



**ANA ANGÉLICA RESENDE**

**SENSORES NANOMÉTRICOS À BASE DE ÁCIDO 10,12-  
PENTACOSADIINÓICO (PCDA) E  $\beta$ -CICLODEXTRINA  
PARA DETECÇÃO DE IVERMECTINA**

**LAVRAS-MG**

**2024**

**ANA ANGÉLICA RESENDE**

**SENSORES NANOMÉTRICOS À BASE DE ÁCIDO 10,12-PENTACOSADIINÓICO  
(PCDA) E  $\beta$ -CICLODEXTRINA PARA DETECÇÃO DE IVERMECTINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais área de concentração Engenharia de Biomateriais, para obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. José Manoel Marconcini

Orientador

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Ana Angélica.

Sensores nanométricos à base de ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) e  $\beta$ -ciclodextrina para detecção de ivermectina / Ana Angélica Resende. - 2024.

119 p.

Orientador(a): José Manoel Marconcini.

Coorientador(a): Igor José Boggione Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Nanosensor colorimétrico. 2. Vesículas de polidiacetileno. 3. Mudança cromática. I. Marconcini, José Manoel. II. Santos, Igor José Boggione. III. Título.

**ANA ANGÉLICA RESENDE**

**SENSORES NANOMÉTRICOS À BASE DE ÁCIDO 10,12-PENTACOSADIINÓICO  
(PCDA) E  $\beta$ -CICLODEXTRINA PARA DETECÇÃO DE IVERMECTINA**

**NANOMETRIC SENSORS BASED ON 10,12-PENTACOSADIINOIC ACID (PCDA)  
AND  $\beta$ -CYCLODEXTRIN FOR IVERMECTIN DETECTION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais área de concentração Engenharia de Biomateriais, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de maio de 2024.

Dr. José Manoel Marconcini EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO

Dr. Gustavo Henrique Denzin Tonoli UFLA

Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho UFLA

Dra. Alessandra Álves Correa Forner UFSCar

Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO

Prof. Dr. José Manoel Marconcini

Orientador

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2024**

*À minha filha, Clara Resende Santos e ao  
meu marido Edgar A. P. Santos, Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força que me concedeu para chegar até aqui. Me sustentando em todas as áreas da minha vida e renovando minhas esperanças a cada dia.

Aos meus pais, Ronan e Cleidir, minha imensa gratidão por nunca terem desistido de mim. Por terem sempre me apoiado com tanto amor, carinho e paciência. Vocês são a melhor parte de mim.

Às minhas irmãs, Adriane e Alessandra, minhas fiéis e incansáveis apoiadoras. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por todo amor, carinho e compreensão.

A meu marido, Edgar, obrigada por todo incentivo, por segurar sempre minha mão e não soltar jamais. E principalmente por me dar o maior presente de todos, nossa pequena Clara. É tudo por ela, por nós, por nossa família alicerçada em Deus.

Ao meu querido amigo Mário, pela parceria e amizade que construímos ao longo de todos esses anos. Você foi e sempre será fundamental na minha vida.

Ao meu comitê de orientação, professor Doutor José Manoel Marconcini e Doutor Igor José Boggione Santos, obrigada por todo o aprendizado, compreensão, conselhos e boas risadas. Vocês com certeza deixaram a caminhada apesar de árdua, mais leve.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais pela oportunidade.

Ao grupo de pesquisa de Nanotecnologia em Bioprocessos (NANOTEC), obrigada por compartilharem comigo os dias mais difíceis, as horas mais agonizantes e principalmente as experiências mais extraordinárias e divertidas. Obrigada pelos momentos de risadas e descontração em meio a tanto apereio. Vocês melhoravam meus dias no laboratório.

Aos técnicos de laboratório, funcionários e professores, da UFLA e da UFSJ, pela disponibilidade e auxílio necessário. A ajuda de vocês foi essencial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado (processo 140040/2021-8).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelos equipamentos utilizados durante a execução do trabalho.

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar a redação final desta pesquisa.

*“Fala com sabedoria e ensina com amor!”*

*“O que te desafia, te faz mudar!”*

## RESUMO

O Brasil alcançou um recorde de produção de rebanho bovino de 234,4 milhões de animais em 2022, representando um aumento de 4,3% em relação ao ano anterior, segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Como consequência, a demanda por tratamento e uso de medicamentos para garantir a sobrevivência e a reprodução de bovinos também aumentou. Antiparasitários de amplo espectro, principalmente da família das lactonas macrocíclicas, tem sido bastante utilizados para estes fins. Os resíduos desses medicamentos podem permanecer por determinado período no organismo animal e por consequência estar presentes nos tecidos e no leite, podendo levar à inibição de culturas lácteas importantes para a indústria e diversos problemas relacionados à saúde pública. Como resultado, a demanda por segurança dos alimentos e por formas de detectar compostos e/ou resíduos destes medicamentos nos produtos de origem animal, como o leite, tem crescido consideravelmente. As técnicas utilizadas na atualidade demandam tempo e possuem alto custo de implementação, inviabilizando muitas vezes a análise rotineira. Para melhorar a eficiência deste processo, os polidiacetilenos (PDAs) surgem como potenciais candidatos a sensores colorimétricos, pois possuem características estruturais e ópticas únicas, que permitem a mudança de coloração a partir de estímulos externos. Na primeira etapa dessa pesquisa, sistemas contendo PDA/ $\beta$ -ciclodextrina em três concentrações (1; 2 e 3 mM) foram estudados para potencial uso como sensores e os resultados preliminares constataram que na proporção de 1:2, o complexo manteve a coloração azul, sem grandes mudanças e se tornou promissor para aplicação. Na segunda etapa da pesquisa foi estudada a interação e a resposta colorimétrica entre este sistema e a ivermectina (IVR) e a morfologia, constatando-se que houve mudança cromática nos sistemas após interação e que após este contato com a IVR houve agregação das vesículas devido à possível quebra ou fusão das nanoestruturas. Na terceira parte deste estudo as interações moleculares foram investigadas através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e foi comprovado que o sistema foi responsivo à IVR. Contudo, investir em alternativas mais econômicas permitiria testagens em larga escala, beneficiando não somente os consumidores, mas também a economia global. E apesar de ainda haver muito a ser feito, acredita-se que este estudo possa contribuir significativamente para os avanços nas pesquisas relacionadas ao uso de sistemas compostos por vesículas de PDA/receptores, para detecção de inúmeras moléculas.

**Palavras-chave:** *Vesículas de polidiacetileno; Sensor colorimétrico; ressonância magnética nuclear;  $\beta$ -ciclodextrina; mudança cromática.*

## ABSTRACT

Brazil achieved a record cattle herd production of 234.4 million animals in 2022, representing an increase of 4.3% compared to the previous year, according to data from IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). As a consequence, the demand for treatment and use of medicines to ensure the survival and reproduction of cattle has also increased. Broad-spectrum antiparasitics, mainly from the macrocyclic lactone family, have been widely used for these purposes. Residues of these medicines can remain in the animal organism for a certain period and consequently be present in tissues and milk, which can lead to the inhibition of dairy cultures important for the industry and various problems related to public health. As a result, the demand for food safety and ways to detect compounds and/or residues of these medicines in products of animal origin, such as milk, has grown considerably. The techniques currently used require time and have a high cost of implementation, often making routine analysis unfeasible. To improve the efficiency of this process, polydiacetylenes (PDAs) emerge as potential candidates for colorimetric sensors, as they have unique structural and optical characteristics, which allow color changes based on external stimuli. In the first stage of this research, systems containing PDA/ $\beta$ -cyclodextrin in three concentrations (1, 2 and 3 mM) were studied for potential use as sensors and preliminary results found that in a 1:2 ratio, the complex maintained its blue color, without major changes and became promising for application. In the second stage of the research, the interaction and colorimetric response between this system and ivermectin (IVR) and morphology were studied, noting that there was a chromatic change in the systems after interaction and that after this contact with IVR there was aggregation of the vesicles due to the possible breakage or fusion of nanostructures. In the third part of this study, molecular interactions were investigated using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and it was proven that the system was responsive to IVR. However, investing in more economical alternatives would allow for large-scale testing, benefiting not only consumers, but also the global economy. And although there is still much to be done, it is believed that this study can significantly contribute to advances in research related to the use of systems composed of PDA vesicles/receptors, for the detection of numerous molecules.

**Keywords:** *Polydiacetylene vesicles; Colorimetric sensor; nuclear magnetic resonance;  $\beta$ -cyclodextrin; chromatic change.*

## INDICADORES DE IMPACTO

A presente tese investigou a possibilidade de uso do ácido 10,12 pentacosidiinóico (PCDA) funcionalizado com  $\beta$ -ciclodextrina como uma possível ferramenta para detecção de ivermectina em matriz sintética. Atualmente vários problemas na indústria láctea e na saúde pública são encontrados devido a presença de resíduos de medicamentos de uso veterinário como a ivermectina tanto em leite, quanto em tecidos animais. Os órgãos reguladores atuam com uma faixa de limite máximo de resíduos. Entretanto a análise rotineira desses resíduos é inviabilizada uma vez que as técnicas usadas para estes fins são técnicas robustas, com alto custo ou técnicas de culturas que demandam muito tempo. Compreender o mecanismo de mudança óptica do PCDA é essencial para realizar projetos de sensores com habilidades de detecção mais sensíveis e estáveis baseados neste material. No presente trabalho, objetivou-se principalmente o desenvolvimento de um sensor baseado nos materiais já citados. E ao término da pesquisa foi possível identificar pontos de aprimoramento do dispositivo almejado, como solucionar problemas de estabilidade coloidal do sistema aquoso através da imobilização em matriz 2D, visando aplicação como sensor colorimétrico em papel. A perspectiva futura abordada é a utilização deste aparato para identificação qualitativa da presença ou não de resíduos de ivermectina principalmente no leite. O sistema funcionaria a partir de identificação via análise RGB, realizada diretamente através de imagens obtidas por quaisquer smartphones. Os impactos que este dispositivo geraria estão relacionados a novas tecnologias que auxiliem o setor industrial, social e científico. O trabalho contribui para o fortalecimento da pesquisa científica brasileira, principalmente nas áreas de materiais, nanomateriais e sensores colorimétricos. À introdução de um método mais acessível para análise rotineira do leite, garantiria a segurança tanto da cadeia produtora e industrial, até mesmo ao consumidor do produto final. Assegurando que as indústrias lácteas possam trabalhar com insumos livres de contaminantes e possibilitando abrir portas para inovações tecnológicas na área dos polímeros condutores e contribuir com aspectos econômicos. Uma vez que não haveria perda de culturas lácteas importantes para os processos de fabricação de queijos, iogurtes e manteigas, a exemplo, e gastos em tratamentos para saúde pública. Assim se faz necessário investir em alternativas mais econômicas que permitam testagens mais rápidas e em larga escala. E por fim, apesar de ainda haver muito a ser feito, acredita-se que esta tese possa contribuir significativamente para os avanços nas pesquisas relacionadas ao uso de sistemas compostos por vesículas de PCDA/receptores, para detecção de inúmeras moléculas-alvo, com as mais diferenciadas aplicações.

## IMPACT INDICATORS

This thesis investigated the possibility of using 10,12 pentacosydiinoic acid (PCDA) functionalized with  $\beta$ -cyclodextrin as a possible tool for detecting ivermectin in a synthetic matrix. Currently, several problems in the dairy industry and public health are encountered due to the presence of residues of veterinary medicines such as ivermectin both in milk and in animal tissues. Regulatory bodies operate with a maximum residue limit range. However, the routine analysis of these residues is unfeasible since the techniques used for these purposes are robust, high-cost techniques or culture techniques that require a lot of time. Understanding the optical switching mechanism of PCDA is essential to realize sensor designs with more sensitive and stable detection abilities based on this material. In the present work, the main objective was to develop a sensor based on the materials already mentioned. And at the end of the research, it was possible to identify points for improvement of the desired device, such as solving problems of colloidal stability of the aqueous system through immobilization in a 2D matrix, aiming for application as a colorimetric sensor on paper. The future perspective addressed is the use of this apparatus for qualitative identification of the presence or absence of ivermectin residues, mainly in milk. The system would work based on identification via RGB analysis, carried out directly through images obtained by any smartphone. The impacts that this device would generate are related to new technologies that help the industrial, social and scientific sector. The work contributes to strengthening Brazilian scientific research, mainly in the areas of materials, nanomaterials and colorimetric sensors. The introduction of a more accessible method for routine milk analysis would guarantee the safety of both the production and industrial chain, and even the consumer of the final product. Ensuring that dairy industries can work with contaminant-free inputs and making it possible to open doors for technological innovations in the area of conductive polymers and contribute to economic aspects. Since there would be no loss of important dairy crops for the manufacturing processes of cheese, yogurt and butter, for example, and no expenditure on public health treatments. Therefore, it is necessary to invest in more economical alternatives that allow for faster and larger-scale testing. And finally, although there is still much to be done, it is believed that this thesis can contribute significantly to advances in research related to the use of systems composed of PCDA vesicles/receptors, for the detection of numerous target molecules, with the more differentiated applications.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	19
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	19
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
<b>3.1. Lactonas macrocíclicas (LMs)</b> .....	20
<b>3.2. Biossensores colorimétricos a base de Polidiacetileno (PDA)</b> .....	31
<b>3.3. <math>\beta</math>-Ciclodextrina</b> .....	37
<b>3.4. Conclusões</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS</b> .....	45
<b>ARTIGO 1 - TRANSIÇÃO CROMÁTICA EM SISTEMAS DE POLIDIACETILENO/COPOLÍMERO TRIBLOCO FUNCIONALIZADOS COM <math>\beta</math>-CICLODEXTRINA</b> .....	46
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>ARTIGO 2 – INTERAÇÃO DE SISTEMAS PCDA/<math>\beta</math>CD EM RESPOSTA À IVERMECTINA: ESTUDO CINÉTICO-COLORIMÉTRICO E MORFOLÓGICO</b> .....	69
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	69
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	71
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	75
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	96

<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>97</b>
<b>ARTIGO 3 –INTERAÇÃO DE SISTEMAS PCDA/BCD EM RESPOSTA À IVERMECTINA: ESTUDO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR) .....</b>	<b>101</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>102</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>REFRERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>116</b>
<b>TERCEIRA PARTE.....</b>	<b>118</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>119</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo censo do IBGE do ano de 2022, com 234,4 milhões de cabeças de gado, com crescimento de 4,3% em relação ao ano anterior em 2021, o Brasil se manteve como um dos maiores países com maior rebanho bovino do mundo. Ao passo que a produção de leite de vaca também cresceu em 2021, chegando a 34,8 bilhões de litros, um aumento de 2,7% em relação ao ano anterior segundo o censo do IBGE (2022). Com isso, a demanda de tratamento e uso de medicamentos para garantir a sobrevivência e a reprodução de bovinos, conseqüentemente, tem aumentado.

Os resíduos de medicamentos em produtos de origem animal tem se tornado uma preocupação mundial quando o assunto é saúde pública. Isso acontece pois muitas vezes os animais são tratados com medicamentos para fins terapêuticos, profiláticos e para melhorar a eficiência de reprodução. Apesar de não se apresentarem em taxas elevadas nestes produtos alimentares, resíduos destes medicamentos podem permanecer por um determinado período no organismo do animal e, conseqüentemente, podem estar presentes em seus tecidos e no leite (CEZAR et al., 2010; MÜLLER et al., 2020; SOARES et al., 2022; WANG; BEIER; SHEN, 2017).

