumidores [2].

Para fornecer uma solução expedita para este problema, torna-se essencial o desenvolvimento de dispositivos de deteção de alergénios, compactos e convenientes, que possam ser utilizados por qualquer pessoa. Esses métodos devem, idealmente, ser de baixo custo e permitir uma análise rápida, com elevada seletividade e sensibilidade [5].

São vários os métodos que têm sido utilizados nos últimos anos para a análise de alergénios alimentares. Contudo, a maioria destes métodos acarretam várias desvantagens, como o facto de as análises serem demoradas, necessitarem de equipamentos volumosos (i.e. não portáteis) e dispendiosos, que são operados por analistas especializados. Assim, surge a oportunidade do desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e portáteis, que permitam a análise dos alergénios ao longo da cadeia de produção [5].

Os sensores à base de polímeros molecularmente impressos surgem como uma tecnologia alternativa que permite superar os problemas referidos anteriormente. São bastante seletivos e sensíveis, devido ao facto de se basearem numa ligação específica entre uma molécula alvo e um elemento de reconhecimento polimérico. Além disso, podem ser aplicados em amostras complexas, como é o caso de amostras reais de alimentos, mantendo a sua capacidade de detetar o alergénio pretendido, de forma rápida e económica [5].

2.2 Voltametria

Nos métodos instrumentais de análise, efetua-se a medição de um valor de uma propriedade física ou química, que possa ser relacionada com a presença de uma determinada espécie na amostra. Essa propriedade pode ser utilizada para realizar uma análise qualitativa ou quantitativa.

A voltametria é um método analítico, no qual a informação se obtém através da relação entre a intensidade da corrente com o potencial aplicado em condições que favoreçam a polarização do eléctrodo de trabalho. De forma a favorecer tal polarização, a superfície do eléctrodo de trabalho deve consistir numa área reduzida. Numa célula voltamétrica utilizam-se, normalmente, três eléctrodos, um eléctrodo de trabalho, um eléctrodo de referência e um eléctrodo auxiliar, ligados a um potencióstato. As informações do analito são obtidas através da medição da corrente eléctrica, obtida pela transferência de electrões durante o processo de oxidação ou redução, entre o eléctrodo de trabalho e o analito. O potencial e a corrente resultante são registados, simultaneamente, obtendo-se uma curva entre estas duas grandezas, que é chamada de voltamograma [9].

Os processos que ocorrem na superfície do eléctrodo podem ser de dois tipos, faradaicos ou não-faradaicos, de acordo com o facto de obedecerem à lei de Faraday. Uma corrente faradaica é proveniente da oxidação ou redução de uma determinada substância, enquanto que a corrente resultante de correntes externas, como corrente capacitiva, é designada não-faradaica, sendo que esta deve ser minimizada, devido ao facto de poder condicionar o limite de deteção do método [10].

Quando o potencial do eléctrodo de trabalho é mantido ou deslocado para um valor onde ocorra um processo faradaico devido à presença de uma espécie química em solução, verifica-se a ocorrência de uma intensidade de corrente. Em condições experimentais adequadas, tal informação pode ser utilizada para a determinação da concentração dessa espécie química [11].

A intensidade de corrente representa a velocidade a que uma determinada quantidade de carga passa através da interface eléctrodo-solução. Desta forma, a intensidade de corrente resultante de um processo faradaico é uma medida direta da velocidade do processo que, quando proporcional à concentração, também constitui uma medida da concentração da espécie eletroativa, presente em solução. Já a carga, obtida por integração da intensidade de corrente, constitui uma medição da quantidade total de uma espécie convertida em outra [9].

A dependência dos perfis de concentração, na proximidade do eléctrodo, em função do tempo é verificada experimentalmente quando a intensidade de corrente varia com o tempo. Em todas as técnicas voltamétricas, o tempo é um parâmetro fundamental. Por exemplo, na voltametria de impulsos, a dependência do tempo aparece sob a forma da duração do impulso de potencial que é aplicado ao eléctrodo [12].

As técnicas voltamétricas por impulsos, como a normal e diferencial, são variantes da técnica clássica, apresentando, como principal vantagem, o aumento significativo da sensibilidade. São técnicas que se baseiam na medição da intensidade de corrente, em função do tempo, após a aplicação de um impulso de potencial. Desta forma, cada técnica é caracterizada por uma determinada forma de onda potencial em função do tempo, e respetivos parâmetros selecionados. Nestas técnicas, as respostas de corrente dependem da forma como os impulsos são aplicados, os quais definem as características de cada uma das técnicas. A escolha da técnica voltamétrica relaciona-se com o tipo e qualidade de informação que se pretende obter [9].

2.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV, *Cyclic Voltammetry*) é a técnica voltamétrica mais utilizada para a caracterização de um determinado sistema eletroquímico, onde a direção do varrimento de potencial é invertida. A partir de um único varrimento é possível o conhecimento detalhado da reação eletroquímica, como a sua reversibilidade, cinética da reação ou processos de adsorção. Existe ainda a possibilidade de realizar múltiplos varrimentos consecutivos, tornando possível a extração de várias informações, como por exemplo, o número de eletrões transferidos numa oxidação ou redução. Tal é possível uma vez que a repetição do varrimento do potencial permite a obtenção de um estado estacionário no sistema e a acumulação de produtos de reação na superfície do eletrodo [12].

É, portanto, utilizado o varrimento de potencial do eletrodo de trabalho, utilizando uma rampa triangular simétrica, onde o sinal de excitação compreende um varrimento linear de potencial desde um determinado valor inicial até um valor considerado como potencial de retorno. Quando é atingido este valor, a direção do varrimento de potencial é invertida, dando-se um novo varrimento no sentido inverso, até um valor final que pode, ou não, ser o mesmo que o valor inicial [11].

A forma do voltamograma obtido por voltametria cíclica, isto é, a variação da intensidade de corrente em função do potencial aplicado, depende de fatores como as velocidades de transferência eletrónica, do transporte de massa, da ocorrência de qualquer reação química junto da superfície do eletrodo e, ainda, de fenómenos de adsorção [9].

Na Figura 2.2 encontra-se representado à esquerda a aplicação do potencial em função do tempo, e à direita o voltamograma desta técnica.

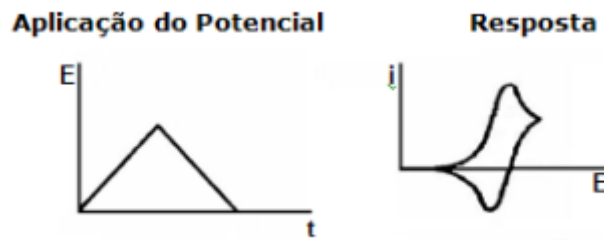


Figura 2.2- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria cíclica [10]

A ocorrência de dois picos, como apresentado na Figura 2.2, ocorre quando a espécie reduzida formada é oxidada, ou seja, quando o varrimento de potencial catódico é seguido pelo anódico, ocorrendo a reação no sentido inverso [11].

2.2.2 Voltametria de impulso normal

Na voltametria de impulso normal, é aplicado um impulso, com duração de alguns milissegundos, após o qual o potencial regressa ao seu valor inicial, sendo a amplitude do impulso sucessivamente crescente. Os impulsos partem de um valor ao qual não ocorre reação (intensidade de corrente igual à intensidade de corrente de base praticamente nula), aumentando até ser alcançado o potencial onde ocorre a oxidação ou redução do analito no eletrodo de trabalho. Atingindo-se a região da intensidade de corrente de corrente limite de difusão, a intensidade de corrente faradaica estabiliza, explicando a forma do típico voltamograma. [12].

Na Figura 2.3 encontra-se representado graficamente, à esquerda a aplicação do potencial em função do tempo, e à direita o voltamograma desta técnica.

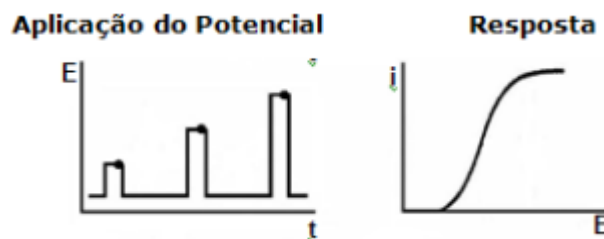


Figura 2.3- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria de impulso normal [10]

A duração de cada impulso é tipicamente entre 1 e 100 milissegundos, e o intervalo entre os mesmos pode tomar valores entre 0,1 e 5 segundos [12].

Uma vez que, nesta técnica, a intensidade de corrente não-faradaica decresce mais rapidamente do que a intensidade de corrente faradaica, a intensidade de corrente é medida próximo do fim de cada impulso. Desta forma, consegue-se aumentar a razão

entre a intensidade de corrente faradaica e a não-faradaica, resultando numa obtenção de limites de deteção significativamente inferiores [9].

É um método mais sensível que a voltametria clássica, sendo essencialmente útil em situações onde possa ocorrer acumulação de produtos na superfície do eletrodo, uma vez que o potencial volta sempre ao valor inicial [9].

2.2.3 Voltametria impulso diferencial

A voltametria de impulso diferencial (DPV, *Differential Pulse Voltammetry*) é caracterizada pela sobreposição de uma série de impulsos curtos e constantes, dentro de uma gama de 10 a 100 mV, a uma rampa de potencial. Impulsos inferiores a 10 mV implicam uma baixa sensibilidade e superiores a 100 mV afetam a seletividade [12].

São efetuadas duas medições de intensidade de corrente, antes da aplicação do impulso e no fim do impulso, de forma a minimizar a contribuição da corrente capacitiva na intensidade de corrente medida. A intensidade de corrente representada é, então, a diferença entre o valor obtido na parte final da aplicação do impulso e o observado antes da sua aplicação [11].