Podemos destacar a existência de prejuízos para a indústria, quando resíduos desses medicamentos persistem no leite. Isso porque pode haver a inibição de culturas lácteas as quais são utilizadas para a fabricação de queijos e iogurtes, tornando este leite impróprio para industrialização. Além disso, resíduos de antiparasitários no leite podem acabar gerando odores desagradáveis em produtos concentrados como manteiga e queijos (quando estes conseguem ser produzidos). E, além dos prejuízos para a indústria, podemos ressaltar que os maiores problemas estão ligados a saúde pública, pois a presença desses resíduos em produtos de origem láctea, podem levar a reações alérgicas como coceira nos olhos e outras partes do corpo, urticária e eczema ou até mesmo tóxicas ao consumidor como quando essas reações alérgicas passam a se tornar reações anafiláticas (DANAHER et al., 2012).

Nesse sentido, atualmente, os antiparasitários de amplo espectro mais utilizados para o controle de infecções por nematódeos do trato gastrintestinal de bovinos são as drogas da família das lactonas macrocíclicas (LM) (CEZAR et al., 2010). E, devido às suas propriedades lipofílicas, estabilidade térmica (resistência a condições de cozimento, fermentação ácida e congelamento) têm apresentado persistência a longo prazo no corpo do animal e quando

presente no leite, a contaminação por LM pode persistir em produtos lácteos (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019).

Esta persistência abriu caminho para a necessidade de elaboração de um plano de análise rápida, simples e com custos relativamente baixos, que fossem capazes de detectar esse analito mesmo em matrizes complexas. Embora não seja uma exigência dos órgãos responsáveis pela segurança alimentar, a detecção rotineira desses compostos ainda é uma tendência no setor e por isso vem ganhando espaço. Técnicas de cultura para detecção desses resíduos exigem um tempo mínimo de 5 a 7 dias para conclusão e por este motivo os avanços nessa área tem se voltado ao estudo e ao desenvolvimento de técnicas e dispositivos de detecção mais práticos e que demandem menor tempo de resposta (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019).

Diante desse cenário e em resposta à necessidade de monitoramento da qualidade alimentar em ampla escala e até mesmo para resguardar as indústrias lácteas de prejuízos econômicos, o desenvolvimento de técnicas de detecção destes compostos nos produtos de origem animal, vem ganhando espaço. Tido isso como objetivo, foi criado o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), que prevê o monitoramento, investigação e exploração dos produtos de origem animal destinados à alimentação humana (MAPA, 2019). Tendo como principal base legal, a PNCRC faz uso da Instrução Normativa DAS Nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que estabelece alguns os limites máximos de resíduos (LMR) e também alguns métodos para análise desses resíduos, os quais podemos citar o método de imunoenaios (ELISA), detector por captura de elétrons, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia por camada delgada e gasosa, além de espectrofotometria de absorção atômica em casos em que esses resíduos possuam LMR igual a zero ou aquelas sem LMRs estabelecidos (MAPA, 1999).

O principal gargalo do uso das técnicas supracitadas, é que muitas vezes essas técnicas são demoradas, além de demandarem custo mais elevado, o que acaba por inviabilizar seu uso rotineiro (WANG; BEIER; SHEN, 2017) assim, o que tem-se buscado é desenvolvimento de métodos e protocolos mais simples, rápidos e baratos para a detecção desses resíduos. Assim, os quimiossensores baseados em polímeros conjugados são atraentes para este propósito, pois suas características de absorção, emissão e redox são sensíveis às perturbações ambientais. Uma alternativa seria o desenvolvimento de sensores a base de polidiacetilenos (PDAs), que são uma família de polímeros conjugados, geralmente preparados por irradiação UV de supramoléculas de diacetileno (DA) automontadas (CHEN; YOON, 2011). Essas estruturas se caracterizam por apresentar coloração inicial azul e após uma interação de fatores

tais como as alterações estruturais, químicas ou físicas, pode culminar na mudança de sua coloração para vermelho. Essas mudanças podem ser facilmente percebidas pelo espectro de absorção no UV-visível, ou até mesmo visualmente, tornando uma alternativa promissora às técnicas convencionais existentes.

Moléculas de poliacetilenos (PDA), são uma classe de polímeros conjugados bastante promissoras para serem utilizadas como alternativa às técnicas convencionais. Essas moléculas são obtidas a partir da fotopolimerização de compostos diacetilênicos e são atraentes por possuírem propriedades estruturais e ópticas únicas. Os PDAs exibem respostas colorimétricas a vários estímulos químicos e físicos. Podendo existir em diversas formas de automontagem que variam de acordo com o método de preparação ou natureza química das moléculas de síntese (BAEK et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; PATTANATORNCHAI et al., 2013; REZENDE et al., 2017; SEO et al., 2013). E, portanto, sendo uma alternativa promissora para uso como sensores colorimétricos nas mais variadas aplicações.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Desenvolver um novo sensor baseado em vesículas de polidiacetileno (PDA) visando aplicação em leite, que seja capaz de detectar antiparasitários à base de lactonas macrocíclicas e/ou seus resíduos em matriz sintética através da alteração colorimétrica do PDA.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Produzir sensores à base de PDA, via fotopolimerização;
- Caracterizar os sensores produzidos através de análises térmicas, químicas e estruturais;
- Avaliar a funcionalização das vesículas com  $\beta$ -ciclodextrina via métodos analíticos;
- Avaliar a funcionalidade dos sensores produzidos através da resposta colorimétrica;
- Realizar um estudo estrutural dos sistemas de sensor através de TEM e RMN;
- Avaliar a extensão da mudança cromática nos sistemas frente ao contato com a ivermectina (molécula alvo).
- Por fim, avaliar a viabilidade para aplicação como sensores.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Lactonas macrocíclicas (LMs)

A manutenção da saúde animal é indispensável e medicamentos veterinários são amplamente usados para fins terapêuticos, profiláticos e para melhorar a eficiência de reprodução, principalmente, em países em desenvolvimento (WANG; BEIER; SHEN, 2017). A família de lactonas macrocíclicas são endectocidas (antiparasitários) de amplo espectro utilizadas para controle de infecções por nematódeos do trato gastrointestinal de bovinos (CEZAR et al., 2010).

A incorporação do termo lactona macrocíclica (LM) descreve não apenas as avermectinas e as milbemicinas, mas também os macrolídeos. Esses compostos pertencem a famílias químicas estruturalmente muito semelhantes, mas com atividades biológicas diferentes. Em comum, além da estrutura química semelhante, formam classes importantes de agentes antibacterianos e antiparasitários que são aplicados na medicina humana, veterinária e na proteção de cultivos (CEZAR et al., 2010; WANG; BEIER; SHEN, 2017).

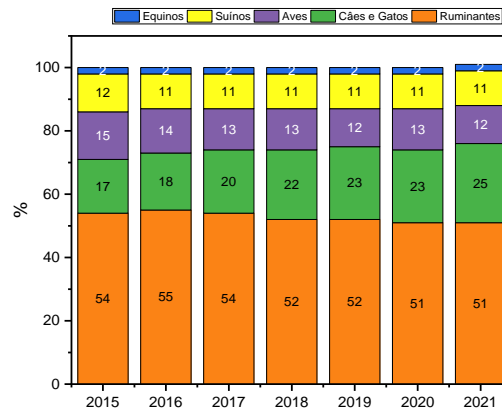
Avermectinas e milbemicinas são usadas para o controle e tratamento de doenças parasitárias, ao passo que, os macrolídeos são usados para tratar infecções causadas por bactérias ou como aditivos alimentares a fim de promover o crescimento. Atualmente, quase todos os métodos de controle dessas parasitoses como carrapatos e infecções por nematódeos dependem, em algum grau, do emprego desses quimioterápicos (CEZAR et al., 2010; WANG; BEIER; SHEN, 2017).

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan), o faturamento líquido da indústria veterinária de 2015 a 2021 foi crescente e o faturamento foi de 4,977 à 9,101 bilhões de reais. Considerando todos os produtos voltados à saúde animal, mais da metade do faturamento está voltado para tratamento de ruminantes, sendo os antiparasitários o medicamento que tem representado mais de um quarto do faturamento. As Figuras 1 e 2 a seguir retratam os dados de representatividade por espécie e por classe terapêutica, respectivamente (SINDAN, 2021).

Portanto, em decorrência de seu uso rotineiro, existe também uma ameaça potencial à saúde humana e animal. Por este motivo, limites máximos de resíduos de lactonas macrocíclicas (LMs) em produtos alimentícios de origem animal foram estabelecidos em vários países. O motivo para tal se deve ao possível desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos, parasitas resistentes a antiparasitários, alergia, câncer e intoxicação de animais e humanos,

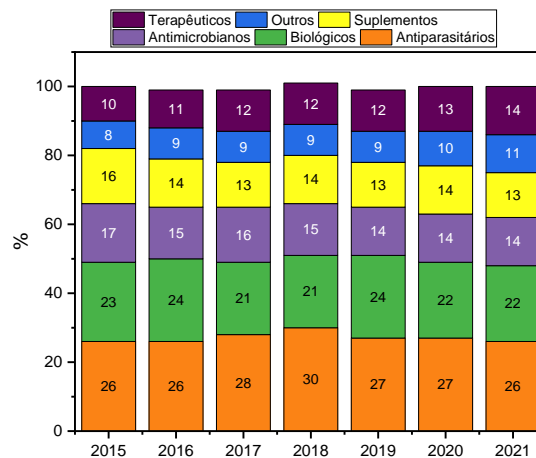
embora as LMs sejam consideradas na maioria das condições de uso, seguras (WANG; BEIER; SHEN, 2017).

Figura 1 - Representatividade por espécie do faturamento anual com medicamentos para saúde animal



Fonte: Do Autor. Adaptado de Sindan, Indústria Veterinária (2021).

Figura 2 - Representatividade por classe terapêutica do faturamento anual com medicamentos para saúde animal



Fonte: Do Autor. Adaptado de Sindan, Indústria Veterinária (2021).

Afim de assegurar a segurança dos alimentos, o Codex Alimentarius (Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods), estabelece uma coleção de normas alimentares adotadas internacionalmente, que visam proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas justas no comércio de alimentos, nas quais estão contidas os limites máximos de resíduos de antiparasitários em leite bovino (Tabela 1) (FAO; OMS; CODEX, 2021).

Existem várias organizações com o mesmo propósito, como a União Européia (European Commission Regulation) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Ambas seguem as mesmas diretrizes de normas dos limites estabelecidos pelo Codex (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019).

Tabela 1 - Limites máximos de resíduos de antiparasitários presentes no leite, estabelecidos pelo Codex Alimentarius.

<b>Lactona Macroclíca</b>	<b>Limite Máximo Permitido (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Abamectina	*
Ivermectina	10
Eprinomectina	20
Doramectina	15**

\* Não recomendado uso em animais produtores de leite

\*\* Dependendo do tempo de administração em vacas leiteiras, podem resultar em períodos de carência de leite, podendo ser abordada em programas de regulamentação nacional e/ou regional

Fonte: FAO; OMS; CODEX, (2021).

Devido à grande preocupação dos efeitos advindos do uso indiscriminado das lactonas macrocíclicas (LMs) para tratar e prevenir doenças em animais, tem-se uma pressão crescente sobre os laboratórios responsáveis pela segurança dos alimentos em monitorar o uso desses medicamentos e garantir que os alimentos para consumo humano sejam seguros. Assim, vários métodos analíticos foram desenvolvidos ao longo dos anos e são usados para determinar a presença de LMs em matrizes de alimentos. Cromatografia Gasosa (CG), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), eletroforese capilar (CE) e espectroscopia de massa (MS) são exemplos de métodos e técnicas para tal determinação. Entretanto, esses métodos instrumentais são complexos, demorados e requerem uma instrumentação volumosa e de alto custo, o que acaba limitando a aplicação em campo (WANG; BEIER; SHEN, 2017).

O uso de anticorpos para essa detecção também vem ganhando destaque, principalmente devido à alta especificidade. Por isso, anticorpos se apresentam como um método altamente sensível para determinação de uma vasta gama de compostos, possibilitando a criação de dispositivos e procedimentos de rotina para detecção de diversas estruturas moleculares. Entretanto, apesar das nítidas vantagens do uso de Imunoensaios para detecção de resíduos, o que ocorre é que na maioria das vezes os anticorpos requeridos para determinada detecção, possuem um alto valor, o que acaba inviabilizando seu uso para detecções rotineiras (WANG; BEIER; SHEN, 2017).

Por esta razão, cada vez mais tem se buscado o desenvolvimento de métodos e protocolos mais simples, rápidos que possam detectar resíduos LMs em matrizes complexas,

com alto nível de confiabilidade, precisão e que possam ser utilizados rotineiramente pelos órgãos de fiscalização de segurança alimentar.

### 3.1.1. Avermectinas (AVMs)

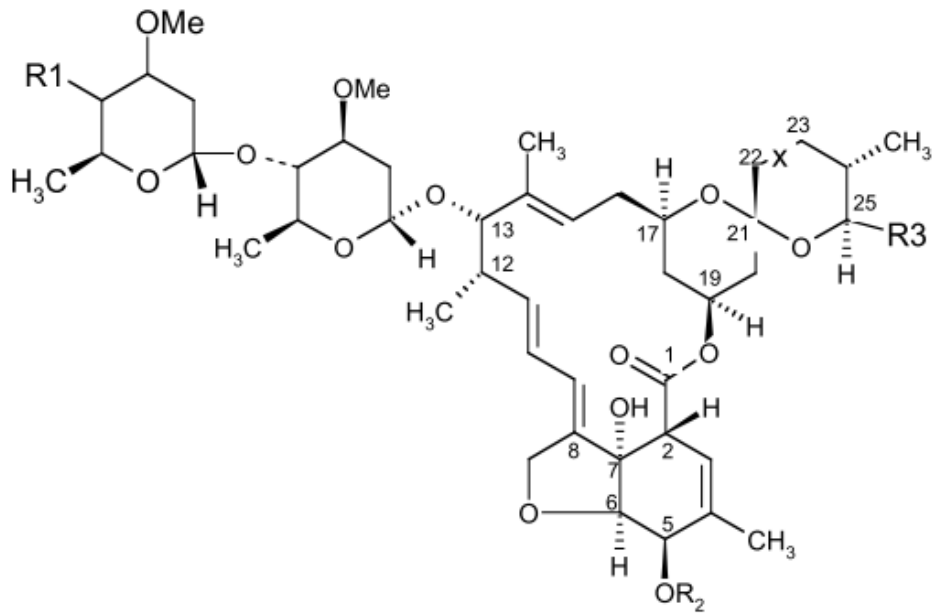
As avermectinas e seus derivados, são compostos pertencentes à família das lactonas macrocíclicas (LMs), destacando-se principalmente por seu modo de ação contra uma ampla gama de parasitas animais nematóides e artrópodes (AWASTHI et al., 2012).

Estruturalmente, as avermectinas (AVMs) são caracterizadas por um anel de lactona macrocíclico contendo 14-16 átomos com açúcares mono e dissacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Devido às suas propriedades lipofílicas, as AVMs têm persistência a longo prazo no corpo do animal e quando presente no leite, a contaminação por AVMs pode persistir em produtos lácteos. Além disso, elas são estáveis sob processamento comum por meio de aquecimento, em condições de cozimento e ainda, à fermentação ácida e ao congelamento a -20°C (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019; EL-SABER BATIHA et al., 2020).

Descobertas na década de 70 através da triagem intensiva de micróbios no solo, as avermectinas (AVMs) são produzidas pela fermentação do fungo actomiceto que vive no solo, *Streptomyces avermitilis*, detectado primeiramente no solo do Japão e depois da Itália. O grupo das AVMs é constituído por abamectina (ABA), ivermectina (IVR), eprinomectina (EPR), doramectina (DOR), e emamectina (EMA). O *S. avermitilis*, é conhecido por possuir atividades anti-helmínticas, acaricidas e inseticidas amplamente utilizadas na medicina veterinária para controlar um amplo espectro de infecções parasitárias na produção de alimentos de origem animal (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019; ZHANG et al., 2016). De todas as avermectinas existentes, a ABA e a IVR são as mais conhecidas e utilizadas como antiparasitários (DANAHER et al., 2006).

O metabolismo de diferentes lactonas macrocíclicas (LMs) e suas estruturas químicas foram revisadas em detalhes por Danaher e colaboradores (2006). E uma visão de marcadores de resíduos de LMs para medicamentos veterinários e pesticidas pôde ser observada. As LMs são grandes estruturas aneladas que possuem um anel macrocíclico de 16 membros, contendo um grupo espirocetal, um anel benzofurano e funcionalidades de dissacarídeos, como pode ser observado em detalhes na Figura 3, bem como as estruturas químicas e grupamentos funcionais dos resíduos de LMs na Tabela 2.

Figura 3 - Estruturas químicas das avermectinas



Fonte: Danaher et al., (2012).

Tabela 2 - Estruturas químicas e grupamentos funcionais dos resíduos de LMs

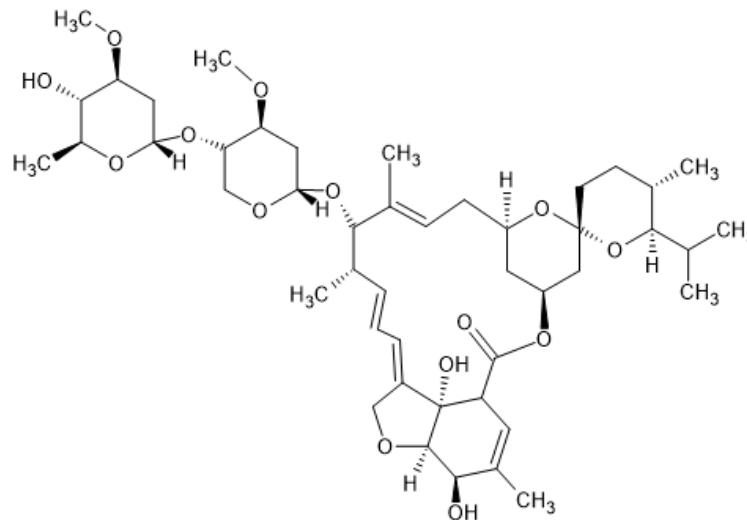
AVERMECTINA	R1	R2	R3	C <sub>22-x</sub> -C <sub>23</sub>
A <sub>1a</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
A <sub>1b</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
Avermectina B <sub>1a</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
Avermectina B <sub>1b</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
A <sub>2a</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
A <sub>2b</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
B <sub>2a</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
B <sub>2b</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
DOR	OH	H	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	-CH=CH-
EMA Benzoato B <sub>1a</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COOH CH <sub>3</sub> NH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
EPR B <sub>1a</sub>	NHCOCH <sub>3</sub>		CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
IVR B <sub>1a</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH-

Fonte: Danaher et al., (2012).

Algumas LMs possuindo monossacarídeo também existem, ou seja, selamectina ou nenhum grupo funcional de sacarídeo, como as milbemicinas, foram relatados. A maior parte dessas moléculas tem aplicação em produtos para animais de estimação ou proteção de cultivos. Os resíduos de LM podem sofrer metabolismo na produção de alimentos animais e maior degradação no meio ambiente. Um exemplo claro disso é que os LMs quando expostos à luz, podem isomerizar para formar um isômero 8,9-Z (DANAHER et al., 2012).

Um dos principais produtos da fermentação do *S. avermitilis* é a avermectina B<sub>1a</sub>, genericamente conhecida como abamectina, é a avermectina produzida naturalmente mais importante e a que é a mais eficaz contra insetos e ácaros e tem sido amplamente comercializada para uso agrícola. Seu derivado semi-sintético, produzida pela saturação de uma ligação dupla entre C<sub>22</sub> e C<sub>23</sub> (Figura 3) tem o nome genérico de ivermectina (Figura 4) e foi introduzida com um agente antiparasitário de amplo espectro para uso veterinário. Com esta hidrogenação seletiva, a IVR mantém uma conformação de “cadeia”, típica da família das avermectinas, atuando seletivamente nos canais de íons cloreto relacionados ao ácido  $\gamma$ -aminobutírico exclusivos de nematoides, insetos, carrapatos e aracnídeos, com toxicidade relativamente baixa ou inexistente em mamíferos (DANAHER et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

Figura 4 - Estruturas químicas da ivermectina



Fonte: Do Autor (2024).

A ivermectina (IVR) é uma mistura de duas avermectinas modificadas quimicamente através da saturação da ligação dupla 22-23 que produziu 22,23-diidroavermectina B<sub>1</sub> e contém pelo menos 80% de 22,23 diidroavermectina-B<sub>1a</sub> e menos de 20% de 22,23 dugudriavermectina B<sub>1b</sub> e foi o primeiro produto de lactona macrocíclicas (LMs) licenciado para uso há cerca de 20 anos e desde então todos os outros derivados das avermectinas citados anteriormente foram comercializados (DANAHER et al., 2012; LYNAGH; LYNCH, 2012). Esses compostos variam em estrutura apenas em C<sub>25</sub>, uma fração que não está envolvida na ligação. Como o componente B<sub>1a</sub> é mais letal para parasitas nematóides, insetos e ácaros, é convencional referir-se à mistura ou ao componente B<sub>1a</sub> como 'ivermectina' apenas (LYNAGH; LYNCH, 2012).

O mecanismo de ação das avermectinas se baseiam no bloqueio da transmitância da atividade elétrica em nervos e células musculares dos invertebrados através da abertura de canais de cloreto sensíveis ao glutamato. Em consequência deste processo, ocorre a hiperpolarização e a subsequente paralisia dos sistemas neuromusculares dos parasitas (EL-SABER BATIHA et al., 2020).

Embora a IVR tenha uma alta margem de segurança nos tratamentos antiparasitários, parte de sua excreção ocorre através da glândula mamária e a presença de resíduos de ivermectina no leite pode ter efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos em algumas espécies de mamíferos (SANTOS et al., 2019).

Os resíduos de medicamentos veterinários na cadeia alimentar representam risco potencial à saúde pública e são percebidos como indesejáveis pelos consumidores. Contudo, como já mencionado anteriormente, várias organizações do mundo como por exemplo a Codex Alimentarius e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), estabelecem limites máximos de resíduos ou níveis de tolerância para LMs no leite e outros tecidos comestíveis designados para consumo humano, como músculo, fígado, rim e gordura (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019).

A determinação de resíduos de LM em produtos de origem animal requer métodos com alta seletividade e sensibilidade, isso porque as concentrações de interesse são tipicamente muito baixas. Analiticamente, as abordagens usadas para detectar estes resíduos em matrizes alimentares e biológicas foram revisadas por Danaher e colaboradores (DANAHER et al., 2012) Métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido amplamente utilizados para determinar esses compostos no leite, urina, fezes, plasma (DANAHER et al., 2012) e tecidos animais como fígado, músculo e gordura (INOUE et al., 2009; WANG et al., 2011).

A detecção por HPLC com detecção de fluorescência é possivelmente o método mais comumente utilizado para a determinação de LMs e tem sido referência para atividades rotineiras (HPLC-MS) (TRAPERO et al., 2016).

Para tanto, a fim de facilitar, baratear e viabilizar o processo de detecção desses compostos em campo, busca-se por métodos de detecção de LMs mais simplificados, práticos e rápidos. Desta forma, para que isso seja possível, o presente estudo visa buscar por novos protocolos e métodos de análises que consigam suprir as necessidades de controle não somente das agências reguladoras, como também dos consumidores em geral. Garantindo um melhor

controle de qualidade de produtos voltados à alimentação humana e conseqüentemente acrescentar maior credibilidade à segurança alimentar.

A preocupação quanto a segurança dos alimentos no consumo de leite de espécies lactantes tratadas com Ivermectina (IVR) não é um fato recente (DANAHER et al., 2012). Todas as características farmacocinéticas do IVR dependerão da espécie animal, formulação e via de administração. Por ser altamente lipofílico, há o acúmulo dele no leite (PASSANTINO et al., 2011).

O modo de ação da ivermectina ainda não é completamente elucidado. No entanto, o que se sabe é que ela medeia a paralisia de nematóides e de algumas classes de ectoparasitas, fazendo com que sua permeabilidade de membrana a íons cloreto aumente. Assim, ela liga-se seletivamente aos canais de íon cloreto dependentes de glutamato, que são expressos em células nervosas e musculares de invertebrados. Tais canais estão presentes somente nos nervos e células musculares dos invertebrados e, uma vez potencializados, causam o aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons de cloreto, provocando a hiperpolarização dos nervos ou das células musculares, causando paralisia e morte do parasita. Como já mencionado, a IVR, por ser bastante lipofílica, é altamente solúvel em gordura corporal e assim é armazenada no fígado e liberada gradualmente resultando em uma eficácia prolongada, principalmente devido ao baixo metabolismo desses tecidos (PASSANTINO et al., 2011).

Entretanto, resíduos desse medicamento não devem ser detectados em nenhuma das matrizes derivadas de leite, pois não está licenciada para uso no tratamento de espécies lactantes. A eprinomectina é o único produto LM licenciado para tratamento de espécies lactantes na União Europeia, pois apenas uma pequena fração da dose (0,1%) é excretada no leite após a aplicação em vacas leiteiras e um intervalo de segurança zero foi estabelecido para o leite. Como nenhum outro LM é aprovado para o tratamento de animais leiteiros, surge a preocupação de que os produtos não aprovados possam ser usados em animais leiteiros, especialmente, quando há alegações de que o uso do medicamento já aprovado, seja mais caro (DANAHER et al., 2012).

Estima-se que até 5% da dosagem dos medicamentos de LMs podem ser excretadas no leite após tratamento com medicamentos não aprovados. Metodologias sensíveis emergentes podem detectar resíduos de LM no leite até 37 dias após o tratamento, aumentando o potencial para detectar o abuso desses medicamentos em espécies lactantes. Comprovadamente, a ivermectina não é totalmente metabolizada em mamíferos. Estima-se que aproximadamente 90% da dose é excretada nas fezes e resíduos de tecidos. Cerca de 50% dos resíduos totais do

medicamento nos tecidos bovinos correspondem ao fármaco original até 14 dias após o tratamento (DANAHER et al., 2012).

### **3.1.2. Resíduos de fármacos no leite e tecidos de animais**

Os medicamentos veterinários são extensivamente utilizados para tratamento de doenças de animais. Estudos realizados anteriormente apontam a viabilidade do uso de antibióticos e antiparasitários para garantia da saúde animal e demonstraram que, em baixos níveis de aplicação do fármaco, há o aumento da eficiência e crescimento da produção. Entretanto, uma má administração pode acarretar em diversos problemas como resistência de bactérias e transporte de resíduos de medicamentos para os produtos de origem animal (COSTA et al., 2022).

Neste cenário, tornou-se crucial determinar parâmetros de qualidade do leite; com isso a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil dispôs de um documento que aborda sobre os limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, que tem como objetivo esclarecer possíveis dúvidas e orientar aos fornecedores sobre as normativas relacionadas a essa problemática (CASTILHO et al., 2021) (COSTA et al., 2022).

O uso de medicamentos para tratamento de animais pode deixar resíduos nos alimentos, considerando-se um perigo químico, pois podem acarretar em consequências para a saúde humana como reações alérgicas e tóxicas, disrupção da microbiota intestinal normal, discrasias sanguíneas, câncer e desenvolvimento de resistência microbiana (CASTILHO et al., 2021).

Zhang et al., (2014) investigou os níveis de resíduos de medicamentos veterinários em leite pasteurizado e UHT comercializados na China, onde revelou uma alta ocorrência de determinados medicamentos comumente utilizados para tratamento de gado leiteiro, embora se apresentem dentro dos limites prescritos, o resultado aponta a necessidade de aumento na rigorosidade de medidas de controle para manter os resíduos dentro dos limites previstos na legislação.

Essa situação se estende do ponto de vista global. Nos Estados Unidos, foram encontrados vestígios de flunixinina em leite coletado de caminhões-tanque (KISSELL et al., 2013). No Irã, uma variedade de antibióticos foi detectada em amostras de leites coletadas de centros de coleta de leite cru, fabricas de produção de leite pasteurizado e em leite distribuído em escolas (MOGHADAM et al., 2016). Além disso, na Itália, foram encontrados resíduos de antimicrobianos em amostras de leites disponíveis no mercado (IZZO et al., 2022). No Nepal,

amostras de leite fresco obtido de fornecedores, pequenas fábricas de laticínios e cooperativas apontaram a presença de penicilinas e sulfonamidas (KHANAL et al., 2018).

Novaes et al., (2017) analisou amostras de leite comercializado no varejo em todo o país e observou baixos níveis de resíduos de vários tipos de antibióticos, como norfloxacino, que não possuía Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido, o que é preocupante pois não deveria ocorrer.

Diante disso, é necessário um controle de qualidade mais rigoroso do leite e seus derivados, incluindo medidas adequadas de monitoramento para garantir a segurança alimentar da população. Adicionalmente, evidencia-se a necessidade de intensificar a adoção de procedimentos de boas práticas relacionadas ao manejo da produção e higiene da ordenha, respeitando a carência de antimicrobianos utilizados no gado leiteiro, em conformidade com a legislação vigente (MARTIN, 2015).

### **3.1.3. Ações de Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários – Legislação Vigente**

Neste sentido, com o objetivo de promover a segurança Atualmente no Brasil, há mais de um órgão regulador para a produção e comercialização de alimentos. Com isso, muitas dúvidas podem surgir sobre qual legislação recorrer na hora de colocar um produto no mercado ou até mesmo entrar em contato caso alguma irregularidade seja observada. MAPA, é a sigla para Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, portanto, sua função está relacionada à inspeção de alimentos de origem animal, como carnes e pescados, bebidas em geral e vegetais in natura. Exclusivamente para inspeção dos alimentos de origem animal existe o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).

A química dos alimentos de origem animal obtidos em estabelecimentos sob controle do Serviço de Inspeção Federal (SIF), foi criado pelo MAPA, um programa de gerenciamento de risco coordenado pela Coordenação Geral de Programas Especiais (CGPE), do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA/MAPA). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), prevê o monitoramento, investigação e exploração dos produtos de origem animal destinados à alimentação humana (MAPA, 2019).

Além disso, utiliza-se de metodologias credenciadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), uma vez que os laboratórios responsáveis pelas análises precisam estar cadastrados no Inmetro, validando os resultados. O escopo de análise

atual, inclui ampla gama de medicamentos de uso veterinário aprovados e também não aprovados, agrotóxicos e contaminantes ambientais e industriais (MAPA, 2019).

A principal base legal para o PNCRC é a Instrução Normativa DAS N° 42, de 20 de dezembro de 1999, a qual estabelece alguns os limites máximos de resíduos (LMR) e também os métodos para análise desses resíduos, os quais podemos citar o método de imunoenaios (ELISA), detector por captura de elétrons, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia por camada delgada e gasosa, além de espectrofotometria de absorção atômica em casos em que as substâncias possuem LMR igual a zero ou aquelas sem LMRs estabelecidos (MAPA, 1999).

Todos os testes são realizados a fim de verificar o atendimento dos limites máximos de resíduos químicos em produtos animais aplicáveis no Brasil, os quais são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um órgão vinculado ao Ministério da Saúde do Brasil, que tem como sua principal função assegurar e promover a saúde na população (ANVISA, 2019).

Através do regulamento descrito na instrução Normativa N° 51, de 19 de dezembro de 2019, que além de estabelecer a lista de limites máximos de resíduos (LMR), também estabelece dados sobre a ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (ANVISA, 2019).