Na Figura 2.4 encontra-se representado à esquerda a aplicação do potencial em função do tempo, e à direita o voltamograma desta técnica.

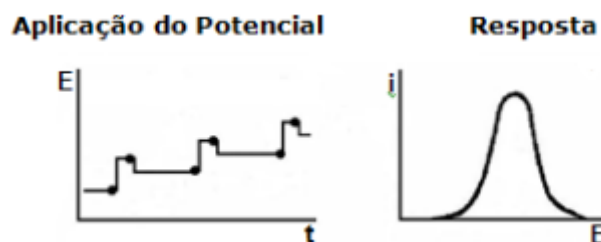


Figura 2.4- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria de impulso diferencial [10]

De um ponto de vista analítico, é uma técnica muito útil, uma vez que a resposta é dada sob a forma de um pico, o que facilita a sua leitura para fins qualitativos e quantitativos, sendo também uma técnica mais sensível que a voltametria de impulso normal. No voltamograma, a área e a altura dos picos são diretamente proporcionais, dentro de determinadas condições, à concentração do analito [12].

2.2.4 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada é o tipo de voltametria de impulsos mais vantajoso, quer a nível de velocidade de análise, quer de sensibilidade, merecendo uma certa preferência como técnica analítica, quando disponível na instrumentação a utilizar. O potencial

aplicado resulta da sobreposição de uma onda quadrada simétrica numa rampa de potencial na forma de escada [9].

A intensidade de corrente é medida no final do impulso direto, quando a direção do impulso e do varrimento são iguais, e no final do impulso inverso, onde a direção do impulso é contrária à do varrimento. O valor de intensidade observado corresponde a essa diferença, resultando numa menor contribuição da corrente capacitiva. Caso as amplitudes dos impulsos aplicados sejam elevadas, os impulsos inversos podem provocar a reação inversa do produto formado pelo impulso direto, podendo-se então averiguar a reversibilidade da solução a analisar [11].

Através da variação da frequência, não só é possível o uso de velocidades de varrimento de potencial extremamente rápidas, como também é possível aumentar a intensidade de corrente e, conseqüentemente, a sensibilidade do método [9].

Na Figura 2.5 encontra-se representado à esquerda a aplicação do potencial em função do tempo, e à direita o voltamograma desta técnica.

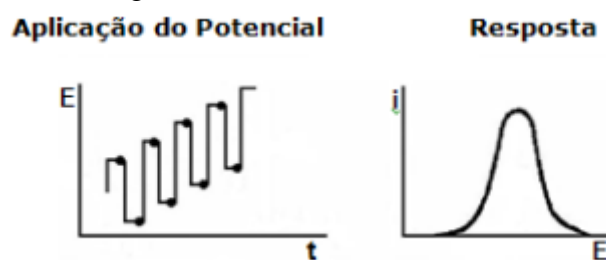


Figura 2.5- Representação gráfica da aplicação do potencial em função do tempo e voltamograma da voltametria de onda quadrada [10]

A intensidade de corrente total, medida no pico voltamétrico, é proporcional à concentração da espécie eletroativa. A redução do oxigénio dissolvido na solução a analisar pode produzir intensidades de corrente elevadas e instáveis, no entanto, utilizando a voltametria de onda quadrada, estas intensidades são automaticamente subtraídas, sendo insensível à presença de oxigénio [12].

2.2.5 Eléttodos

O eléctrodo de trabalho é de elevada relevância no contexto de técnicas voltamétricas uma vez que é na sua superfície que ocorrem os processos de interesse analítico. Desta forma, a seleção de um eléctrodo com as propriedades físico-químicas apropriadas é uma etapa determinante no sucesso da análise.

São vários os materiais que podem ser utilizados na construção de eléctrodos de trabalho, entre os quais, o carbono e o ouro são os mais comuns. O carbono não só apresenta uma

ampla gama de potencial onde pode ser utilizado, como também é um material de custo reduzido, já o ouro justifica a sua vasta utilização através da sua igualmente ampla gama de potencial e do facto de ser quimicamente inerte.

No entanto, as reações que ocorrem durante uma análise voltamétrica possuem uma cinética de transferência de eletrões lenta, o que torna necessário um potencial adicional, de forma a ultrapassar a energia de ativação, mantendo a reação a uma determinada velocidade. Desta forma, a superfície dos elétrodos de trabalho é frequentemente modificada para melhorar as suas propriedades, como por exemplo, com nanomateriais de carbono, ouro ou o seu revestimento com um filme polimérico adequado.

Elétrodos com a sua superfície modificada apresentam sensibilidade e seletividade superiores aos elétrodos não modificados, e são obtidos através de técnicas simples, eficientes e de baixo custo. Uma dessas técnicas é iniciada pela dissolução do agente modificador num solvente, seguida da imersão do eletrodo nessa mesma solução. Após a evaporação do solvente, o agente modificador encontra-se então fixado ao eletrodo. Estas técnicas tornam as determinações mais sensíveis e/ou seletivas, devido ao aumento da área do eletrodo e à melhoria na capacidade de reconhecimento do analito, sendo frequente a modificação com polímeros molecularmente impressos (MIP), que permitem a obtenção de seletividade para uma determinada molécula alvo.

2.3 Sensores MIP

A necessidade de determinar concentrações muito reduzidas de alergénios, assim como a disponibilidade limitada de métodos que sejam tanto sensíveis como seletivos, constituem as principais dificuldades na monitorização de alergénios alimentares. Os sensores são dispositivos que têm como objetivo melhorar a qualidade de vida humana através da sua aplicação numa variedade de áreas, sendo que os sensores químicos, que transformam informações químicas em sinais de fácil medição, ocupam um lugar de relevo.

O objetivo principal de um sensor à base de um MIP passa pelo desenvolvimento de recetores sintéticos, com elevada seletividade para uma determinada molécula, sendo que a sua produção se traduz na síntese de uma matriz polimérica, tridimensional, com cavidades específicas concordantes com a partícula de interesse [13].

Um MIP é um material sintético que consiste de um polímero no qual se incorpora uma substância, o analito, que atua como um modelo molecular. Na sua preparação é misturado, num solvente adequado e inerte, o monómero, que é selecionado de modo a que os seus grupos funcionais sejam complementares ao da molécula modelo, e a

substância alvo, resultando assim num complexo de pré-polimerização. Este complexo irá sofrer polimerização na presença de um agente de *cross-linking*, que tem por objetivo fixar o monómero ao molde, permitindo a geração da matriz polimérica, e de um iniciador [14].

Após a polimerização, remove-se o molde do polímero obtido, sendo que este mantém a forma e funcionalidade complementar à molécula que foi impressa, tornando-se altamente seletivo. É então possível obter polímeros com cavidades específicas, que imitam recetores naturais, capazes de reconhecer, seletivamente, a molécula alvo na presença de outras moléculas, para posterior utilização em processos de deteção, como sensores, ou em procedimentos de separação ou purificação [13].

Os MIP apresentam como principais vantagens o facto de terem elevada afinidade e seletividade para moléculas alvo e, comparativamente com recetores biológicos, como enzimas ou anticorpos, apresentam maior robustez, resistência a temperatura e pressões mais elevadas, sendo inertes a diversos químicos e podem até ser esterilizados sem que ocorram efeitos adversos na sua função. Permitem ainda superar questões éticas relacionadas com a criação de anticorpos em animais. Apresentam também um baixo custo de produção, elevada estabilidade, longos tempos de vida, boa capacidade de reutilização e facilidade na sua preparação, sendo que a sua aplicação abrange várias áreas, com especial foco nas técnicas de separação e deteção [14].

Contudo, apresentam também algumas limitações como a necessidade de grandes quantidades de molécula alvo, tornando-se, em alguns casos, um impeditivo económico. Além disso, é necessário um elevado número de ensaios experimentais, de forma a otimizar as condições de preparação, que nem sempre levam à formação de um MIP adequado [14].

2.3.1 Tipos de ligação de um MIP

Para a obtenção de um polímero com capacidades de reconhecimento, é essencial uma boa interação entre o monómero funcional e a molécula alvo. As ligações entre o monómero e a molécula molde podem ser covalentes ou não covalentes, sendo que as últimas podem incluir pontes de hidrogénio, forças de Van der Waals, interações iónicas ou hidrofóbicas [14].

Na Figura 2.6 encontram-se esquematizados os processos de impressão molecular através de ligações covalentes e não covalentes.

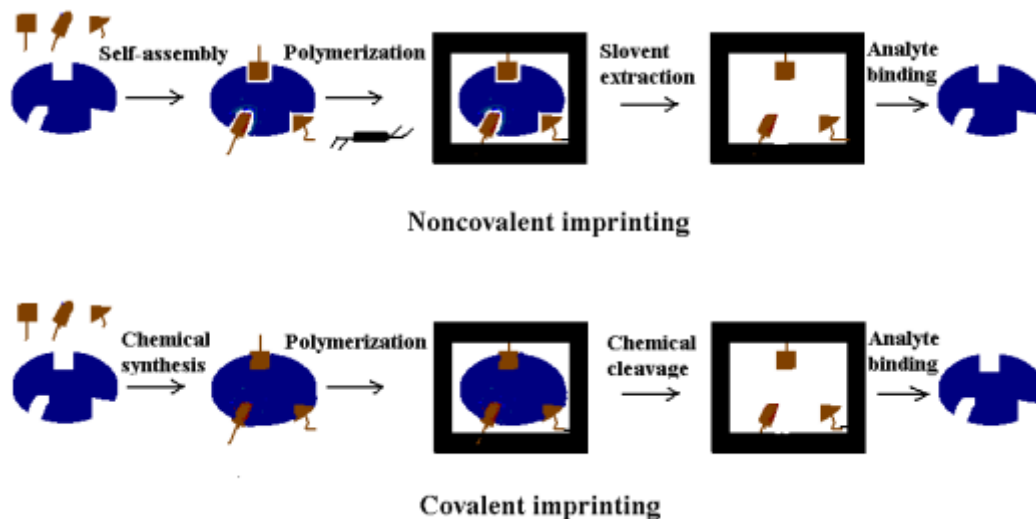


Figura 2.6- Representação esquemática dos processos de impressão molecular através de ligações não covalentes e ligações covalentes [10]

As vantagens das ligações covalentes entre monómero e molécula modelo centram-se na maior homogeneidade dos locais de ligação, existência de menos locais não específicos e o facto de permitir uma maior variedade de condições de polimerização. No entanto, proporcionam uma maior dificuldade na remoção da molécula modelo, lentidão nos processos quer de ligação, quer de remoção e o facto de existir uma disponibilidade limitada ligações covalentes reversíveis [14].