Todas as análises são realizadas em laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Federais de Defesa Agropecuários, compostas pelos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuários-LEDAs (laboratórios oficiais do MAPA) e laboratórios públicos/privados credenciados pelo MAPA. Todos estes laboratórios devem proceder segundo a Norma ABNT NBR ISSO/IEC 17025:2005 (MAPA, 2019).

A lista de IDA, DRfA e LMR para IFA de medicamentos veterinários de interesse do presente estudo, em alimentos de origem animal (Bovino) pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de referência regulamentados de IDA, DRfA e LMR para IFA com uso autorizado.

	<b>IDA (mcg/Kg p.c.)</b>	<b>DRfA (mcg/ Kg p.c.)</b>	<b>Resíduo marcador</b>	<b>LMR no Leite (µg/L)</b>
<b>Abamectina</b>	0-2 (soma abamectina e isômero (Z)-8,9)	**	Avermectina B1a	*
<b>Ivermectina</b>	0-10	200	Ivermectina B1a	10
<b>Eprinomectina</b>	0-10	**	Eprinomectina B1a	20

<b>Doramectina</b>	0-1	**	Doramectina	15
--------------------	-----	----	-------------	----

\* Não usar em animais produtores de leite para consumo humano  
\*\* Valor não informado

Fonte: Do Autor. Adaptado de ANVISA (2019).

Contudo, as propriedades violadas têm seus próximos lotes de animais e produtos submetidos a um regime especial de testes. Neste período os produtos obtidos dos lotes amostrados são retidos pelo serviço oficial até que o resultado de análise indique a sua conformidade. O processo é prolongado até que cinco lotes consecutivos apresentem resultado conforme legislação vigente (MAPA, 2019).

### **3.2. Biossensores colorimétricos a base de Polidiacetileno (PDA)**

A base do funcionamento de sensores é a conversão de informações de objetos-alvo em sinais reconhecíveis como cor, fluorescência ou sinais elétricos, usando os elementos químicos e biológicos presentes nos sensores e permitindo a determinação humana por meio da geração de um determinado sinal (KIM et al., 2022). Sensores desenvolvidos à base de elementos orgânicos, que utilizam reações biológicas para detecção de uma determinada molécula alvo, são frequentemente referidos na literatura como biossensores. Uma das moléculas capazes de atuarem como biossensores são os Polidiacetilenos (PDAs).

Os polímeros são conhecidos principalmente por suas características estruturais, por serem leves, flexíveis e isolantes. Isso acontece pois a maioria dos polímeros não possuem quantidades de elétrons livres suficientes para compartilhar no processo de condução. Entretanto, nos últimos anos uma nova classe de materiais poliméricos vem ganhando destaque em determinadas aplicações, por agregarem não somente as características tradicionais de um polímero, mas também por apresentarem capacidade condutiva. A esses materiais, chamamos de polímeros condutores (LIMA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2012).

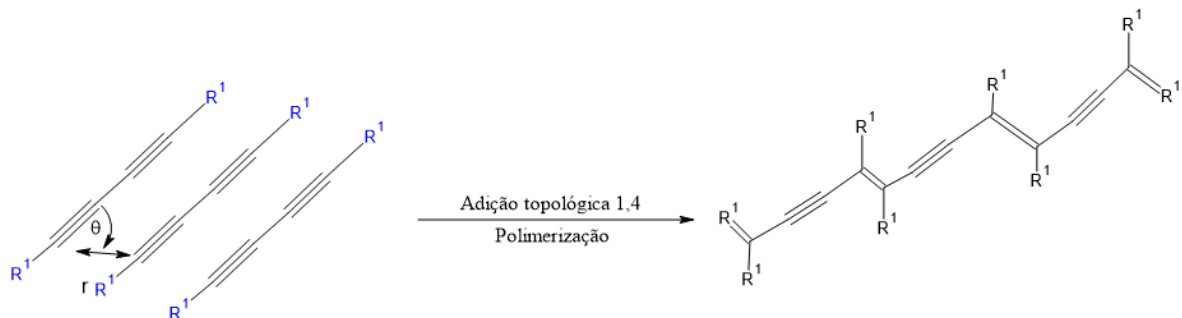
Polímeros condutores, são polímeros conjugados, formados por materiais orgânicos contendo ligações simples e duplas alternadas (ligações conjugadas) em sua cadeia. Com a formação de defeitos, por meio da adição de um dopante, portador de carga, podem conseguir se mover por toda a cadeia originando uma estrutura capaz de conduzir eletricidade e com propriedades elétrica, óptica e magnéticas semelhantes a dos metais, mas diferente dos polímeros convencionais (LIMA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2012)

Polímeros conjugados como os PDAs, tem a vantagem de provocar mudanças na condutividade, potencial redox e aspectos de absorção ou emissão de acordo com as mudanças ambientais. Quando comparamos sensores de alta massa molar aos de baixa massa molar a

vantagem notável dos sensores de polímeros conjugados é que eles são capazes de fazer a amplificação de seus sinais ópticos. Nos sistemas de polímeros conjugados, a amplificação do sinal ocorre mesmo para baixa concentração de analitos, uma vez que os sinais são entregues à sua cadeia principal (SEO et al., 2013).

Os poliacetilenos (PDAs) são obtidos por fotopolimerização de compostos diacetilênicos que possuem características estruturais e ópticas únicas. Quando os monômeros de diacetilenos (DA) são adequadamente organizados e suficientemente próximos uns dos outros, ocorre a polimerização de 1,4-adição e o PDA é produzido por exposição à radiação UV a 254 nm. Conseqüentemente, a alternância de ligações duplas e triplas pode ser observada na cadeia principal, como mostrado na Figura 5. Essas estruturas exibem resposta colorimétrica a vários estímulos químicos (solvente, pH, reconhecimento molecular específico, etc.) e físicos (temperatura, deformação mecânica, campo magnético, etc.) (BAEK et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; PATTANATORNCHAI et al., 2013; SEO et al., 2013).

Figura 5 - Polimerização de monômeros de diacetileno



Fonte: Do Autor (2024).

Os PDAs podem existir em diversas formas de automontagem em diferentes estruturas. Isso inclui estruturas como lipossomas ou vesículas, filmes e nanocompósitos. As estruturas podem ser variadas de acordo com o método de preparação ou natureza química das moléculas usadas na síntese (REZENDE et al., 2017).

As porções DA que geralmente são posicionadas no meio de cadeias de hidrocarbonetos alifáticos, permitem a polimerização eficiente induzida por foto (ou termicamente) de agregados de DA para gerar polímeros com estruturas alternadas en-ino. O motivo pelo qual as estruturas automontadas de PDAs muitas vezes absorvem luz visível e são intensamente azuis quando dispersas em solução ou em estado sólido é devido aos elétrons  $\pi$  extensivamente deslocados e à restrição conformacional imposta a cadeia principal da estrutura (BAEK et al.,

2016). Por esta razão ganhou muita atenção como transdutor óptico e tem se tornado uma tecnologia promissora para detecção de diversos analitos (PATTANATORNCHAI et al., 2013)

Um exemplo clássico e já bem discutido na atualidade são as etiquetas com PDA para embalagens de alimentos, as quais podem detectar a variação de temperatura durante o processo de transporte ou prolongar o armazenamento, um ponto importante para o controle de qualidade. A transição de cores desses materiais de PDA após a exposição aos estímulos pode ser observada a olho nu, proporcionando assim, simplicidade e praticidade na sua utilização (AKSORN; TEEPOO, 2020; PATTANATORNCHAI et al., 2013).

Preparados em solução aquosa, a coloração dos PDAs em solução aquosa muda para azul, com um comprimento de onda de absorção máximo em aproximadamente 640 nm. A partir de estímulos externos, a solução de PDA de cor azul trona-se vermelha com comprimento de onda de absorção de cerca de 550 nm. E a proporção desses dois processos de transição de cor, dependerá das estruturas das cadeias laterais do PDA, bem como dos tipos de condições de perturbação externa (PUMTANG et al., 2011; SEO et al., 2013).

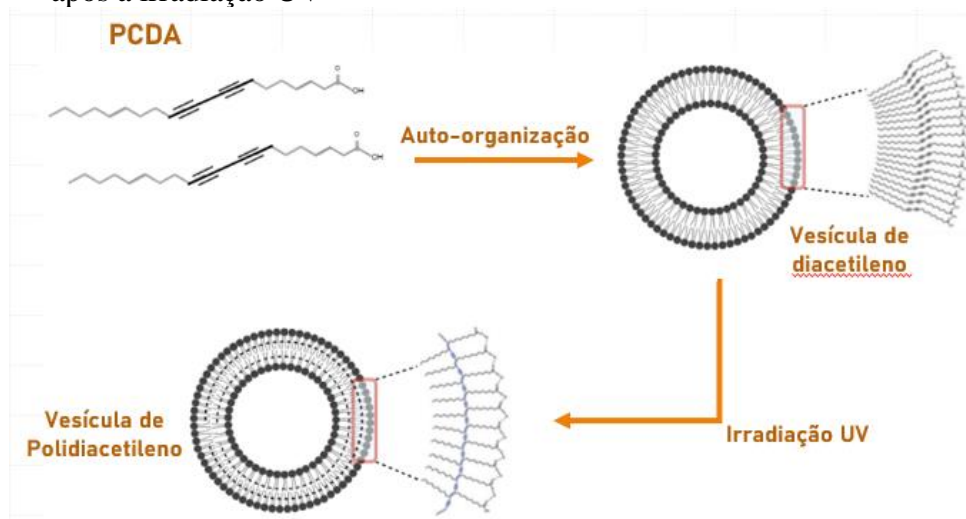
A introdução de grupos funcionais em estruturas supramoleculares automontadas frequentemente confere a essas estruturas recursos adicionais úteis (BAEK et al., 2016). Os grupos R na Figura 5 conferem as características anfífilas destas moléculas e os PDAs são formados em estruturas auto-organizadas como filmes monomoleculares ou multicamadas, micelas, partículas nanoestruturadas ou vesículas. Em qualquer uma destas estruturas o sistema eletrônico  $\pi$ -conjugado, como mencionado anteriormente, confere a estes materiais características especiais como a transição cromática brusca sobre determinados estímulos físico-químicos. A transição cromática também é conhecida na literatura como transição colorimétrica ou transição azul-vermelho e apenas a fase vermelha exibe emissão fluorescente, ao contrário do estado inicial correspondente à fase azul (CHAROENTHAI et al., 2011; FERREIRA et al., 2018; NARKWIBOONWONG et al., 2011; PIRES et al., 2011; PUMTANG et al., 2011)

A diferente organização das moléculas de PDA também se reflete em seu mecanismo de transição, podendo ser utilizadas diferentes aplicações em cada caso. Como o diacetileno é fácil de estruturar e modificar, o PDA pode formar um arranjo supramolecular unidimensional, bidimensional ou até tridimensional. E ainda, por meio de uma simples reação química, também é possível modificar a cadeia de hidrocarbonetos e inserir um grupo funcional específico de DA, alterando assim a interação intramolecular, resultando na alteração da barreira de energia

rotacional do polímero, que é uma função da diferença de energia do polímero (conformação de fase, azul e vermelho) (FERREIRA et al., 2018).

As diferentes arquiteturas formadas pelos PDAs quando estes são preparados ainda é de difícil controle e elas são formadas na maioria das vezes de maneira aleatória. Um fator limitante para a utilização dos PDAs como sensores colorimétricos consiste na limitada faixa de intensidade da perturbação que causa a transição cromática. Desta forma é um desafio científico estender essa faixa ou modulá-la de forma conveniente para a utilização adequada destes materiais como sensores a fim de atender os mais diversos setores tecnológicos. Por exemplo, vesículas preparadas por polimerização de monômeros de ácido 10,12-pentadienólico (PCDA) sofrem transição de cor gradual com o aumento da temperatura. No entanto, o espectro de absorção e a cor do material não mudarão repentinamente em uma temperatura tão alta quanto 55°C, e o material é completamente convertido de azul para vermelho a uma temperatura de cerca de 60-70°C apenas. O PCDA é o polidiacetileno mais utilizado devido a sua elevada reatividade do grupo carboxílico, que permite sua modificação gerando sistemas mais robustos e sensíveis (FERREIRA et al., 2018). A exposição à radiação UV a 254 nm induz a polimerização de 1,4-adição nos monômeros de diacetilenos (DA), resultando na formação de vesículas com uma alternância de ligações duplas e triplas na cadeia, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema de auto-organização de monômeros de PCDA e a formação de vesículas após a irradiação UV



Fonte: Do Autor (2024).

O processo de produção de PDAs convencionais (polimerização em massa) envolve a injeção de uma pequena quantidade de solvente orgânico solúvel em água contendo monômeros DA anfífilos, introduzindo assim a automontagem espontânea deles. Muito embora a mistura em massa usada permita a produção de um grande volume de solução de partículas DA, a produção de partículas polidispersas é inevitável e não permite o controle sobre o tamanho médio das partículas. Isso ocorre principalmente devido à dificuldade de se manter ambientes de mistura consistentes. Essa limitação leva à falta de reprodutibilidade ou não homogeneidade da fluorescência emitida pelas nanoestruturas de PDA, em especial, quando pequenos volumes delas são usados como materiais sensores e por esta razão, após o processo de formação das PDAs, são necessárias etapas adicionais de filtração e sonicação, para melhorar as características do sensor (BAEK et al., 2016).

### **3.2.1. Controle da transição colorimétrica PDA**

O controle da transição colorimétrica é de fundamental importância para o sucesso do processo como um todo. A capacidade de controlar esse comportamento é bastante relevante para sua aplicação final. Por esta razão, explorar e controlar todo o potencial dos materiais baseados em PDA é essencial, uma vez que deve-se maior atenção ao comportamento de transição de cores. O parâmetro chave para o controle da transição de cores é a força das interações entre e intra cadeias do conjunto PDAs (KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016; TRAIIPHOL et al., 2015).

A busca por um método sistemático para controle deste comportamento de transição de cores tem sido mais frequentes entre a comunidade científica de modo geral. Podemos mencionar algumas técnicas já investigadas ao longo dos últimos anos para esse controle como por exemplo, a modificação do grupo principal ou da cadeia lateral, que por vezes fornece uma série de PDAs com várias temperaturas de transição de cor. Outra abordagem com esse propósito é a introdução de um método de mistura simples entre PDAs e diferentes polímeros como poliestireno, poli (4-vinilpiridina) e poli (metacrilato de metila). Além de facilitar a preparação de filme fino, essas matrizes poliméricas fornecem alta estabilidade de cor e permitem a fabricação de PDAs de estado sólido em diferentes formas (KAMPHAN et al., 2017; KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016).

Para entender como esses métodos funcionam na prática é preciso que entendamos como ocorrem as relações dentro da cadeia de PDA. Por exemplo, quando aumentamos o comprimento da cadeia lateral de alquil, por consequência, as interações de dispersão dentro

dos conjuntos PDA são favorecidas e desta maneira, aumentadas, resultando no aumento da temperatura de transição de cor. Em contrapartida, em sistemas onde os grupos principais são constituídos por grupos aromáticos, os PDAs exibem termocromismo reversível devido à presença de ligações de hidrogênio fortes e interações  $\pi - \pi$  (KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016).

Entretanto, é bastante difícil ajustar a temperatura de transição de cores e as rotas sintéticas normalmente envolvem métodos complexos de várias etapas e processos de purificação demorados. Desta forma, a incorporação de materiais estranhos em conjuntos de PDAs é uma abordagem alternativa e pode favorecer um controle sistemático sobre suas propriedades (KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016; TOOMMEE; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2015).

Os PDAs embutidos em matrizes poliméricas não podem fornecer termocromismo reversível. Contudo, alguns estudos apontam que esta reversibilidade pode ser alcançada misturando PDAs com polímeros específicos como o poli(vinilpirrolidona) (PVP) ou poli(álcool vinílico) (PVA). E ainda, que usando-se PVP de baixa massa molar (MW) o processo de termocromismo reversível pode ser simplificado. Isso se deve principalmente às interações aprimoradas entre grupos de cabeças do PDA e segmentos de PVA ou PVP, limitando seu movimento segmentar em temperatura elevada (KAMPHAN et al., 2017; TRAIIPHOL et al., 2015).

Outro ponto a ser discutido para obtenção desta reversibilidade é o uso de aditivos como por exemplo a intercalação do íon  $Zn^{2+}$  ou  $Na^+$ , com grupos de cabeça carboxilato de PDAs, que tem obtido resultados semelhantes aos obtidos com o uso de poli(vinilpirrolidona) (PVP) e poli(álcool vinílico). Isso acontece, principalmente, devido promoção de interações iônicas com o grupo de cabeça de carboxilato presentes nos PDAs, proporcionando assim um termocromismo reversível (TRAIIPHOL et al., 2015).

Em estudos recentes os autores mostram que o termocromismo reversível dos PDAs pode ser alcançado simplesmente adicionando nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ao sistema. A montagem espontânea dos monômeros, impulsionada pela interação iônica e ligação de hidrogênio, ocorre na superfície das nanopartículas de ZnO. Uma irradiação do conjunto por luz UV resulta na topopolimerização de PDA, que reveste as nanopartículas de ZnO (CHANAKUL; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2013; KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016; TOOMMEE; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2015; TRAIIPHOL et al., 2015)

Portanto, várias técnicas vem sendo discutidas e estudadas para o controle do termocromismo dos PDAs e, em comum, todas trazem a dificuldade de se controlar tal mudança, uma vez que fatores ambientais, físicos e químicos podem afetar diretamente ele..

### **3.3.β-Ciclodextrina**

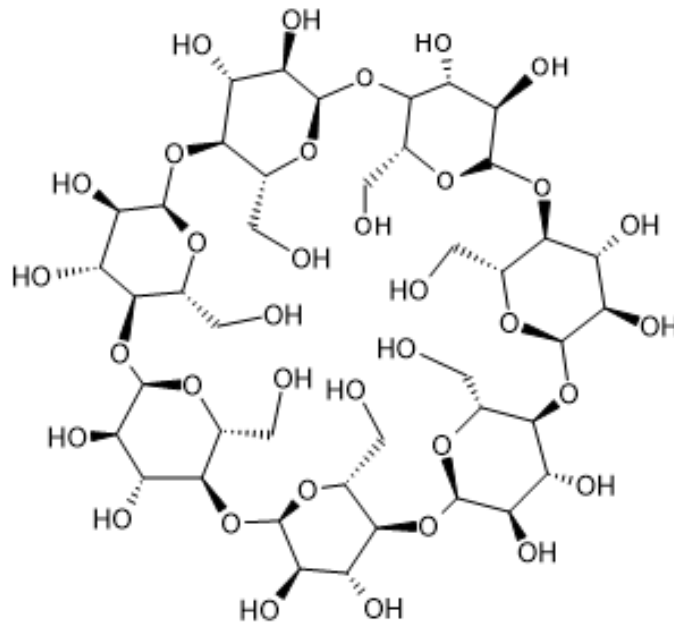
Para garantir uma resposta correta, todo sensor deve conter uma molécula que se liga facilmente ao analito alvo, quase que como um antígeno-anticorpo, quanto mais específica é a ligação, melhor o desempenho final do sensor. Neste caso, uma molécula com alto potencial de ligação a resíduos de ivermectina é a β-Ciclodextrina.

As β-Ciclodextrinas (βcds) são oligossacarídeos de baixa massa molar, formadas por unidades de D-glucopiranose ligadas por uma ligação α-1,4-glicosídicas que se organizam em forma de tronco cônico, proporcionando uma cavidade bem definida para a formação de complexos hospedeiro-hóspede com uma série de moléculas (BEZERRA et al., 2020; MOREIRA et al., 2018; SHERJE et al., 2017). Logo, este carboidrato é capaz de formar complexos de inclusão com drogas devido à sua natureza lipofílica interna e essa versatilidade permite a complexação com vários medicamentos, corantes, inseticidas, óleos essenciais, cosméticos, dentre outros compostos (BEZERRA et al., 2020; SHERJE et al., 2017)

Desde a primeira publicação sobre as βcds, em 1891, e a primeira patente em 1953, muitos avanços tecnológicos ocorreram e aplicação das βcd se expandiu. Sua estrutura consiste em grupos hidroxilas primárias (C6) localizadas na extremidade dos anéis e hidroxilas secundárias (C2 e C3) localizadas na borda externa dos anéis. Grupos de oxigênio do tipo éter e hidrogênio polar (C3 e C5) estão presentes dentro do tronco das βcd. Ao passo que hidroxilas externas são responsáveis pela solubilidade relativa dos βcd em água e em ambientes micro heterogêneos, as pontes glicosídicas de oxigênio e conseqüentemente seus pares de elétrons não ligantes voltados para o interior da cavidade conferem a essa região, além de seu caráter básico, também a hidrofobicidade, tornando-o capaz de complexar moléculas apolares (BEZERRA et al., 2020; SHERJE et al., 2017).

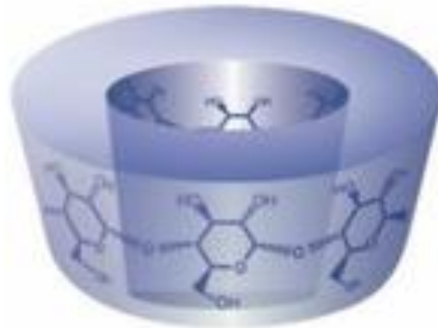
A rotação causada pelos cinco carbonos quirais da unidade D-glicose, associada à rigidez do macro ciclo devido às interações intramoleculares de hidrogênio entre os grupos 2 e 3-hidroxila são características fundamentais da química das βcd (BEZERRA et al., 2020; SHERJE et al., 2017). Tais características podem ser observadas a partir da observação da estrutura química (Figura 6) e tridimensional (Figura 7) da molécula.

Figura 6 - Estrutura química da  $\beta$ -Ciclodextrina



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 7 - Estrutura tridimensional da molécula de  $\beta$ -Ciclodextrina.



Fonte: Do Autor. Adaptada de Bezerra *et al.*, (2020).

Vários fatores contribuem para a termodinâmica de complexação da molécula hóspede em  $\beta$ cd e desde que os requisitos de tamanho sejam satisfeitos em sua totalidade, considerando meio aquoso, podemos citar alguns desses requisitos, tais como a entrada da porção hidrofóbica da molécula hóspede na cavidade; a desidratação da molécula hóspede e a exclusão de moléculas de água do interior da cavidade; as interações de hidrogênio entre os grupos específicos da molécula hóspede e o OH do receptor e as mudanças na conformação e/ou redução do estresse (BEZERRA *et al.*, 2020).

A Tabela 4 mostra algumas propriedades físico-químicas das βcd.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas das β-Ciclodextrinas

PROPRIEDADES	β-CICLODEXTRINA
Fórmula empírica	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>
Massa molecular (g/mol)	1135
Unidades de glucopiranoose	7
Diâmetro da cavidade (nm)	0,60-0,78
Volume da cavidade interna (nm <sup>3</sup> )	2620
Número de moléculas de água na cavidade	11
Solubilidade aquosa (g/L)	18,4
Temperatura de degradação (°C)	298

Fonte: Adaptada, Bezerra et al., (2020).

### 3.4. Conclusões

Nesta seção foram abordados temas importantes para a compreensão da metodologia proposta nesta pesquisa. Iniciando com uma breve descrição da classe de moléculas de interesse para detecção do sensor, as Lactonas Macroclílicas (LMs). Posteriormente, uma breve revisão do que são e a importância dos biossensores colorimétricos. Finalizando com uma breve discussão sobre como promover o controle da transição colorimétrica nos sensores e algumas das principais características da molécula de β-ciclodextrina, usada neste estudo como agente de ligação à molécula alvo. Sendo assim, através desta revisão observa-se que ainda existem inúmeros gaps de conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na mudança de coloração da molécula estudada e também de como a molécula alvo afetará a estrutura ordenada do polidiacetileno de maneira que a causar uma resposta colorimétrica visível. Portanto, esta tese buscará entender alguns desses gaps e acrescentar conhecimento científico a cerca do uso potencial de moléculas de PDA em aplicações sensoriais.

### Referências Bibliográficas

AKSORN, J.; TEEPOO, S. Development of the simultaneous colorimetric enzymatic detection of sucrose, fructose and glucose using a microfluidic paper-based analytical device. **Talanta**, [s. l.], v. 207, n. June 2019, p. 120302, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120302>>

ANVISA, A. N. de V. S. Resolução RDC N°53, de 2 de outubro de 2012 **Ministério da Saúde- Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2012. p. 10. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RDCN53.pdf/4f53a37a-03a9-4b8e-80eb-a31cc01964fa>>

ANVISA, A. N. de V. S. Instrução Normativa N° 51, de 19 de dezembro de 2019. **Ministério da Saúde**, [s. l.], p. 1-14, 2019. Disponível em:

<[http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484\\_SISTEM\\_PEMBETUNGAN\\_TERPUSAT\\_STRATEGI\\_MELESTARI](http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484_SISTEM_PEMBETUNGAN_TERPUSAT_STRATEGI_MELESTARI)>

AWASTHI, A. et al. An overview on chemical derivatization and stability aspects of selected avermectin derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 60, n. 8, p. 931–944, 2012.

BAEK, S. et al. Nanoscale diameter control of sensory polydiacetylene nanoparticles on microfluidic chip for enhanced fluorescence signal. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 230, p. 623–629, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.065>>  
BEZERRA, F. M. et al. The Role of  $\beta$ -Cyclodextrin in the Textile Industry—Review. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 3624, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3624>>

CASTILHO, P. et al. **Limites máximos de resíduos ( LMR ) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal**. [s.l: s.n.].

CEZAR, A. S. et al. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos<sup>1</sup>. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 523–528, 2010.

CHALUPA-KREBZDAK, S.; LONG, C. J.; BOHRER, B. M. Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 87, p. 84–92, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>>

CHANAKUL, A.; TRAIPIHOL, N.; TRAIPIHOL, R. Controlling the reversible thermochromism of polydiacetylene/zinc oxide nanocomposites by varying alkyl chain length. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 389, n. 1, p. 106–114, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.066>>

CHAROENTHAI, N. et al. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 360, n. 2, p. 565–573, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.109>>

CHEIBUB, A. M. de S. S.; LYRA, E. S. B. De; NETTO, A. D. P. Development and validation of a method for simultaneous determination of trace levels of five macrocyclic lactones in cheese by HPLC-fluorescence after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. March 2018, p. 148–156, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.027>>

CHEN, X.; YOON, J. A thermally reversible temperature sensor based on polydiacetylene: Synthesis and thermochromic properties. **Dyes and Pigments**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 194–198, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2009.12.015>>

COSTA, Anna cecilia et al. Boletim Técnico n123-UFLA-Saúde Única. **Editora UFLA**, [s. l.], p. 1–30, 2022.

DANAHER, M. et al. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 844, n. 2, p. 175–203, 2006.

DANAHER, M. et al. Recent Developments in the Analysis of Avermectin and Milbemycin Residues in Food Safety and the Environment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 936–951, 2012.

DE SOUZA, L. C. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as a sensor for micellar casein: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 841–847, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.071>>

EL-SABER BATIHA, G. et al. Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 196, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/13/8/196>>

FAO; OMS; CODEX. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL 2-2021. **Codex Alimentarius International food standards**, [s. l.], n. July, p. 22, 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf>>

FERREIRA, G. M. D. et al. A simple and inexpensive thermal optic nanosensor formed by triblock copolymer and polydiacetylene mixture. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 241, p. 358–363, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.115>>

INOUE, K. et al. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 32, n. 21, p. 3596–3602, 2009.

IZZO, L. et al. Multiclass and multi-residue screening of mycotoxins, pharmacologically active substances, and pesticides in infant milk formulas through ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry analysis. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 2948–2962, 2022.

KAMPHAN, A. et al. Structural-thermochromic relationship of polydiacetylene (PDA)/polyvinylpyrrolidone (PVP) nanocomposites: Effects of PDA side chain length and PVP molecular weight. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 46, p. 130–138, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.10.023>>

KAMPHAN, A.; CHAROENTHAI, N.; TRAIPIHOL, R. Fine tuning the colorimetric response to thermal and chemical stimuli of polydiacetylene vesicles by using various alcohols as additives. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 489, p. 103–112, 2016.

KHANAL, B. K. S. et al. Screening of antibiotic residues in fresh milk of kathmandu valley, nepal. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 57–86, 2018.

KIM, C. et al. Multi-target polydiacetylene liposome-based biosensor for improved exosome

detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 355, n. November 2021, p. 131286, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131286>>

KISSELL, D. et al. Occurrence of flunixin residues in bovine milk samples from the USA. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 29–31, 2013.

LIMA, P. H. C. et al. Polímeros condutores com propriedades eletrocromáticas: uma revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018. Disponível em: <[www.ufcg.edu.br](http://www.ufcg.edu.br)>

LYNAGH, T.; LYNCH, J. W. Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 432–441, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.05.002>>

MAPA. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**, [s. l.], p. 1–51, 1999.

MAPA. Manual Instrutivo do Plano Nacional De Controle De Resíduos e Contaminantes-PNCRC. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA**, Brasília, DF, p. 17, 2019.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 80, 2015.

MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores . **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 62–77, 2012.

MOGHADAM, M. M. et al. Evaluation of antibiotic residues in pasteurized and raw milk distributed in the South of Khorasan-e Razavi Province, Iran. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. FC31–FC35, 2016.

MOREIRA, A. M. et al. Hydrophobic Nanoprecipitates of  $\beta$ -Cyclodextrin/Avermectins Inclusion Compounds Reveal Insecticide Activity against *Aedes aegypti* Larvae and Low Toxicity against Fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 28, p. 7275–7285, 2018.

MÜLLER, P. M. et al. Avermectins residues in milk produced in the state of pernambuco. **Food Science and Technology (Brazil)**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 979–984, 2020.

NARKWIBOONWONG, P. et al. Aqueous sols of oligo(ethylene glycol) surface decorated polydiacetylene vesicles for colorimetric detection of Pb<sup>2+</sup>. **Talanta**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 872–878, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.054>>

PASSANTINO, A. et al. Ivermectin residues in milk of lactating donkey (*Equus asinus*): Current regulation and challenges for the future. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 427–434, 2011.

PATTANATORNCHAI, T. et al. Control over the color transition behavior of polydiacetylene vesicles using different alcohols. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 391, n.