Por sua vez, as vantagens das ligações não covalentes focam na facilidade de remoção da molécula modelo, na rapidez dos processos de ligação e no facto de não existir necessidade de síntese de ligação covalente prévia. A ligação não covalente é mais flexível, pelo que a remoção e subsequente religação do molde é mais fácil. No entanto, existe uma maior heterogeneidade de locais de ligação, mais locais não específicos e exigem um maior cuidado nas condições de polimerização. Desta forma, apesar de estas serem mais frequentemente usadas, as ligações covalentes promovem uma maior qualidade de impressão [14].

2.3.2 Síntese de um MIP

A síntese de um MIP requer uma análise complexa, exigindo conhecimentos de equilíbrio químico e comportamento termodinâmico, de forma a obter um elevado reconhecimento molecular. As propriedades físicas desejadas aumentam à complexidade da sua preparação, uma vez que os polímeros devem ser rígidos, de forma a preservar a estrutura das cavidades após separação do molde. No entanto, devem também apresentar uma determinada flexibilidade, de forma a facilitar o equilíbrio entre a libertação e captura da

molécula alvo nas suas cavidades. O exemplo destas duas propriedades, opostas uma à outra, aponta à necessidade para uma otimização da síntese dos MIP e, de modo a otimizar a eficiência da impressão molecular, a escolha dos reagentes é um ponto fulcral, sendo que estes se dividem no monómero funcional, agente de *cross-linking*, solvente e iniciador [13].

A escolha do monómero funcional é de elevada importância, uma vez que é o componente que está maioritariamente envolvido na formação de uma ligação química com a molécula molde, devendo interagir fortemente com esta molécula, de modo a atingir um elevado rendimento de locais de ligação impressos. O monómero funcional, em comparação com a molécula molde, é usado em excesso, sendo que os grupos funcionais são o ponto chave na seleção do monómero mais apropriado. As interações monómero-molécula modelo podem ser alteradas por combinação dos diferentes grupos funcionais, sendo que muitos dos monómeros disponíveis foram analisados com base no seu potencial de estabelecer pontes de hidrogénio ou interações electrostáticas com o molde, pelo que, entre os mais comumente utilizados na produção de MIP, encontram-se o ácido metacrílico, pirrol e fenol e seus derivados [14]. De forma a obter o MIP com as características desejadas, é necessário ter alguns cuidados com os monómeros, uma vez que a sua maioria é fornecida com inibidores de polimerização, de forma a minimizar a sua degradação quando armazenados, sendo, portanto, imprescindível a sua purificação antes do processo de polimerização. Além disso, outro fator que pode ter um impacto negativo na polimerização é a existência de oxigénio dissolvido na solução, que pode ser facilmente removido através da aplicação de ultrassons ou pela passagem de um gás inerte pela solução [13].

O agente de *cross-linking* cumpre várias funções principais. Confere a morfologia e a estabilidade mecânica necessária à matriz polimérica, facilitando as suas aplicações sendo que, para tal, são normalmente utilizados em excesso. Além disso, atua de forma a estabilizar os locais de ligação impressos. A sua afinidade com o monómero é fundamental na produção do MIP, sendo que alguns podem até, simultaneamente, formar complexos com a molécula molde, atuando como monómeros funcionais [13].

O solvente tem por função a dissolução dos componentes, sendo responsável pela criação de poros na matriz polimérica, devendo estes ser suficientemente largos para permitir um bom fluxo. O tipo e volume de solvente tem uma grande influência nas características do MIP, sendo que, quanto maior o volume, mais largos serão os poros. Solventes que sejam

apolares e apróticos promovem uma maior formação de complexo monómero-molde, uma vez que maximizam a força das suas interações, enquanto permitem a dissolução rápida da molécula impressa. Além disso, solventes apolares melhoram a capacidade de reconhecimento do MIP. Os solventes mais comuns são o acetonitrilo, clorofórmio e tolueno [14].

O iniciador, normalmente utilizado em quantidades muito inferiores quando comparado com os monómeros, forma radicais por decomposição, que têm por objetivo atacar o monómero, produzindo os radicais de propagação da cadeia polimérica. Essa formação de radicais de propagação pode ser controlada de várias formas, através do seu aquecimento, exposição à luz ou através de meios químicos, dependendo da sua natureza química [13].

Os sensores MIP podem ser sintetizados, teoricamente, para qualquer analito, não existindo, no entanto, uma estratégia específica definida para uma determinada classe de analitos. Contudo, uma das estratégias mais comuns é a polimerização em massa.

A seleção do método de impressão irá depender de vários fatores, como o tamanho e a forma do MIP desejado, o tipo de molécula modelo e qual a aplicação final do MIP sendo que, na maioria das aplicações, é desejável que os MIP possuam uma elevada área de superfície, assim como um elevado número de locais de ligação. Já as ligações não específicas devem ser evitadas ao máximo [15].

A polimerização em massa é a abordagem mais frequente, devido à sua simples operação e baixos custos de produção. Neste método, o molde, o monómero funcional, o agente de *cross-linking* e o iniciador são misturados num reator, resultando numa matriz polimérica rígida, que após trituração, pode apresentar algumas limitações como a perda de locais de ligação, o que pode conduzir a um rendimento reduzido [16].

A técnica da polimerização em massa segue, tipicamente, cinco etapas principais, de entre as quais a pré-polimerização dos monómeros funcionais com as moléculas modelo, adição de agentes de *cross-linking* e iniciadores, polimerização por aquecimento durante um longo período de tempo, extração do modelo e, por último, a trituração do polímero reticulado [16].

A eletropolimerização permite preparar polímeros condutores ou não condutores, a partir de monómeros eletroativos. Desta forma, revela-se uma técnica bastante eficiente, dado que permite produzir filmes poliméricos molecularmente impressos na superfície do

transdutor, com relativa simplicidade e rapidez. Permite de igual modo controlar quer a espessura do filme, quer a sua morfologia [13].

Na eletropolimerização, o controlo das condições eletroquímicas permite garantir também o controlo das propriedades do filme polimérico, possibilitando a obtenção de filmes ultrafinos. Para além de, geralmente, não necessitar de iniciadores ou agentes de *cross-linking*, também facilita a posterior remoção do polímero do molde, uma vez que a película é fina e todas as cavidades de impressão estão situadas na superfície, ou próximas dela. Assim, a eletropolimerização é geralmente um procedimento simples e rápido, que envolve a solubilização e interação de um monómero funcional com o modelo desejado, o revestimento eletroquímico e a extração do modelo [16].

2.3.3 Mecanismos de deteção

É possível determinar a concentração do analito através da utilização de sensores eletroquímicos baseados em MIP, uma vez que é proporcional às mudanças do sinal elétrico. São utilizadas, principalmente, duas técnicas para detetar os eventos de reconhecimento específico: voltametria e espectroscopia de impedância eletroquímica [16].

Nos métodos voltamétricos, a eletroatividade do analito condiciona o mecanismo de deteção. Para moléculas eletroativas a corrente é medida diretamente, onde o sinal analítico, idealmente, é a corrente faradaica, originada pelos fenómenos de oxidação-redução do analito, após a sua ligação com o MIP. Desta forma, e sob condições controladas, torna-se possível correlacionar a concentração do analito com a corrente medida [16].

Quando o analito não é eletroativo são utilizados métodos de deteção indiretos, onde o sinal é produzido utilizando pares redox. Nesse caso, a corrente é inversamente proporcional à concentração do analito, uma vez que concentrações mais elevadas dificultam a difusão do par redox para a superfície do eléctrodo, resultando numa diminuição do sinal. No entanto, a deteção indireta pode apresentar algumas desvantagens, principalmente na presença de compostos que interfiram com o sinal, podendo gerar falsos resultados [16].

O obstáculo principal neste tipo de sistema prende-se com a dificuldade da integração do MIP e o transdutor, por outras palavras, imobilizar o polímero obtido no eléctrodo de trabalho, de forma a garantir a estabilidade e reprodutibilidade do processo. Para tal, têm sido analisadas várias técnicas, de entre as quais se destaca a eletropolimerização. [13].

De modo a evitar processos experimentais demorados de tentativa e erro, é possível recorrer a simulações computacionais, de forma a descrever, prever e analisar sistemas de impressão molecular, que se têm revelado instrumentos bastante úteis na orientação da modelação de sensores MIP [16]. Assim, através de avanços em tecnologias estatísticas, têm sido utilizados *designs* combinatórios, de forma a selecionar o monómero mais apropriado à aplicação em questão, ou até o rácio de monómero para a etapa de polimerização [17].

2.3.4 Oportunidades e Desafios dos Sensores MIP

As aplicações de sensores baseados em MIP têm sido dificultadas por vários motivos, nomeadamente devido à remoção do molde e à formação de ligações não específicas, resultado do baixo rendimento de locais de ligação específicos. A incapacidade de remover, totalmente, as moléculas modelo residuais da matriz diminui o número de locais de ligação específicos disponíveis aquando da deteção. Já a presença de locais de ligação não específicos pode levar à co-deteção de componentes indesejados, que podem interferir gravemente na quantificação da molécula de interesse, em matrizes complexas [15].

Embora existam vários métodos disponíveis para a construção destes sensores, a sua transferência de uma escala laboratorial para uma escala industrial continua a ser um desafio.

Relativamente a prospetivas futuras, apesar de já existirem um número considerável de aplicações funcionais dos sensores MIP na análise alimentar, ainda existem oportunidades para melhorar o desempenho de sistemas baseados nesta tecnologia.

Como suplemento à experiência prática, baseada em métodos de tentativa e erro, pode ser utilizado cálculo teórico, para a triagem de monómeros funcionais e otimização das estratégias de polimerização [17].

A introdução de novos materiais também pode se provar muito vantajosa. Materiais avançados, com propriedades superiores na utilização como monómeros funcionais ou agentes de reticulação podem melhorar o reconhecimento químico das moléculas alvo [17].

Além disso, a tecnologia MIP pode ainda ser associada a outras tecnologias avançadas, como a nanotecnologia e a inteligência artificial, podendo o desenvolvimento nestes dois campos não só abordar desvantagens atuais dos MIP, como também expandir, significativamente, a sua aplicabilidade [17].

2.4 Sensores MIP para Análise de Alergénios

A segurança alimentar ocupa uma das principais preocupações da indústria alimentar, desde a produção dos alimentos à sua distribuição. Os fatores de risco de segurança alimentar onde, para além de perigos químicos, se encontram também incluídos os alergénios alimentares, têm estimulado uma investigação interdisciplinar, sendo que a procura de métodos de deteção de alergénios sensíveis tornou-se um foco no desenvolvimento de novas tecnologias no fabrico de produtos alimentares. Desta forma, são cada vez mais as experiências realizadas no âmbito da aplicação de sensores MIP na deteção de alergénios alimentares.

Com habilidades inerentes de reconhecimento molecular, os MIP não só podem reconhecer moléculas de tamanho reduzido, como também várias macromoléculas, incluindo as proteínas responsáveis pelas alergias alimentares. Assim, sensores baseados em MIP tornam possível o fabrico de dispositivos portáteis, convenientes e de baixo custo, com elevada seletividade e sensibilidade. Os sensores eletroquímicos são das técnicas analíticas mais utilizadas na combinação com MIP, sendo estes detetores com transdutores eletroquímicos, que podem transformar a interação entre analitos e recetores, na superfície do eléctrodo, num sinal analítico. O sistema mais comum, envolve a utilização de três eléctrodos [17].

O facto de os produtos alimentares apresentarem lucros e prazos de validade limitados, aumenta a procura de testes que possuam não só baixos custos, como também tempos de deteção reduzidos. Além disso, o baixo nível técnico de funcionários, geralmente encontrado nas empresas de indústria alimentar, ou dos próprios pacientes, requer métodos de fácil operação [17].

Sendo assim, métodos de deteção realizada no local, com baixos custos associados e de fácil operação que, simultaneamente, possuam elevada sensibilidade e seletividade, são urgentes no processo de monitorização de alergénios alimentares, pelo que os sensores baseados em MIP possuem um enorme potencial na produção de dispositivos portáteis de uso não especializado [17].

2.4.1 Aplicação para deteção de β -lactoglobina

A alergia alimentar ao leite de vaca e seus derivados é uma das mais comuns, pelo que uma deteção fácil e eficaz da β -lactoglobina, um dos principais alergénios do leite, é extremamente importante.

A β -lactoglobina constitui cerca de 10 % da proteína total encontrada no leite de vaca, no entanto, devido à presença simultânea de outras proteínas, torna-se imprescindível que o método de deteção seja seletivo e sensível quanto à quantificação da β -lactoglobina, de forma a possibilitar a aplicação do sensor em amostras reais, consumidas no quotidiano do paciente [18].

Apesar de já existirem alguns métodos para esta deteção, como o método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), estes apresentam várias desvantagens, como o processamento complexo da amostra, tempo de análise elevado e reagentes de custos elevados.

Assim, foi construído um sensor eletroquímico, baseado num sistema eletrodo de carbono e MIP, onde se utilizou cloreto de colina como monómero funcional, β -lactoglobina como molécula modelo e dimetacrilato de etilenoglicol como solvente. Posteriormente, o MIP foi imobilizado em polietilenoimina (PEI)-óxido de grafeno reduzido (rGO)-nanoaglomerados de ouro (Au-NCS), de forma a melhorar a seletividade do sensor à β -lactoglobina, uma vez que nanoaglomerados de ouro, suportados em óxido de grafeno reduzido, possuem uma condutividade muito maior, devido ao aumento da transferência de carga da base para os nanoaglomerados [18].

Na construção do sensor, a superfície do eletrodo de trabalho foi coberta com 30 μ L de PEI-rGO-Au-NCS-MIP, sendo depois colocado a 60 °C durante 20 minutos. Posteriormente, foi armazenada a uma temperatura de 4 °C, até à sua utilização [18].

Nos ensaios realizados foi utilizada voltametria cíclica e voltametria impulso diferencial em várias amostras, com diferentes concentrações de β -lactoglobina.

De modo a averiguar a seletividade do sensor, foram realizados ensaios com outras proteínas e não foram observadas alterações significativas no sinal, confirmando a seletividade do MIP à molécula alvo. Assim sendo, é possível concluir que a formação dos locais de ligação, impressos na matriz polimérica, foi bem-sucedida, pelo que estes eram complementares em tamanho, conformação e forma à molécula de β -lactoglobina. Uma vez que as outras proteínas eram estruturalmente diferentes da molécula alvo, não se ligaram tão fortemente aos locais de ligação, resultando numa resposta fraca [18].

Para a análise de amostras reais, quatro marcas diferentes de leite foram diluídas em água sendo que, de forma a obter termo de comparação, quer as amostras, quer as soluções padrão, foram também testadas utilizando um kit ELISA.

Averiguou-se que os resultados obtidos, através do sensor eletroquímico, eram bastante semelhantes com aqueles obtidos através do método ELISA, criando a oportunidade para estes sensores serem usados para a deteção de β -lactoglobina. Além disso, o sensor eletroquímico obteve um limite de deteção (10^{-9} mg/mL) mais baixo que aquele encontrado no kit ELISA, e demonstrou uma deteção linear numa gama de concentrações mais abrangente (10^{-9} a 10^{-4} mg/mL) [18].

Em conclusão, os resultados provam que o método de deteção proposto pode ser suficientemente preciso para a deteção de β -lactoglobina, em amostras reais de leite.

2.4.2 Aplicação para deteção de Cor a 14

A Cor a 14 é uma proteína alérgica de avelã e classificada como um alergénio importante devido quer à sua elevada estabilidade em condições extremas, quer à sua elevada resistência à digestão gastrointestinal.

Assim, foi analisada a construção de um sensor através da eletropolimerização de pirrol num elétrodo Au-SPE.

Foi utilizada voltametria cíclica na preparação do filme polimérico na superfície do elétrodo, sendo que foi estudado o efeito da concentração da molécula alvo, assim como o número de varrimentos considerados na voltametria [19].

Conclui-se que um aumento no número de varrimentos levou à diminuição da intensidade dos picos de oxidação após o primeiro ciclo, o que pode sugerir a formação de uma película isolante mais espessa, depositada na superfície do elétrodo. Deste modo, a otimização deste parâmetro influencia a via de oxidação eletroquímica, necessária à oxidação do monómero no elétrodo, estabelecendo uma relação entre o ajuste da espessura da superfície impressa e as propriedades do MIP.

A remoção da molécula alvo do polímero foi realizada através da incubação do mesmo, durante 12 horas, na ausência de luz, a uma temperatura de 4 °C, com uma solução de SDS 25 mmol/L com 10 % de metanol. Esta etapa garantiu a clivagem da estrutura da proteína, permitindo a sua remoção da rede polimérica, com preservação dos locais de ligação para o reconhecimento da Cor a 14. No entanto, é de notar que, quanto maior foi a concentração da molécula alvo na construção do MIP, maior foi a dificuldade em conseguir uma extração eficaz [19].

O desempenho eletroquímico do sensor foi avaliado por voltametria de onda quadrada a uma frequência de 10 Hz, um incremento de potencial de 1,0 mV e uma amplitude de

impulso de 50 mV, sendo que o sensor apresentou um limite de deteção de 24,5 fg/mL [19].

De modo a avaliar a sensibilidade e seletividade, o MIP também foi testado com outras proteínas, estruturalmente semelhantes à Cor a 14, sendo os seus resultados comparados com um imunossensor de forma a avaliar a adequação do sensor como alternativa viável à deteção da proteína em questão. Os resultados evidenciam que o sensor mimetiza o reconhecimento dos anticorpos, apresentando uma maior seletividade que o imunossensor [19].

Para a aplicação do sensor em amostras reais, encontrada no quotidiano do paciente, foram preparadas misturas de massa, contendo quantidades conhecidas de avelã. A utilização de massa prende-se com o facto de ser um alimento de composição complexa, que é submetido a várias etapas processuais no decorrer da sua produção.

O sensor permitiu a quantificação de avelã até valores de 1 mg/kg. Quando a avelã ultrapassa uma concentração de 1000 mg/kg de massa, o sensor fica saturado, pelo que não restam quaisquer locais de ligação para ocupação da Cor a 14. Contudo, o foco da maioria dos métodos analíticos para a análise de alergénios é a deteção de níveis residuais [19].

2.4.3 Aplicação para deteção de ovalbumina

Ovalbumina é a principal constituinte da clara do ovo, sendo as restantes proteínas a ovotransferrina, ovomucóide e lisozima. As alergias alimentares a um, ou mais constituintes da clara do ovo são bastante comuns, afetando aproximadamente 1,6 % das crianças, a nível mundial [20].