- 1, p. 45–53, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.10.004>>
- PIRES, A. C. D. S. et al. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 153, n. 1, p. 17–23, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.09.069>>
- PUMTANG, S. et al. Solvent colorimetric paper-based polydiacetylene sensors from diacetylene lipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 364, n. 2, p. 366–372, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.08.074>>
- REZENDE, J. de P. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for the detection of native and free bovine serum albumin. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 70, p. 535–543, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.009>>
- SANTOS, P. S. et al. Ivermectin and albendazonle withdrawal period in goat milk. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1–12, 2019.
- SEO, S. et al. Fluorescence resonance energy transfer between polydiacetylene vesicles and embedded benzoxazole molecules for pH sensing. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 451–456, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.11.016>>
- SHERJE, A. P. et al. Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 173, n. 1, p. 37–49, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.086>>
- SINDAN. **Indústria Veterinária, Fechamento Mercado2021**, 2021. Disponível em: <[https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2022/06/Fechamento-Mercado-2021\\_div.pdf](https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2022/06/Fechamento-Mercado-2021_div.pdf)>
- SOARES, V. M. et al. Residues of Veterinary Drugs in Animal Products Commercialized in the Border Region of Brazil, Argentina, and Uruguay. **Journal of food protection**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 980–986, 2022.
- TOOMMEE, S.; TRAI PHOL, R.; TRAI PHOL, N. High color stability and reversible thermochromism of polydiacetylene/zinc oxide nanocomposite in various organic solvents and polymer matrices. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 468, p. 252–261, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.055>>
- TRAI PHOL, N. et al. Fine tuning the color-transition temperature of thermoreversible polydiacetylene/zinc oxide nanocomposites: The effect of photopolymerization time. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 439, p. 105–111, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.10.033>>
- TRAPERO, D. et al. Determination of macrocyclic lactones in bovine liver using QuEChERS and HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 1015–1016, p. 166–172, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.055>>
- WANG, X. et al. Multicolor luminescent carbon nanoparticles: Synthesis, supramolecular assembly with porphyrin, intrinsic peroxidase-like catalytic activity and applications. **Nano Research**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 908–920, 2011.

WANG, Z.; BEIER, R. C.; SHEN, J. Immunoassays for the detection of macrocyclic lactones in food matrices – A review. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 92, p. 42–61, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616303910>>

ZHANG, J. et al. Synthesis, biological activities and structure-activity relationships for new avermectin analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 121, p. 422–432, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.056>>

ZHANG, Y. D. et al. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market. **Food Control**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 238–242, 2014.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS**

# ARTIGO 1 - TRANSIÇÃO CROMÁTICA EM SISTEMAS DE POLIDIACETILENO/COPOLÍMERO TRIBLOCO FUNCIONALIZADOS COM $\beta$ -CICLODEXTRINA

## RESUMO

Os polidiacetilenos (PDAs), uma classe de polímeros conjugados, têm ganhado destaque no cenário científico como promissores candidatos para aplicação em sensores colorimétricos. Isso se deve às suas propriedades estruturais e ópticas singulares, que facultam a modificação de coloração em resposta a estímulos externos. Apesar de algumas restrições, como a limitada estabilidade de agregação, esses polímeros têm sido extensivamente utilizados na detecção de diversas moléculas-alvo. As ciclodextrinas (CDs) são conhecidas por sua habilidade em formar complexos de inclusão com inúmeras substâncias. Nesse contexto, o foco deste estudo concentrou-se na investigação da alteração colorimétrica decorrente da adição de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) em três diferentes concentrações (1; 2 e 3 mM) a um sistema contendo ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) com concentração de 1 mM. Os tamanhos obtidos para os PDAs funcionalizados com  $\beta$ cd variaram de  $374 \pm 11$  nm a  $282 \pm 24$  nm, e o potencial Zeta variou de  $-5,6 \pm 0,3$  mV a  $-21,1 \pm 0,5$  mV. Além disso, a análise térmica revelou alterações nas temperaturas de fusão dos materiais, e em conjunto com os espectros RAMAN, confirmou a formação do complexo, sugerindo que o sistema PCDA/ $\beta$ cd com concentração de 2 mM ( $\beta$ cd), apresentou-se mais adequado para futuras aplicações em sensores.

*Palavras-chave:* ácido 10,12-pentacosadiinóico, polímeros conjugados, sensores colorimétricos, propriedades colorimétricas.

## 1. Introdução

Os polímeros são reconhecidos principalmente por suas propriedades estruturais, destacando-se por serem leves, flexíveis e isolantes. Nas últimas décadas, uma nova categoria de materiais poliméricos tem se destacado em aplicações específicas, pois incorporam não apenas as características tradicionais dos polímeros, mas também demonstram capacidade condutiva. Esses materiais são designados como polímeros condutores (LIMA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2012).

Dentro desse contexto, os polidiacetilenos (PDAs) surgem como uma alternativa atraente devido às suas transições cromáticas e fluorogênicas singulares em resposta a estímulos externos. A síntese dessas moléculas ocorre por meio da reação de adição 1,4 de monômeros

de diacetileno, resultando em um esqueleto de polímero alternado eno-ino. Esse processo é iniciado pela irradiação de luz UV a 254 nm, dispensando a necessidade de iniciadores químicos. A mudança conformacional na cadeia principal do PDA, de planar para não planar em resposta a estímulos externos, não apenas provoca um deslocamento para a região azul nos espectros, mas também induz transições de cor únicas, indo de "azul para vermelho" quando sujeitas a perturbações (SAGONG et al., 2021).

Os polidiacetilenos (PDAs) têm a capacidade de se autoorganizar em diversas formas, adotando estruturas variadas, tais como lipossomas ou vesículas, filmes e nanocompósitos. Essa diversidade estrutural pode ser influenciada pelo método de preparação adotado ou pela natureza química das moléculas utilizadas durante a síntese (REZENDE et al., 2017).

Em contraste, as  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ cds) são oligossacarídeos compostos por unidades de glicose que se organizam em uma configuração de tronco cônico, gerando uma cavidade distintamente definida para a formação de complexos hospedeiro-hóspede com diversas moléculas. Essa versatilidade possibilita a complexação com uma variedade de substâncias, incluindo drogas, corantes, inseticidas, óleos essenciais, cosméticos e outros compostos (BEZERRA et al., 2020).

Adicionalmente, devido à presença de numerosos grupos hidroxila tanto no interior quanto no exterior, as  $\beta$ cds apresentam uma susceptibilidade à incorporação de novos grupos funcionais, capazes de conferir novas propriedades e funcionalidades. Além disso, destacam-se por um conjunto de características excepcionais, como elevada biodegradabilidade, alta biocompatibilidade e a aprovação pela Food and Drug Administration (FDA). Essas características têm despertado significativa atenção desde o primeiro relato na literatura (BEZERRA et al., 2020).

Em síntese, o foco deste estudo foi a análise da alteração colorimétrica resultante da inclusão de  $\beta$ -ciclodextrina (1; 2 e 3 mM) em um sistema contendo PDA, avaliando entre as concentrações testadas, a que melhor se qualifica (que causa menor efeito na mudança de conformação e conseqüentemente coloração do PDA) para posterior aplicação em sensores à base de PDA/  $\beta$ -ciclodextrina. Portanto, essa investigação compreenderá a análise química, a estabilidade da solução e o impacto da temperatura no processo de mudança de coloração.

## 2. Material e Métodos

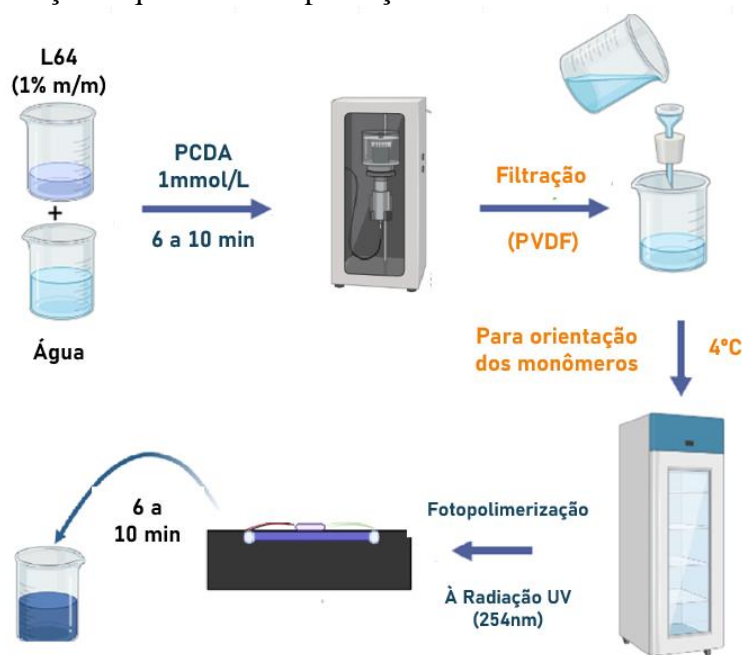
### 2.1. Material

O ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA, 97% em massa), precursor do PDA, o poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), copolímero Tribloco L64 [(EO)<sub>13</sub>(PO)<sub>30</sub>(EO)<sub>13</sub>], com massa molar média ( $M_m$ ) de  $2900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , a  $\beta$ -ciclodextrina foi adquirida da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Os filtros para seringa (PVDF 25mm 0,45um) BioNaky foram adquiridos da Forlab Express. A parte experimental da pesquisa foi realizada no Laboratório de Fermentação da Universidade Federal de São João Del Rei (Campus Alto Paraopeba).

### 2.2. Produção de nanossensores a base de PCDA

Nanossensores de PDA e L64 foram preparados seguindo metodologia proposta por DE SOUZA e colaboradores (2016) e REZENDE e colaboradores (2017). O L64 foi solubilizado em água na concentração de 1% (m/m). Posteriormente, o PDA ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi dissolvido nesta solução e sonicada por cerca de 6 a 10 minutos, e imediatamente filtrada em filtro PVDF. A suspensão então foi mantida durante 12 horas a  $4^\circ\text{C}$ , objetivando-se orientar os monômeros de PDA para que a polimerização pudesse ser promovida. A fotopolimerização foi realizada expondo a suspensão à radiação UV ( $254 \text{ nm}$ ) por 10 minutos. A Figura 8 ilustra a metodologia da produção dos nanossensores.

Figura 8 - Representação esquemática da produção dos nanossensores à base de PCDA.

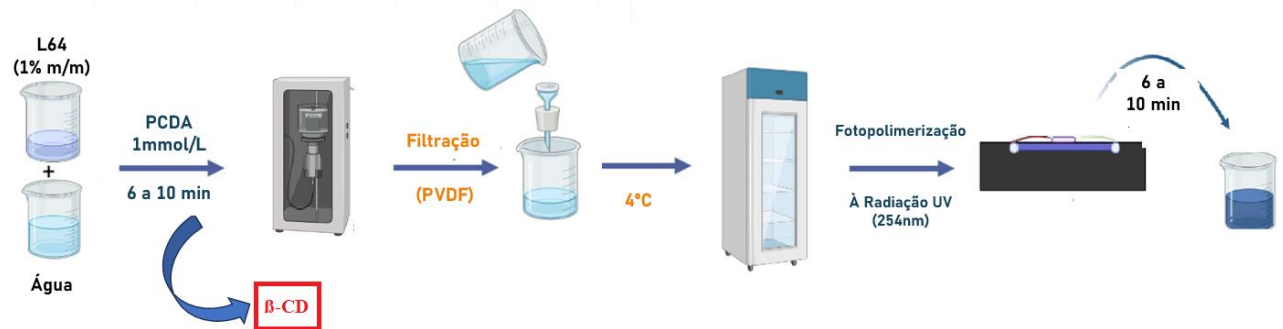


Fonte: Do Autor (2024).

### 2.3. Funcionalização dos nanosensores

Os sensores com  $\beta$ -ciclodextrina (concentração 1, 2 ou 3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foram produzidos para avaliar os possíveis efeitos na transição de cor. A Figura 9 mostra o esquema prático da funcionalização dos nanosensores utilizando a metodologia do item 2.2. Contudo, a  $\beta$ -ciclodextrina nas concentrações já mencionadas, foi adicionada ao sistema na primeira etapa, após solubilização do L64 em água e posteriormente seguiu-se as mesmas etapas descritas no item anterior.

Figura 9 - Representação esquemática da produção dos nanosensores à base de PCDA funcionalizados com a  $\beta$ -ciclodextrina.



Fonte: Do Autor (2024).

### 2.4. Raio hidrodinamico e potencial Zeta

A distribuição de tamanho e o potencial Zeta da dispersão foram medidos seguindo um protocolo adaptado de Rezende e colaboradores (2017). A distribuição de tamanho da partícula foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons usando um Zetasizer Nano ZS a  $25 \pm 0,1$  °C (Malvern Instruments Inc.). O instrumento estava equipado com um laser He/Ne4mW emitido a um comprimento de onda de 632,8 nm, uma cubete de medição e um detector de fotodíodos de avalanche (brookhaven BI-APD, EUA). A intensidade de dispersão foi medida sob um ângulo de detecção de 173° em relação à fonte. As amostras foram testadas a  $25,0 \pm 0,1$  °C numa célula retangular de poliestireno.

O potencial zeta das partículas foi determinado com base na sua mobilidade electroforética, utilizando a técnica de dispersão dinâmica da luz (Nano Zetasizer, Malvern Instruments, Reino Unido). A amostra sem diluição a  $25,0 \pm 0,1$  °C foi colocada numa cubete capilar dobrada descartável. O instrumento estava equipado com um laser He/Ne4mW,

utilizando a técnica de microelectroforese por laser Doppler. Todas as medições foram efetuadas em triplicatas.

Todas as medições (distribuição de tamanho e potencial Zeta) foram medidos seguindo protocolo adaptado de Rezende e colaboradores (2017).

## 2.5. Análise Raman

Para analisar as alterações na cadeia polimérica do PCDA, os espectros Raman foram medidos utilizando o espectrômetro Micro Raman (NRS-5100, JASCO, Japão) a uma excitação de 785 nm, seguindo o protocolo de Sagong e colaboradores (2021). As vesículas de PCDA em soluções aquosas foram colocadas num wafer de silício e secas à temperatura ambiente.

## 2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os nanosensores de PCDA foram submetidos a análises num calorímetro diferencial de varrimento Shimadzu DSC-60 plus, em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), com um caudal de 50 mL/min, e uma rampa de aquecimento de 25 a 300°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C /min e sensibilidade de 1,0°C. Para cada experiência, foram utilizados cerca de 3 mg de amostra em recipientes fechados de alumina.

## 2.7. Avaliação Colorimétrica

### 2.7.1. Resposta Colorimétrica (RC)

O método de análise da resposta colorimétrica seguiu protocolo adaptado de Ferreira et al., (2018). As leituras foram realizadas em uma Leitora de Microplacas de Detecção Múltipla Synergy HT com varredura entre os comprimentos de onda de 300 a 900 nm e os dados coletados pelo software Gen5™. Para avaliar a variação das cores das suspensão de vesículas, o parâmetro de Resposta Colorimétrica (RC) foi calculado conforme Equação 1.

$$RC (\%) = \left( \frac{\left( \frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}} \right)_b - \left( \frac{A_{540}}{A_{650} + A_{540}} \right)_a}{\left( \frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}} \right)_b} \right) \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

Onde A é a absorbância dos componentes azul ( $\lambda \sim 650$  nm) e vermelho ( $\lambda \sim 540$  nm), determinada por espectroscopia UV-Vis. Os termos “azul” e “vermelho” estão relacionados à aparência do material. E os índices “b” e “a” representam as absorbâncias antes e depois da exposição à IVR, respectivamente.

### 2.7.2. Histograma RGB (Red, Green, Blue)

Para testar a sensibilidade do sistema, fotos das amostras foram tiradas utilizando um smartphone Moto g42, com resolução de camera tripla de 50MP + 2MP + 8MP. Foi retirada uma fração de cada imagem original, para que fosse realizado um histograma RGB (Red, Green, Blue) utilizando o software OriginPro 8.5. Para completar a análise RGB, 5 pontos de cada amostra foram analisados, utilizando o software Adobe Photoshop CS6, e seguindo metodologia de (ZHENG et al., 2021) de valor de cor (CV) a partir da seguinte equação:

$$CV \text{ (dB)} = 10 \log \left[ \frac{R}{(R+G+B)} \right] \quad Eq \text{ (2)}$$

Em que, R, G e B representam a intensidade óptica do vermelho, verde e azul, respectivamente. A escala padrão RGB é determinada por números inteiros que vão de 0 a 255, para cada uma das três cores, sendo o (0,0,0) representado pelo preto e (255,255,255) correspondente à cor branca (ZHENG et al., 2021).