Assim, foi desenvolvido um sensor MIP para reconhecer seletivamente a ovalbumina. Foram utilizados dados termocalorimétricos para otimizar a escolha do monómero funcional e o agente de *cross-linking*, de forma a maximizar a seletividade, minimizando o reconhecimento não específico. O monómero funcional selecionado foi o ácido metacrílico e o agente de *cross-linking* foi o polietilenoglicol 400. O polímero que demonstrou maior reconhecimento de ovalbumina era composto por 95 % (volume) de polietilenoglicol 400 e 5 % (volume) de ácido metacrílico [20].

O sensor demonstrou uma boa seletividade à molécula alvo e uma afinidade reduzida para as outras proteínas estudadas.

Para ser útil como equipamento analítico, o sensor terá que demonstrar também elevada afinidade à molécula alvo quando esta se encontra na presença de outras proteínas. Assim

sendo, de forma a examinar a afinidade do sensor em condições competitivas, foram realizados ensaios em soluções onde as restantes proteínas se encontravam em concentrações iguais à da ovalbumina. Foi então possível concluir que o reconhecimento seletivo foi mantido [20].

3 Parte Experimental

Neste capítulo, são identificados os reagentes, soluções, materiais, equipamentos e procedimentos utilizados no decorrer do trabalho.

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na execução do trabalho experimental foram usados tal como recebidos, sem serem submetidos a qualquer purificação ou tratamento adicional.

Dihidrogenofosfato de potássio (Merck, puriss), hidrogenofosfato de potássio (Riedel-de Haën, puriss.), hexacianoferrato(II) de potássio trihidratado (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), hexacianoferrato(III) de potássio (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), dodecilo sulfato de sódio, hidróxido de sódio (labkem), ácido oxálico (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), ureia (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), ácido acético glacial (Carlso Erba reagents), ácido clorídrico (Fluka, 37%), tetracloroaurato(III) (Sigma) e cloreto de potássio (VWR chemicals, 99,8%)

A proteína utilizada foi a Gal d 3 (ovotransferrina, MyBioSource 337 µg/mL).

O monómero empregue foi o cloridrato de 4-aminofenol (Sigma).

3.2 Soluções

Para a realização das medições eletroquímicas, prepararam-se soluções tampão fosfato 0,1 M, pH 7, juntando as quantidades adequadas de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 , e acertando o pH até ao valor desejado. Foram também preparadas soluções de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 0,1 M nesse tampão.

As soluções mãe de ovotransferrina foram mantidas no frigorífico a 4 °C. A partir destas soluções foram preparadas, diariamente, diluições de diferentes concentrações, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.

Para as polimerizações, foram preparadas soluções com concentrações diferentes de monómero, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7, às quais se adicionaram quantidades diferentes de ovotransferrina.

Para o processo de extração da proteína do MIP após polimerização foi preparada uma solução de NaOH 0,1 M. Foram ainda testadas, para a extração da proteína, uma solução de ácido oxálico 0,5 M, uma solução de ureia 0,1 M, uma solução de cloreto de potássio 0,1 M e uma solução de SDS com 1 % de ácido acético.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade = 18.2 MΩ.cm), obtida a partir de um sistema de purificação de água Millipore (Simplicity 185).

3.3 Equipamento

Todas as medições voltamétricas foram realizadas num potencióstato/galvanostato de marca Metrohm Autolab, modelo PGSTAT204. Este equipamento foi controlado com o auxílio do software NOVA da Metrohm Autolab, versão 1.11.

Foram usados elétrodos serigrafados de carbono (SPCE, marca Metrohm DropSens, modelo DRP-110). A superfície do eletrodo de trabalho do SPCE (*Screen-Printed Carbon Electrode*) foi modificada com nanopartículas de ouro da seguinte maneira: foram colocados 25 μL de uma solução de tetracloroaurato(III) (0,10 mM em 0,1 M HCl) no eletrodo e foi aplicado um potencial de -0,20 V durante 60 s.

Foram também utilizadas micropipetas Eppendorf Research plus de 10 μL , 200 μL e 1000 μL .

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo, modelo NewClassic MS), com precisão de 0,00001 g.

3.4 Preparação do Polímero Molecularmente Impresso

A síntese do MIP foi efetuada por eletropolimerização, diretamente na superfície dos elétrodos. Para tal, 40 μL de solução de polimerização, contendo 4-aminofenol e ovotransferina, foram colocados no eletrodo, procedendo-se, em seguida, à formação de um filme polimérico, através da aplicação de voltametria cíclica, numa gama de potencial entre -0,2 e 1,0 V, durante 20 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s

Após a polimerização, os elétrodos foram lavados com água ultrapura e secos.

Seguidamente, procedeu-se à extração da proteína do filme polimérico, usando um solvente de extração. Durante 2 horas foram colocados 40 μL de solução de NaOH 0,1 M, intercalados com lavagens com água ultrapura.

O mesmo processo foi aplicado na preparação dos polímeros não impressos (NIP), contudo, sem colocar a ovotransferrina na solução de polimerização.

3.5 Estudos Eletroquímicos

As interações entre a ovotransferrina e o NIP e MIP foram avaliadas através de medições indiretas, usando, para esse efeito, o sinal eletroquímico de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,1 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 7. Assim, usando esta solução, procedeu-se à medição do sinal quer por CV, quer por DPV, de -0,2 e 0,6 V. De seguida, o MIP ou NIP foram lavados com água ultrapura e secos. Foi então incubado, tanto no MIP como no NIP, 5 μL de uma solução de ovotransferrina durante 15 min, ao fim dos quais se realizou uma

nova lavagem dos elétrodos, com água ultrapura, e posterior secagem. Por fim, realizou-se um novo ensaio quer por CV, quer por DPV usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,1 M em tampão fosfato 0,1 M. A diferença entre as intensidades de corrente do pico inicial (após extração) e do pico após incubação com a proteína foi utilizada para fins analíticos.

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos, assim como a discussão dos mesmos.

4.1 Desenvolvimento de um sensor seletivo para a ovotransferrina

O objetivo do sensor será a sua aplicação na análise da ovotransferrina em produtos alimentares, pelo que a seletividade do mesmo é um parâmetro fulcral na determinação do seu sucesso. Neste trabalho, foi então utilizada a tecnologia de impressão molecular para construir um sensor seletivo para a ovotransferrina.

A integração do MIP no transdutor foi alcançada utilizando a eletropolimerização uma vez que é uma técnica que apresenta bons resultados na impressão de proteínas, comprovado na literatura, permitindo produzir filmes poliméricos molecularmente impressos diretamente na superfície do eléctrodo, com relativa simplicidade e rapidez. Permite de igual modo controlar não só a espessura do filme, mas também a sua morfologia.

A espessura do filme é um parâmetro relevante, na medida em que a remoção da proteína, no momento da sua extração, é facilitada quando o filme é fino, porque, assim, a maioria das cavidades de impressão situam-se na superfície, ou próximas dela. Uma espessura elevada poderia resultar numa impressão irreversível da proteína, dificultando o processo de extração.

Após serem testados alguns monómeros, o 4-aminofenol demonstrou ser o mais eficaz, uma vez que concilia uma menor largura do pico de oxidação com o facto de não cobrir excessivamente a superfície do eléctrodo, logo no segundo ciclo de polimerização.

4.1.1 Impressão Molecular

A impressão molecular da ovotransferrina na superfície dos eléctrodos SPCE foi realizada por eletropolimerização utilizando uma solução contendo 20 mM de 4-aminofenol e 3 µg/mL de ovotransferrina, em tampão fosfato 0,1 M pH 7. A eletropolimerização foi realizada por voltametria cíclica, efetuando-se 20 ciclos entre -0,2 e 1,0 V, a uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. Desta forma, foi criado um filme de poliaminofenol com moléculas de ovotransferrina impressas, formando-se um MIP.

O NIP foi construído de forma homóloga, com uma solução de 20 mM de 4-aminofenol em tampão fosfato 0,1 M pH 7, no entanto, sem a presença da ovotransferrina.

Na Figura 4.1 apresentam-se os voltamogramas registados durante os 20 ciclos da polimerização do MIP e NIP.

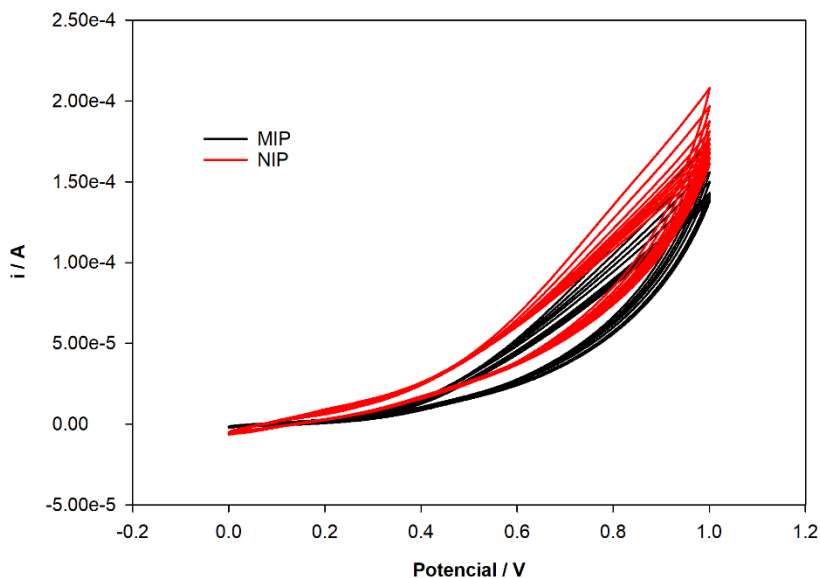


Figura 4.1- Eletropolimerização por CV. Voltamogramas da polimerização do MIP e NIP

Através da análise do Figura 4.1, verifica-se que o aumento do número de ciclos reduz a intensidade da corrente de oxidação. Tal resulta do aumento da espessura da camada de polímero formada na superfície do eléctrodo, uma vez que, após o primeiro pico de oxidação do 4-aminofenol, segue-se uma redução desse mesmo pico, comprovando a natureza não condutora do filme.

É possível constatar uma diferença entre o primeiro ciclo de polimerização do MIP e do NIP, sendo que na formação do NIP observa-se um pico de oxidação ligeiramente superior ao pico registado na formação do MIP. Isto pode ser devido à presença da ovotransferrina uma vez que, sendo esta não eletroativa (não condutora), resulta numa intensidade da corrente de oxidação menor.

4.1.2 Otimização do sensor

Na síntese de MIPs por eletropolimerização são vários os parâmetros que devem ser otimizados, de forma a garantir o seu sucesso na aplicação desejada.

Assim, foram estudadas as condições de polimerização, nomeadamente a concentração quer de 4-aminofenol, quer de ovotransferrina, na solução de polimerização, o número de ciclos de polimerização, o solvente de extração, o tempo de extração e o tempo de incubação. Os resultados são apresentados na forma da diferença entre a intensidade de corrente do pico após extração da ovotransferrina e a intensidade da corrente do pico após

a incubação com ovotransferrina (Δi_p), usando DPV e uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,1 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.

Concentração de 4-aminofenol

Foram realizados diferentes ensaios, variando a concentração do monómero 4-aminofenol na solução de polimerização (1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 mM).

Na Figura 4.2, encontra-se representado o gráfico correspondente à otimização da concentração de 4-aminofenol.

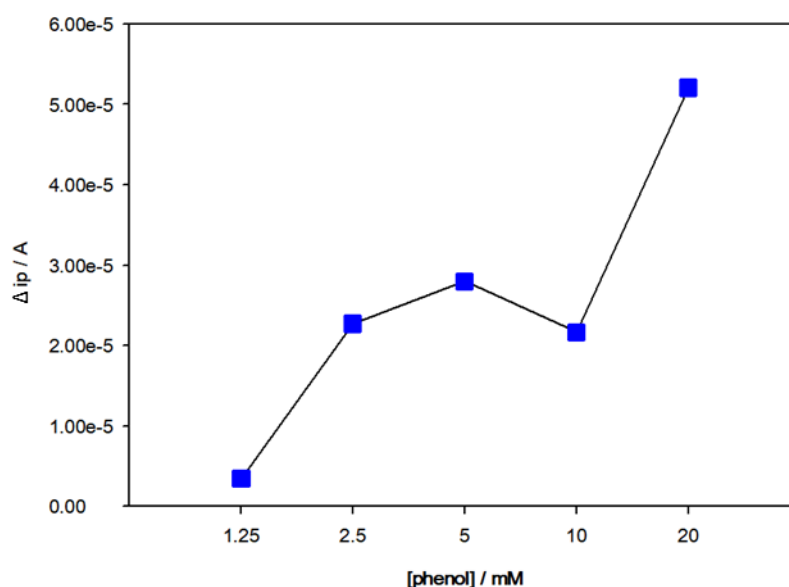


Figura 4.2- Variação do Δi_p em função da concentração de 4-aminofenol, no MIP

Na Figura 4.2, é possível notar uma subida de Δi_p de 1,25 a 2,5 mM, estabilizando até 10 mM, após o qual aumentou.

Assim, a concentração de 4-aminofenol que permite um maior valor de Δi_p para o MIP é a de 20 mM, sendo considerada como ótima.

Concentração de ovotransferrina

De forma a otimizar a concentração de ovotransferrina na solução de polimerização, foram testadas as concentrações de 0,30; 3,0; 30 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na Figura 4.3 apresentam-se os resultados obtidos na otimização da concentração de ovotransferrina.

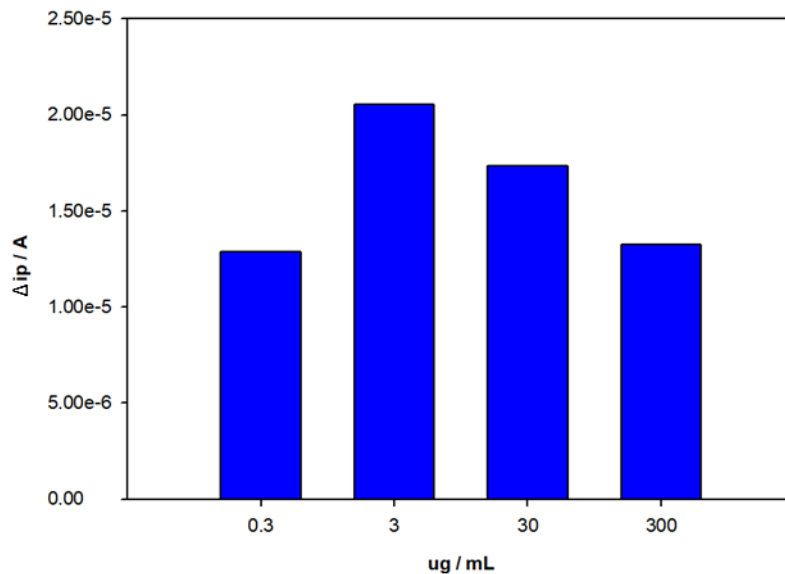


Figura 4.3- Variação do Δi_p em função da concentração de ovotransferrina, no MIP

É possível verificar que existe um aumento do Δi_p até à concentração de 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de ovotransferrina, seguido de um decréscimo nas últimas concentrações.

Na utilização da concentração mais baixa (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foram impressas menores quantidades de proteína no polímero, levando a um menor número de cavidades e, conseqüentemente, menores valores de Δi_p . Para as concentrações superiores a 3,0 $\mu\text{g/mL}$, o facto do valor de Δi_p diminuir pode ser resultado da maior dificuldade em extrair uma quantidade mais elevada de proteína da matriz polimérica, resultando numa diminuição do número de cavidades livres e, conseqüentemente, em valores inferiores de Δi_p .

Por estes motivos, determinou-se que a concentração ótima de ovotransferrina, na solução de polimerização, é de 3,0 $\mu\text{g/mL}$.

Número de Ciclos

Na eletropolimerização, a espessura do filme polimérico pode ser controlada através do número de ciclos de varrimento do potencial. Deste modo, foram testados diferentes números de ciclos: 5, 10, 15, 20 e 30.

Os resultados encontram-se representados na Figura 4.4.

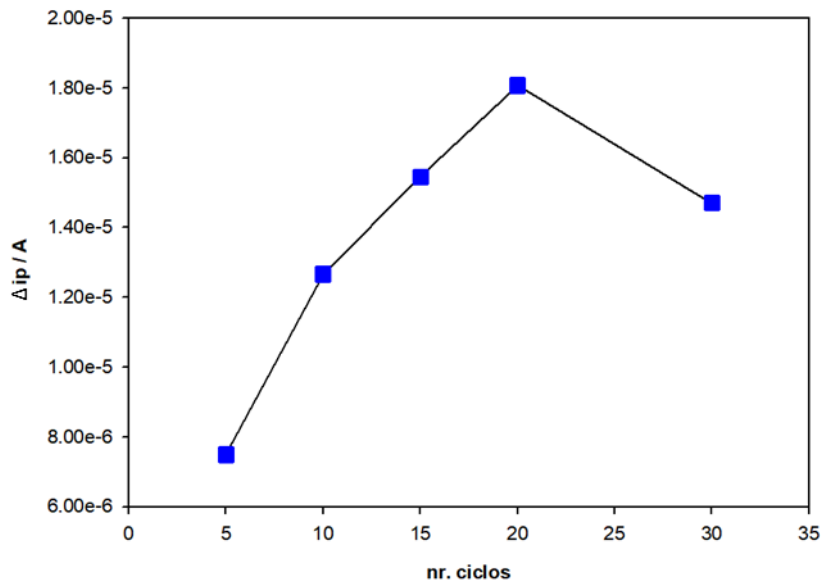


Figura 4.4- Variação do Δi_p em função do número de ciclos, no MIP

A partir da análise dos resultados obtidos, averigua-se que o valor de Δi_p aumenta dos 5 até aos 20 ciclos, seguindo-se uma diminuição desse mesmo valor dos 20 para os 30 ciclos. Esta diminuição é resultado da formação de um filme polimérico mais espesso que, sendo não condutor, dificulta a transferência de eletrões na superfície do elétrodo. A maior espessura do filme contribui também para uma maior dificuldade na extração da proteína, resultando num menor número de cavidades livres e, conseqüentemente, num menor valor de Δi_p .

Desta forma, o número de ciclos de polimerização ótimo é de 20 ciclos.

Solvente de Extração

A extração da proteína da matriz polimérica é um processo fulcral na construção de um MIP uma vez que são as cavidades criadas nesta etapa que ditam a eficácia do sensor. A extração da proteína depende muito das características do solvente utilizado, pelo que foram realizados ensaios com solventes ácidos, básicos, orgânicos, detergentes, entre outros.

Os solventes testados foram o hidróxido de sódio 0,1 M, ácido oxálico 0,5 M, ureia 0,1 M, cloreto de potássio 0,1 M, água e dodecilo sulfato de sódio com 1 % de ácido acético (Figura 4.5). Na figura, o gráfico de barras diz respeito ao valor da intensidade de corrente do pico após incubação com ovotransferrina, enquanto que o gráfico de linhas corresponde ao valor do Δi_p .