## 2.8. Análise Estatística

As determinações analíticas para cada amostra foram realizadas em duplicata, utilizando um delineamento inteiramente casualizado. A comparação das médias foi realizada através do teste de média de Tukey a um nível de significância de 5%, por análise de variância (ANOVA) utilizando o software OringPro 2018 versão 95E.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta

O tamanho hidrodinâmico das vesículas variou consideravelmente e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Segundo Ferreira et al., (2018), as diferentes arquiteturas formadas pelos PCDAs quando são preparados, ainda é de difícil controle e são formadas na maioria das vezes de maneira aleatória, o que pode explicar o valor alto no desvio padrão principalmente da amostra pura.

Tabela 5 - Tamanho hidrodinâmico, potencial Zeta e PDI obtidos a partir da Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).

Vesícula	Tamanho (nm)	Zeta (mV)	PDI
PCDA 1 mM	18,8 ± 9,0 <sup>a</sup>	-26,6 ± -0,3 <sup>a</sup>	0,431 ± 0,05 <sup>a</sup>
PCDA/βcd 1 mM	374,4 ± 11,23 <sup>b</sup>	-5,6 ± -0,9 <sup>b</sup>	0,241 ± 0,01 <sup>b</sup>
PCDA/βcd 2 mM	357,5 ± 12,1 <sup>b</sup>	-12,3 ± -0,6 <sup>b</sup>	0,389 ± 0,02 <sup>a</sup>

PCDA/ $\beta$ cd 3 mM	$282,8 \pm 24,1^c$	$-21,1 \pm -0,5^a$	$0,277 \pm 0,02^b$
-----------------------	--------------------	--------------------	--------------------

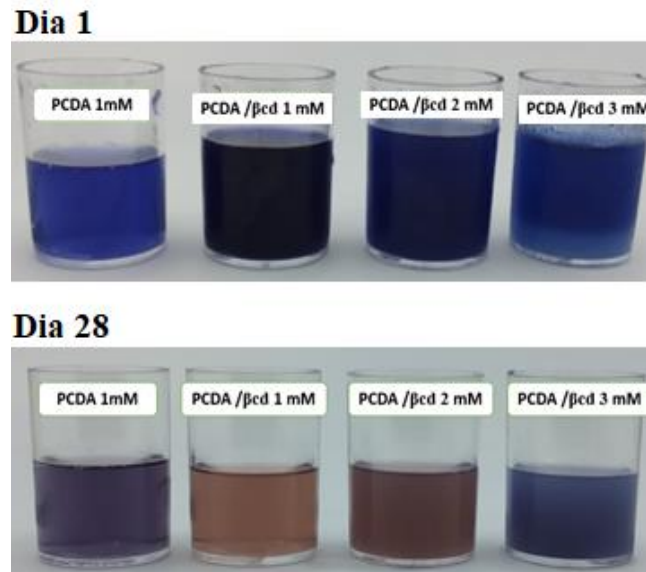
Teste Tukey ( $p < 0,05$ )

Além disso, Baek et al., (2016) ainda destacam que, embora a mistura em massa usada permita a produção de um grande volume de solução de partículas de monômeros, a produção de partículas polidispersas é inevitável e não permite o controle sobre o tamanho médio das partículas. Isso ocorre principalmente devido à dificuldade de se manter ambientes de mistura consistentes, podendo levar à falta de reprodutibilidade ou não homogeneidade da fluorescência emitida pelas nanoestruturas de PCDA. Entretanto, não foi o que ocorreu, a metodologia empregada neste estudo obteve valores bem satisfatórios relacionados ao índice de polidispersividade.

De acordo com Cho et al. (2014), essa disparidade nos resultados pode ser atribuída à fusão da membrana provocada pela interação da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd). Cho et al., (2014) capturaram imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) tanto do PCDA quanto do PCDA/ $\beta$ cd, e obtiveram vesículas de PCDA uniforme, superfície lisa, aspecto esférico e com tamanhos superiores a 100 nm. Após a inclusão de  $\beta$ cd, foram identificadas estruturas fusionadas com tamanhos superiores a 200 nm, além de uma deformação das vesículas. A respeito da rugosidade da superfície, os autores indicam que esse fenômeno provavelmente resultou da quebra da ligação de hidrogênio entre os grupos de cabeça carboxílico na superfície das vesículas após a introdução da  $\beta$ cd.

Os dados do potencial Zeta indicam claramente uma perturbação significativa no sistema. À medida que a concentração de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) no sistema aumentou de 1 para 3 mM, observou-se uma queda na estabilidade coloidal da solução, evidenciando propensão à aglomeração, decantação ou mesmo floculação. Nesse contexto específico, é possível identificar a decantação da  $\beta$ cd no sistema, uma tendência que é confirmada pela observação direta na Figura 10.

Figura 10 - Soluções contendo as vesículas de PCDA 1mM; PCDA/  $\beta$ cd 1 mM; PCDA/  $\beta$ cd 2 mM e PCDA/  $\beta$ cd 3 mM no dia da produção (Dia 1) e 28 dias após a produção (Dia 28)



Fonte: Do Autor (2024).

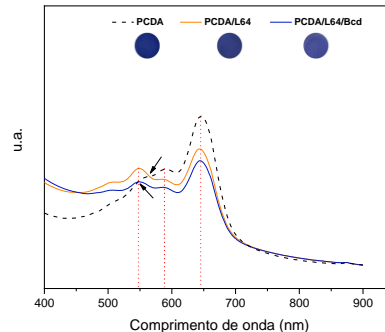
### 3.2. Avaliação colorimétrica das vesículas de PCDA

Obviamente, a incorporação do CT das vesículas produzidas conferiu à nanoestrutura uma maior estabilidade coloidal, e uma maior estabilidade cromática. A coloração azul que é observada nas vesículas de PCDA/L64 é resultado de um núcleo hidrofóbico composto pelos grupos alquila do PCDA e pelos seguimentos do L64, além de uma camada externa hidrofílica formada pelos grupos carboxílicos do PCDA e pelos seguimentos do L64. Essa configuração destaca que os monômeros de diacetilenos constituíram uma espinha dorsal de polímero alternado, iniciada pela exposição à luz UV, resultando na formação de agregados não perturbados de vesículas de PCDA (SAGONG et al., 2021; DE SOUZA et al., 2016). Na Figura 11 segue representado o gráfico do perfil espectral.

O perfil espectral padrão das nanoestruturas de PCDA apresenta um pico característico em ~650 e um ombro em ~590, resultados estes, já mencionados por outros estudos (CHO et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; FERREIRA et al., 2018; KIM; HONG; LEE, 2021; ORTEGA et al., 2021; WESTON et al., 2020; WESTON; KUCHEL; CHANDRAWATI, 2020).

Uma absorção em aproximadamente 650 nm, que corresponde a absorção da cor laranja, ou seja, azul aos olhos humanos e um ombro em aproximadamente 590 nm, correspondente a absorção da cor amarela, roxa aos olhos humanos. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Ortega et al., (2021).

Figura 11 - Perfil espectral de absorção UV-Vis das nanopartículas de PCDA; PCDA/L64 e PCDA/L64/ $\beta$ cd.



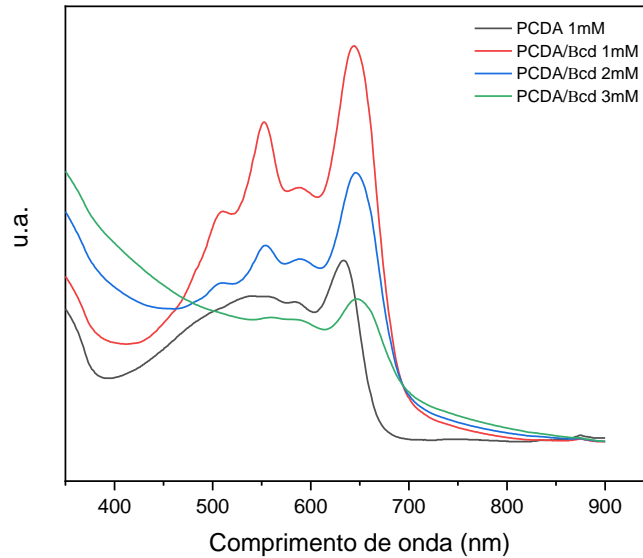
Fonte: Do Autor (2024).

Na presença do copolímero tribloco (CT) L64 e da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd), observou-se alterações no espectro UV-Vis das soluções. Os picos máximos de absorção foram detectados em 547 e 643 nm, acompanhados por um ombro em 589 nm. Portanto, a absorbância acima de 600 diminuiu enquanto a absorbância entre 400 e 600 nm aumentou. Esses resultados sugerem que tanto o L64, quanto a  $\beta$ cd alteraram a intensidade da absorção nesses comprimentos de onda. Isso se deve ao fato de que em comparação ao material puro, houve o surgimento do pico referente ao início da mudança cromática azul/vermelho (~550).

A influência da adição de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) à solução de vesículas de PCDA foi investigada, conforme mostrado na Figura 12. Na ausência de  $\beta$ cd, a solução de PCDA revelou uma absorção máxima em 640 nm, com um ombro em 590 nm, indicando que a presença de L64 não impediu a polimerização dos monômeros diacetilênicos. Esses resultados assemelham-se aos obtidos por De Souza et al., (2016), que afirmaram que a presença de L64 não afetou o rendimento da polimerização.

Na presença  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) em concentrações de 1 e 2 mM, observaram-se alterações no espectro UV-Vis das soluções. Os picos máximos de absorção foram detectados em 553 e 645 nm, acompanhados por dois ombros em 510 e 590 nm. Esses resultados sugerem que, nestas concentrações, a  $\beta$ cd amplificou a intensidade de absorção nestes comprimentos de onda. A transição colorimétrica PDA/L64, induzida por concentrações muito baixas de  $\beta$ cd, evidenciou uma interação específica entre as nanoestruturas, distinta daquela observada na concentração de 3 mM. Isso se deve ao fato de que as alterações nos espectros foram consideravelmente menores em comparação com as demais concentrações.

Figura 12 - Espectros de absorção da solução de vesícula de PCDA antes e depois da adição de  $\beta$ -CD. (1) PCDA 1mM (2) PCDA/ $\beta$ -CD 1mM; (3) PCDA/ $\beta$ -CD 2mM; (4) PCDA/ $\beta$ -CD 3mM



Fonte: Do Autor (2024).

Na concentração de 3 mM, notou-se apenas um pico em 645 nm, apresentando intensidade significativamente inferior em comparação com as outras concentrações e até mesmo menor do que à solução pura, acompanhado por um ombro bem sutil em 590 nm. De acordo com De Souza et al., (2016), isso sugere que a maior parte das moléculas de PCDA azuis não passaram pela conversão da conformação azul para vermelha nessa condição.

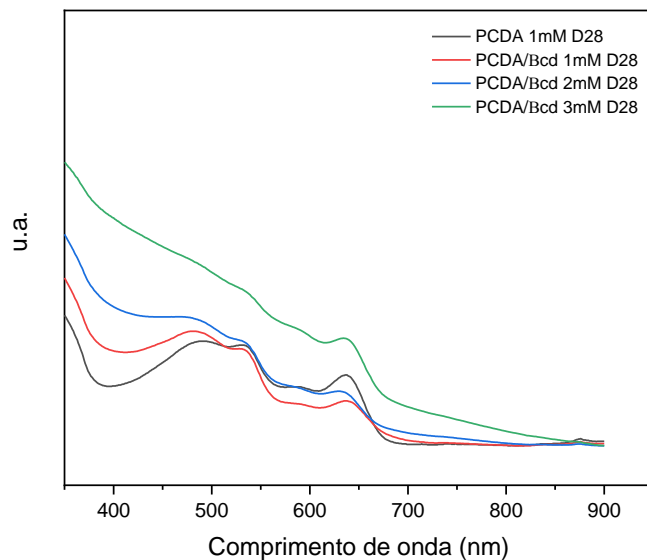
Para quantificar a extensão das interações PCDA/L64/ $\beta$ cd, procedeu-se à quantificação da resposta colorimétrica (RC) nas soluções. Os resultados indicaram valores de 22%, 23% e 12% para as amostras PCDA/ $\beta$ cd 1, 2 e 3 mM, respectivamente. Esses dados revelam que aproximadamente 78%, 77% e 88% das moléculas de PCDA ainda mantiveram-se na conformação azul.

Para esses resultados vale ressaltar que o diâmetro interno aproximado da  $\beta$ cd é de 0,78 nm, e não forma complexos de inclusão com monômeros de PCDA livres. Portanto, se o PCDA existir como monômeros livres, apenas o diâmetro interno seria o fator importante. No entanto, nas estruturas de camadas montadas molecularmente, o diâmetro externo da  $\beta$ cd (1,53 nm) pode ser tão importante quanto os diâmetros internos. E devido ao fato de que a distância entre as cadeias em supramoléculas de PCDA é de aproximadamente 0,5 nm é razoável que a  $\beta$ cd consiga, em parte, perturbar as estruturas ordenadas das vesículas, e, com isso, o grau de ruptura das estruturas ordenadas de diacetileno por moléculas de  $\beta$ cd está intimamente relacionado com

as mudanças de cor do PCDA (KIM et al., 2005). Este fato pode ser confirmado pela análise da imagem da Figura 10, em que são apresentadas as soluções todas na forma azul, e também pelos valores obtidos pelo cálculo da resposta colorimétrica (RC).

O espectro UV-Vis das mesmas soluções foi obtido novamente, cerca de 28 dias após serem produzidos, a fim de tentar mensurar o tempo de vida útil em que essas soluções poderiam ser armazenadas para posterior uso. Os espectros são mostrados na Figura 13.

Figura 13 - Espectros de absorção da solução de vesícula de PCDA antes e depois da adição de  $\beta$ -CD. (1) PCDA 1mM (2) PCDA/ $\beta$ -CD 1mM; (3) PCDA/ $\beta$ -CD 2mM; (4) PCDA/ $\beta$ -CD 3mM no Dia 28.



Fonte: Do Autor (2024).

Ao comparar o espectro da Figura 12 (Dia 1) ao da Figura 13 (Dia 28), observa-se a queda da intensidade dos picos de todas as soluções. Os picos de absorção máxima deslocaram-se para comprimentos de onda menores devido ao declínio na intensidade de absorção em 640 nm e aumento na absorção em 550 nm.

A resposta colorimétrica (RC) nas soluções foi medida e foram obtidos valores de 84; 54 e 34 % para as amostras PCDA/  $\beta$ cd 1; 2 e 3 mM, revelando cerca de 16; 46 e 66% das moléculas de PCDA ainda permaneceram na conformação azul, respectivamente. Portanto, a mudança nos espectros, as imagens e os valores obtidos pelo cálculo da resposta colorimétrica (RC), sugerem que o tempo de vida útil das soluções é de menos de 28 dias.

Segundo Cho et al., (2014) a presença de  $\beta$ cd causa uma perturbação no comprimento de conjugação efetivo dos polidiacetilenos, podendo romper as estruturas ordenadas das

vesículas ao longo do tempo e por consequência causando a mudança de coloração nas soluções de PCDA com 1 e 2 mM de  $\beta$ cd. Para a solução contendo 3 mM  $\beta$ cd, não foi observada uma mudança significativa na cor após 28 dias e de acordo com De Souza et al., (2016) isso provavelmente se deve à saturação dos sítios de ligação do PCDA pela  $\beta$ cd.