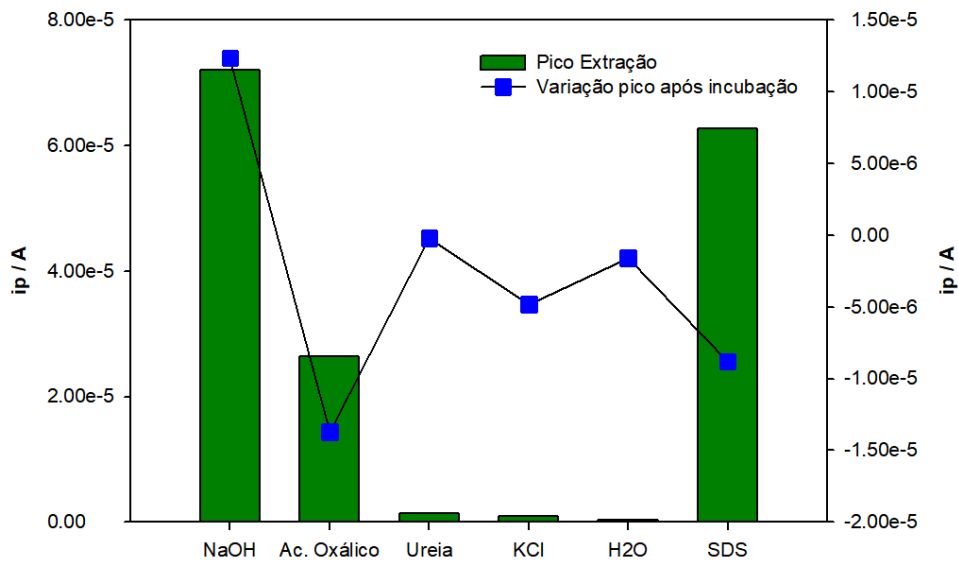


Figura 4.5- Valores de i_p (Gráfico de barras) e Δi_p (Gráfico de linhas) obtidos com os solventes de extração estudados. Analisando o gráfico de barras é possível verificar que quando se utilizou o NaOH e o SDS obtiveram-se as melhores respostas, enquanto que as respostas dos restantes solventes foram bastante inferiores. Relativamente ao gráfico de linhas, é possível observar que o maior valor de Δi_p foi obtido no ensaio onde foi utilizado o NaOH. Assim, é possível concluir que o solvente de extração ótimo é o NaOH.

Tempo de Extração

Foram também testados diferentes tempos de extração: 30, 60, 90, 120 e 180 min. Na Figura 4.6 encontram-se os resultados obtidos, correspondentes à otimização do tempo de extração.

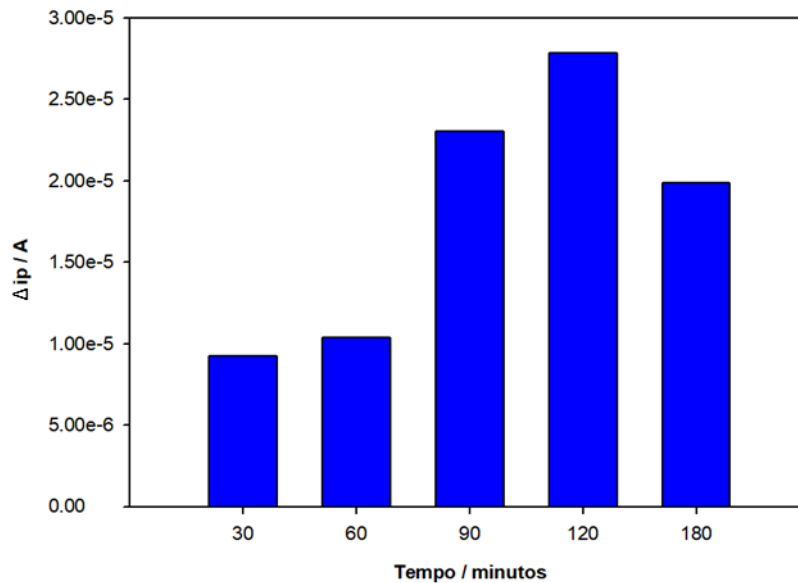


Figura 4.6- Variação do Δi_p em função do tempo de extração, no MIP

Como se pode observar na Figura 4.6, o valor de Δi_p aumenta com o aumento do tempo de extração até aos 120 min, sendo que depois existe um decréscimo, relativo ao tempo de 180 min. Este decréscimo pode ser devido à degradação do polímero, resultado de uma exposição excessiva ao solvente.

Deste modo, foi utilizado um tempo de extração de 120 min, uma vez que foi o que apresentou um maior valor de Δi_p .

Tempo de Incubação

Por último, foi otimizado o tempo de incubação com a proteína, variando os tempos: 7,5; 15; 20 e 30 min (Figura 4.7).

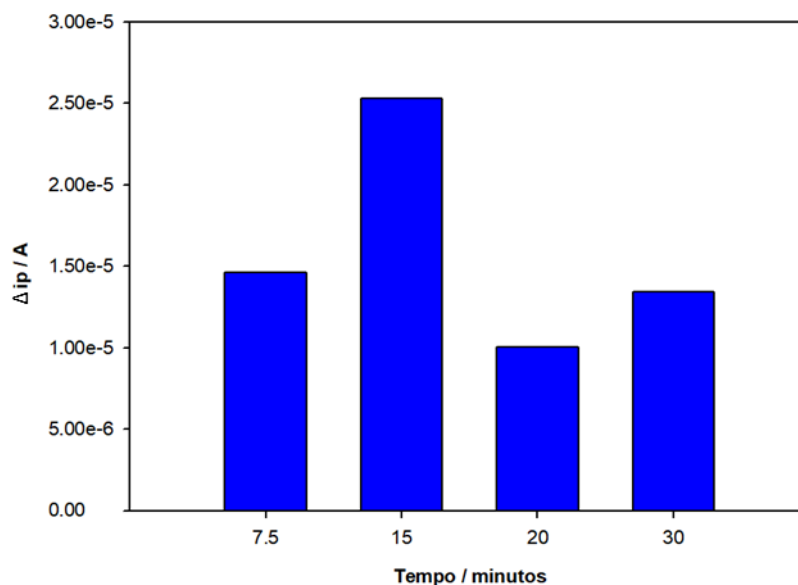


Figura 4.7- Variação do Δi_p em função do tempo de incubação, no MIP

Através da análise da Figura 4.7, observa-se um aumento no valor de Δi_p até um tempo de incubação de 15 min sendo que, posteriormente, o sinal sofre oscilação. A oscilação verificada pode ser devida à degradação da proteína em períodos de tempo mais elevados. Desta forma, conclui-se que a resposta ideal era aquela que ocorria com um tempo de incubação de 15 min, tendo por isso sido considerado como ótimo.

4.1.3 Caraterização do Sensor

Foi realizada uma caraterização, passo a passo, da construção e utilização do sensor desenvolvido. Para tal, foram realizadas medições por CV, utilizando uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,1 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 7, medindo o sinal após cada etapa de construção e funcionamento do sensor. Os resultados encontram-se representados na Figura 4.8.

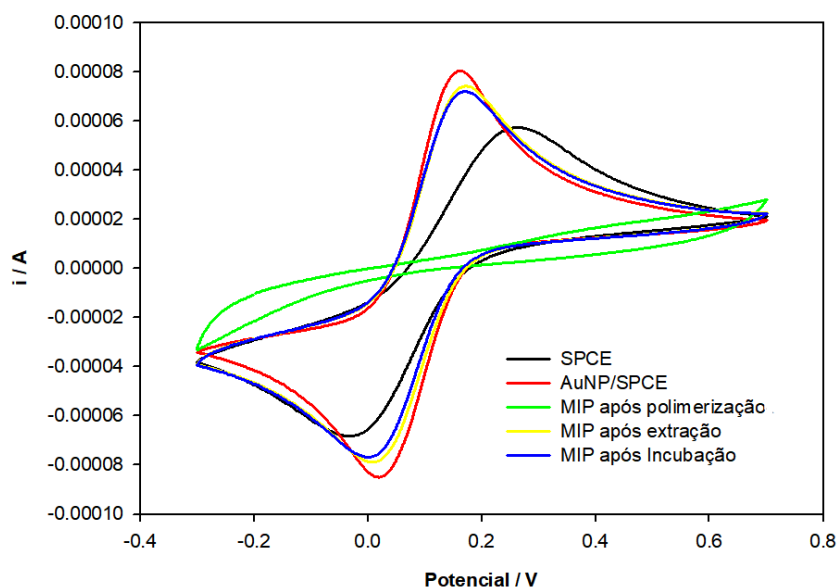


Figura 4.8- Caracterização da construção, passo a passo, do sensor MIP

Analisando a Figura 4.8, podem-se observar dois picos que correspondem ao eléctrodo não modificado (SPCE). Após a modificação do eléctrodo com nanopartículas de ouro (AuNP/SPCE), esses mesmos picos redox tornam-se ainda mais notórios, resultando numa melhoria do sinal. Após a polimerização (MIP após polimerização), o sinal diminui consideravelmente, deixando de existir picos redox, resultado do bloqueio da transferência de electrões por parte do polímero não condutor. Após a extração (MIP após extração), o sinal aumenta, pelo que os picos redox tornam-se novamente visíveis, indicando que a remoção da proteína foi efetuada com sucesso. Este aumento de sinal pode ser explicado pelo facto de, nesta etapa, serem criadas cavidades no polímero, resultando num aumento da porosidade do MIP, o que facilita a difusão do ferro na superfície do eléctrodo. Contudo, este sinal é inferior àquele do sinal para o eléctrodo modificado com nanopartículas de ouro (AuNP/SPCE), demonstrando-se assim que a extração não remove o polímero da superfície do eléctrodo, permitindo apenas a extração da proteína. Por último, após a incubação com a proteína (MIP após incubação), os picos redox sofrem nova diminuição, devido ao facto das moléculas de ovotransferrina preencherem as cavidades do polímero, diminuindo assim o sinal do ferro.

4.1.4 Resposta Analítica

Após a construção do sensor, foi construída uma curva de calibração, onde se representa a Δi_p em função da concentração de proteína (Figura 4.9). Para tal, testou-se a resposta

do sensor para diferentes concentrações da proteína: 0,010; 0,025; 0,050; 0,10; 0,25 e 0,50 $\mu\text{g/mL}$.

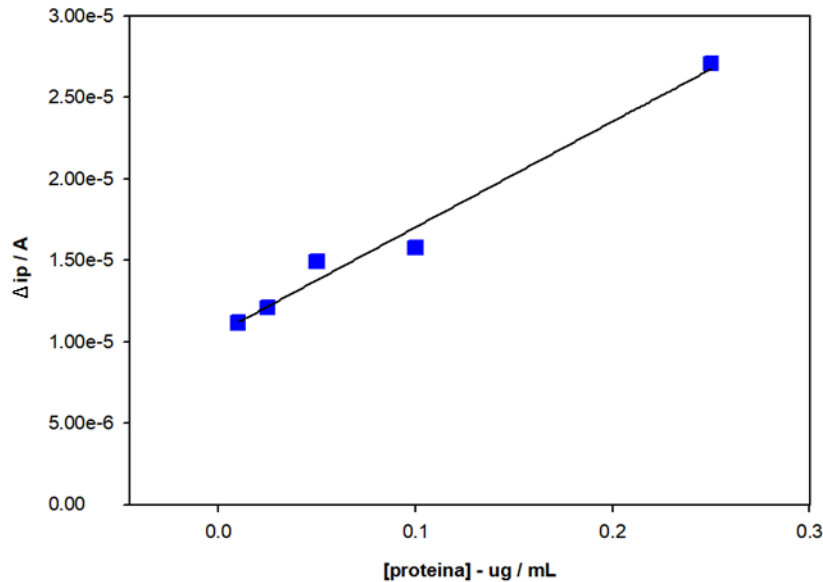


Figura 4.9- Retas de calibração do sensor MIP para a análise de ovotransferrina

O sensor demonstra um comportamento linear entre o valor de Δi_p e a concentração de ovotransferrina na gama testada, com uma equação da reta $y = 6,48 \cdot 10^{-5}x + 1,06 \cdot 10^{-5}$ e um coeficiente de determinação, r^2 , de 0,9813.

Os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) foram de 0,047 e 0,16 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente (calculados utilizando as equações $\text{LOD} = 3 \times S_{y/x}/m$ e $\text{LOQ} = 10 \times S_{y/x}/m$, em que $S_{y/x}$ é o desvio padrão da regressão linear e m é o declive da reta de calibração). O coeficiente de variação do método (V_{x0}) foi de 10 % (calculado utilizando a equação $V_{x0} = S_{y/x}/(m \times x_{\text{med}}) \times 100$, em que x_{med} é a média das concentrações das soluções padrão), o que é aceitável para este tipo de sensor. A precisão dos resultados, em termos da repetibilidade, foi avaliada através da análise de uma solução de ovotransferrina de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. O coeficiente de variação obtido foi de 14 %, o que é superior ao desejado (10 %).

5 Conclusão

É notável, ao longo dos anos, um aumento da incidência das alergias alimentares, tornando-se um problema de saúde pública. Com a legislação em vigor, surge a necessidade de desenvolver métodos expeditos para a análise de alergénios que forneçam resultados precisos e exatos, de forma a garantir uma rotulagem adequada e a segurança dos consumidores.

O facto de os produtos alimentares apresentarem lucros e prazos de validade limitados, aumenta a carência de dispositivos de deteção de alergénios que possuam não só baixos custos, como também tempos de análise reduzidos. Além disso, métodos de fácil operação ajudarão na sua implementação.

Desta forma, sensores baseados em MIP, que conciliam simultaneamente baixos custos e facilidade de operação a uma elevada sensibilidade e seletividade, possuem um enorme potencial na produção de dispositivos portáteis de uso não especializado.

No presente trabalho, foi desenvolvido um sensor voltamétrico seletivo para a ovotransferrina, um alergénio da clara do ovo de galinha, utilizando um eléctrodo serigrafado de carbono modificado com nanopartículas de ouro e um polímero molecularmente impresso, sintetizado através da técnica “*surface imprinting*” por eletropolimerização.

Uma vez que a ovotransferrina não é eletroativa, a impressão foi estudada com recurso a polímeros não condutores e através da medição indireta da ovotransferrina, usando o par redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$).

O monómero empregue foi o 4-aminofenol uma vez que os dados obtidos indicam uma adesão satisfatória ao próprio eléctrodo, assim como uma boa capacidade de interação com a ovotransferrina, sendo isso positivo para a preparação de um MIP com boa seletividade. Foram então otimizadas as condições de polimerização, extração e incubação, realizando-se também uma caracterização do sensor obtido, por voltametria cíclica. Na etapa de polimerização, as condições ótimas demonstraram ser uma solução de polimerização com uma concentração de 20 mM de 4-aminofenol e uma concentração de 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de ovotransferrina, tendo a polimerização uma duração de 20 ciclos. Para a fase extração, o solvente utilizado foi o hidróxido de sódio, aplicado durante 120 min e para a incubação foi tomado como ótimo uma duração de 15 min.

Foi estabelecida uma relação linear entre Δi_p e a concentração de ovotransferrina entre 0,010 e 0,50 $\mu\text{g/mL}$, com um limite de deteção (LOD) de 0,047 $\mu\text{g/mL}$ e um limite de

quantificação (LOQ) de 0,16 $\mu\text{g/mL}$. A precisão do método foi aceitável, uma vez que o coeficiente de variação foi de 10 %, e a precisão dos resultados, em termos da repetibilidade, foi superior ao desejado (10 %), obtendo-se um valor de 14 %.

Porém, no decorrer do trabalho, não foi possível realizar estudos de seletividade, onde se analisaria a resposta do sensor a outras proteínas. Também não foram realizados estudos para avaliar a exatidão e precisão dos resultados, assim como a aplicação do sensor a amostras reais de, por exemplo, produtos alimentares com o aviso “Pode conter vestígios de ovo”. Estas são então algumas sugestões para trabalhos experimentais futuros, de forma a avaliar a aplicabilidade do sensor para que este possa, eventualmente, ser comercializado.

6 Referências

- [1] Pádua, I., Barros, R., Moreira, P., & Moreira, A. (2016). *Alergia Alimentar na Restauração*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde.
- [2] VIEIRA, R. J. (2015). *ALERGÉNIOS ALIMENTARES: UM ESTUDO SINÓPTICO*. Lisboa.
- [3] Europeu, P. (2011). REGULAMENTO (UE) N.º 1169/2011, de 25 de Outubro de 2011. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- [4] Dzwolak, W. (2022). Allergen cross-contact control plan supporting the implementation of food allergen management (FAM) in small food businesses. *Food Control*, 135, 108777.
- [5] Shin, J. H., Reddy, Y. V., Park, T. J., & Park, J. P. (2021). Recent advances in analytical strategies and microsystems for food allergen detection. *Food Chemistry*, 371, 131120.
- [6] Abeyrathne, E. D., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2013). *Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review*. Seoul: Seoul National University.
- [7] Wu, J., & Acero-Lopez, A. (2011). Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. *Food Research International*, 46, 480-487.
- [8] *Allergen Details: Gal d.3*. (12 de Abril de 2022). Obtido de ALLERGEN NOMENCLATURE: <http://allergen.org/viewallergen.php?aid=337>
- [9] Moreira, E. M. (s.d.). *Determinação da Riboflavina por voltametria com adsorção*. Porto.
- [10] Nouws, H. (2021). *Apontamentos Instrumentação Médica e Eletrónica*. Porto.
- [11] Li G, Miao P. *Electrochemical Analysis of Proteins and Cells*. Nova Iorque: Springer.2013.
- [12] Almeida, P. J. (s.d.). *Aplicações analíticas da voltametria com adsorção*. Porto.
- [13] Row, H. Y. (29 de Junho de 2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer . pp. 156-172.
- [14] Pacheco, J. P. (13 de Novembro de 2020). MIPs "Molecular Imprinted polymers". Porto.
- [15] Ashleya, J., Shahbazia, M.-A., Kanta, K., Chidambarab, V. A., Wolffa, A., Bangb, D. D., & Suna, Y. (2017). Molecularly imprinted polymers for sample

- preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 606-615.
- [16] Rebelo, P., Costa-Rama, E., Seguro, I., Pacheco, J. G., Nouws, H. P., Cordeiro, M. N., & Delerue-Matos, C. (2020). Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 172, 112719.
- [17] Cao, Y., Feng, T., Xu, J., & Xue, C. (2019). Recent advances of molecularly imprinted polymer-based sensors in the detection of food safety hazard factors. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111447.
- [18] Wang, B., Hong, J., Liu, C., Zhu, L., & Jiang, L. (9 de Dezembro de 2021). MPDI. *An Electrochemical Molecularly Imprinted Polymer Sensor for Rapid β -Lactoglobulin Detection*.
- [19] Costa, R., Costa, J., Moreira, P., Brandao, A. T., Mafra, I., Silva, A. F., & Pereira, C. M. (2021). Molecularly imprinted polymer as a synthetic antibody for the biorecognition of hazelnut Cor a 14-allergen. *Analytica Chimica Acta*.
- [20] Su, W.-X., Rick, J., & Chou, T.-C. (2008). Selective recognition of ovalbumin using a molecularly imprinted polymer. *Microchemical Journal*, 92, 123-128.