Com o objetivo de aprimorar a avaliação da cor, as imagens digitais das soluções de PCDA foram convertidas em valores RGB utilizando um software de processamento de imagens. Os valores R, G e B representam a intensidade dos componentes vermelho, verde e azul na imagem. Embora existam inúmeras cores, o vermelho, verde e azul (RGB) são considerados as três "cores primárias". Em outras palavras, várias outras cores podem ser reproduzidas pela combinação dessas três. Assim, o sistema RGB é um modelo de cores no qual as diferentes tonalidades são expressas pelas proporções de vermelho, verde e azul (KASAJIMA, 2019). Com o intuito de facilitar a comparação das respostas colorimétricas, foram gerados histogramas RGB.

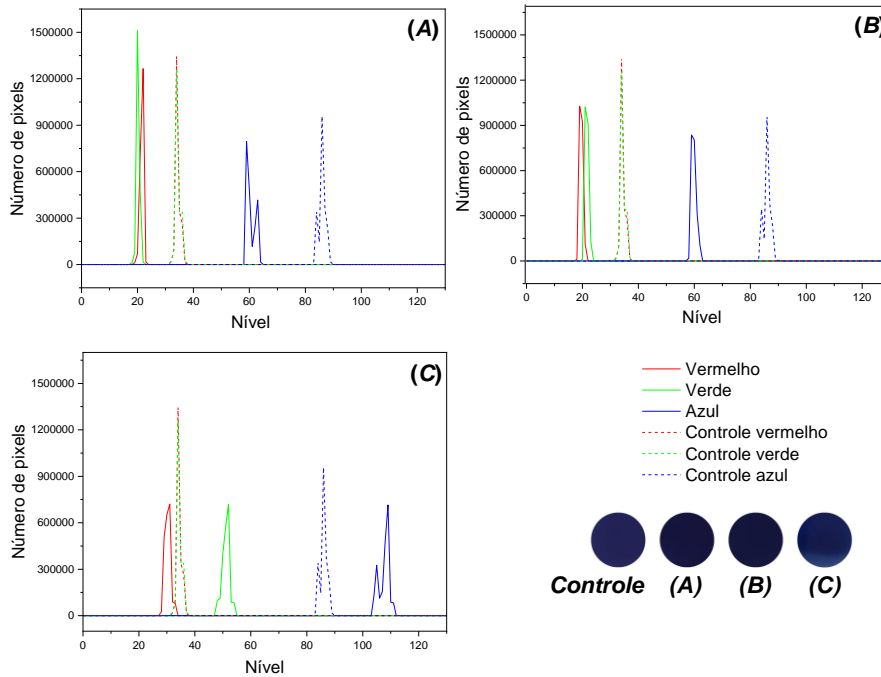
Os histogramas das amostras no Dia 1 (dia em que foram produzidas as soluções) mostraram claramente a maior representatividade da coloração azul (B), representada pelo pico em azul nos gráficos em detrimento da coloração vermelha (R) e verde (G), representadas nos gráficos pelos picos vermelho e verde, respectivamente. Este fato ocorreu tanto para a solução que continha 1 mM de  $\beta$ cd, quanto para a que continha 2 mM.

Isso implica que a coloração azul é mais proeminente em comparação com as outras cores, resultando, em coloração predominantemente azul para todas as soluções. No entanto, para a solução contendo  $\beta$ -ciclodextrina na concentração de 3 mM, embora o pico B mantenha uma representatividade maior, os picos R e G se encontram em níveis distintos, com G apresentando uma intensidade superior à de R. Este fato está ligado à observação a olho nu, onde a solução em questão exibe uma tonalidade azul, embora ligeiramente mais clara em comparação com as demais.

Ao comparar os histogramas das amostras contendo  $\beta$ -ciclodextrina e compará-los com o histograma da solução controle (contendo apenas o PCDA), representado pelas linhas tracejadas, nota-se que, para concentrações de  $\beta$ cd de 1 e 2 mM (Figura 14 (A) e (B), respectivamente), todos os picos deslocam-se proporcionalmente para níveis inferiores ao controle, mantendo, contudo, a maior relevância no pico B. Em contraste, para concentração de 3 mM, o comportamento é um pouco distinto. Os picos R e G, que no controle se sobrepõem, deslocam-se em proporções diferentes, com o pico G movendo-se para níveis mais elevados e

exibindo uma relevância maior que o pico R. Ao mesmo tempo, o pico R desloca-se para níveis mais altos do que o controle.

Figura 14 - Histograma RGB do ensaio colorimétrico utilizando  $\beta$ -ciclodextrina (A) PCDA/ $\beta$ cd 1mM; (B) PCDA/ $\beta$ cd 2mM; (C) PCDA/ $\beta$ cd 3mM. O controle contendo apenas o PCDA é representado pelas linhas tracejadas.

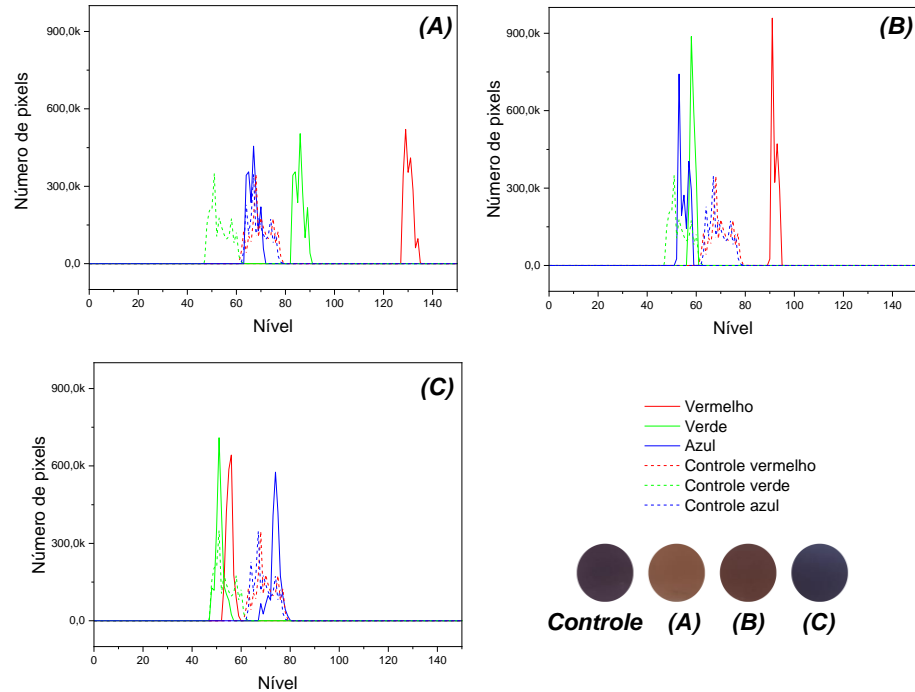


Fonte: Do Autor (2024).

Com o propósito de avaliar a estabilidade colorimétrica das soluções, procedeu-se à reconstrução dos histogramas após um período de 28 dias de armazenamento. Os resultados apresentados nos histogramas da Figura 15 indicam claramente uma alteração na coloração das soluções em comparação com aquelas apresentadas no histograma da Figura 15.

No caso das soluções contendo  $\beta$ cd 1 e 2 mM (Figura 15 (A) e (B), respectivamente), essa mudança foi perceptível a olho nu, sendo ainda mais evidente ao analisar os histogramas, nos quais se nota a diminuição do nível de azul (pico blue) e o aumento do nível de vermelho (pico red). Essas modificações também são visíveis na Figura 1, indicando que a coloração vermelha nessas soluções é mais significativa do que a azul. Já para a solução contendo 3 mM de  $\beta$ cd, (Figura 15 (C)) há apenas a alteração do pico blue para menores níveis, mas no entanto, mantendo a relevância da coloração azul em relação ao pico G e sobrepondo a vermelha, em relação à Figura 14 (C)).

Figura 15 - Histograma RGB do ensaio colorimétrico 28 dias pós produção (A) PCDA/ $\beta$ cd 1mM; (B) PCDA/ $\beta$ cd 2mM; (C) PCDA/ $\beta$ cd 3mM. O controle contendo apenas o PCDA é representado pelas linhas tracejadas.



Fonte: Do Autor (2024).

Na condição de temperatura ambiente, tanto o termocromismo fotoinduzido quanto a tensão mecânica fotoinduzida colaboram na transição de cor de azul para vermelho, provocada pela exposição à radiação UV dos PDAs derivados dos lipídios que apresentam ácido carboxílico e grupos de cabeça amida (NGAMPEUNGPIS et al., 2014).

Essas discrepâncias nos níveis de cores, principalmente no pico B, são facilmente interpretáveis visualmente. No entanto, essa alteração não é perceptível nos demais picos (R e G). A Tabela 6 apresenta os valores médios de RGB, assim como os valores de CV (coeficiente de cor) para cada amostra em cada ensaio. Os parâmetros de CV em relação à concentração de  $\beta$ cd nos ensaios colorimétricos utilizando estão ilustrados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Tabela 6 - Valores médios de R (vermelho), G (verde) e B (azul) obtidos no software PhotoDirector8 e parâmetros CV (valor da cor) de PCDA com diferentes concentrações de  $\beta$ cd.

		Concentração (mM)	R	G	B	CV
Dia 1	PCDA	0	35,4±1,3 <sup>c</sup>	35,2±1,09 <sup>b</sup>	86,8±1,09 <sup>e</sup>	-6,5
	PCDA/ $\beta$ cd	1	21,4±0,5 <sup>a</sup>	20,4±0,5 <sup>a</sup>	61,4±1,8 <sup>b</sup>	-6,8
	PCDA/ $\beta$ cd	2	19,4±0,5 <sup>a</sup>	21,4±0,5 <sup>a</sup>	59,8±0,8 <sup>ab</sup>	-7,3

<b>Dia</b> <b>28</b>	<b>PCDA/ <math>\beta</math>cd</b>	3	30,4 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	50,4 $\pm$ 2,0 <sup>c</sup>	107 $\pm$ 2,4 <sup>f</sup>	-7,7
	<b>PCDA</b>	0	68,8 $\pm$ 2,7 <sup>e</sup>	54,4 $\pm$ 3,8 <sup>c</sup>	69,4 $\pm$ 4,8 <sup>cd</sup>	-4,5
	<b>PCDA/ <math>\beta</math>cd</b>	1	129,6 $\pm$ 1,5 <sup>g</sup>	85,8 $\pm$ 2,1 <sup>e</sup>	67,6 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>	-3,4
	<b>PCDA/ <math>\beta</math>cd</b>	2	92,2 $\pm$ 1,5 <sup>f</sup>	58,6 $\pm$ 1,1 <sup>d</sup>	55,4 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	-3,5
	<b>PCDA/ <math>\beta</math>cd</b>	3	55,6 $\pm$ 1,8 <sup>d</sup>	51,2 $\pm$ 2,4 <sup>c</sup>	73,8 $\pm$ 3,1 <sup>d</sup>	-5,1

Teste Tukey ( $p < 0,05$ )

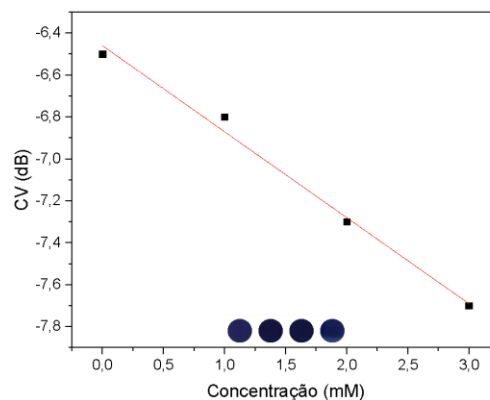
A Figura 16 mostra a ocorrência do aumento do valor da cor azul à medida em que a concentração de  $\beta$ cd aumenta, sugerindo que menos componentes vermelhos e verdes estão sendo absorvidos a partir da agregação dos componentes da solução. Após 28 dias, o comportamento muda e isso é demonstrado na Figura 17. Há o aumento do valor da cor vermelha para as soluções com 1 e 2 mM de  $\beta$ cd e uma diminuição no valor da cor azul para solução com 3 mM. Ferreira et al., (2018) relata que a diferente organização das moléculas de PDA também se reflete em seu mecanismo de transição de cor e é possível modificar a cadeia de hidrocarbonetos de maneira a alterar a interação intramolecular, resultando na alteração da barreira de energia rotacional do polímero, que é uma função da diferença de energia do polímero (conformação de fase azul e vermelha). Por exemplo, vesículas preparadas por polimerização de monômeros de ácido 10,12-pentadienóico (PCDA) sofrem transição de cor gradual com o aumento da temperatura. No entanto, o espectro de absorção e a cor do material não mudarão repentinamente.

Uma correlação linear de  $R^2=0,9917$  (Eq 3) é obtida no Dia 1 (dia em que as soluções foram preparadas) e para o Dia 28,  $R^2=0,9977$  (Eq 4). As equações obtidas para ambos estão descritas a seguir.

$$y_{\text{Dia1}} = -6,46x - 0,41 \quad \text{Eq (3)}$$

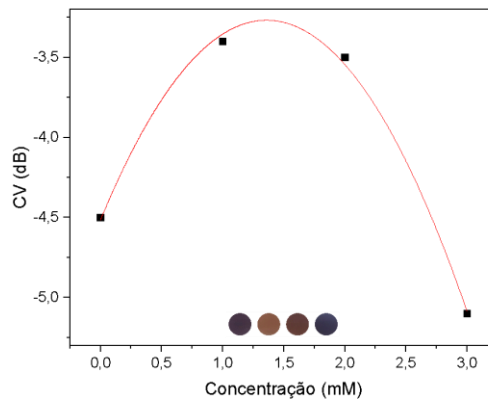
$$y_{\text{Dia28}} = 0,675x^2 + 1,835x - 4,515 \quad \text{Eq (4)}$$

Figura 16 - Valor de cor (CV) em função da concentração de  $\beta$ cd (Dia 1).



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 17 - Valor de cor (CV) em função da concentração de  $\beta$ cd (Dia 28).



Fonte: Do Autor (2024).

Brockgreitens et al., (2015) relatam que a solução de lipossomas de PDA exibe uma mudança de cor azul para rosa em resposta a ciclodextrina (CD) e que este evento colorogênico ocorre quando a ciclodextrina envolve as cadeias laterais dos ácidos carboxílicos presentes nos lipossomas de PDA. Desta forma, a formação do complexo de inclusão entre os lipossomas CD/PDA leva a uma interrupção da ligação de hidrogênio entre os grupos principais da cadeia lateral e a uma liberação da tensão de ligação no esqueleto PDA. A mudança conformacional resultante causa uma rápida mudança na cor.

Por fim, vale ressaltar que o mecanismo por trás da mudança na coloração do PCDA ainda não é totalmente compreendido. Atualmente, aceita-se que a transição de cor ocorre devido a uma mudança na conformação da estrutura conjugada do polidiacetileno, em que em sua forma azul, a estrutura apresentaria conformação linear e em sua forma vermelha, uma conformação mais enovelada (CARPICK et al., 2004; KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016; TRAIIPHOL et al., 2015).

### 3.3. Análise química dos sensores à base de PCDA

Os espectros FTIR das soluções contendo PCDA são indistinguíveis. Por isso não há diferenças significativas a serem levadas em consideração para esta análise. Este resultado vai de encontro aos de Wang et al., (2008). Segundo Roman e Baranska, (2015), isso acontece porque as bandas na região da impressão digital, bem como a  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$  são relativamente de baixa intensidade.

Sendo assim, a espectroscopia RAMAN foi realizada com o intuito de conseguir captar as vibrações moleculares de interesse. Os gráficos podem ser observados na Figura 18. Onde é possível observar diferenças principalmente na intensidade dos picos. Os espectros RAMAN

mostraram a mudança nas intensidades dos picos de alongamento  $C=C$  e  $C\equiv C$ , característicos de Polidiacetilenos (Figura 18).

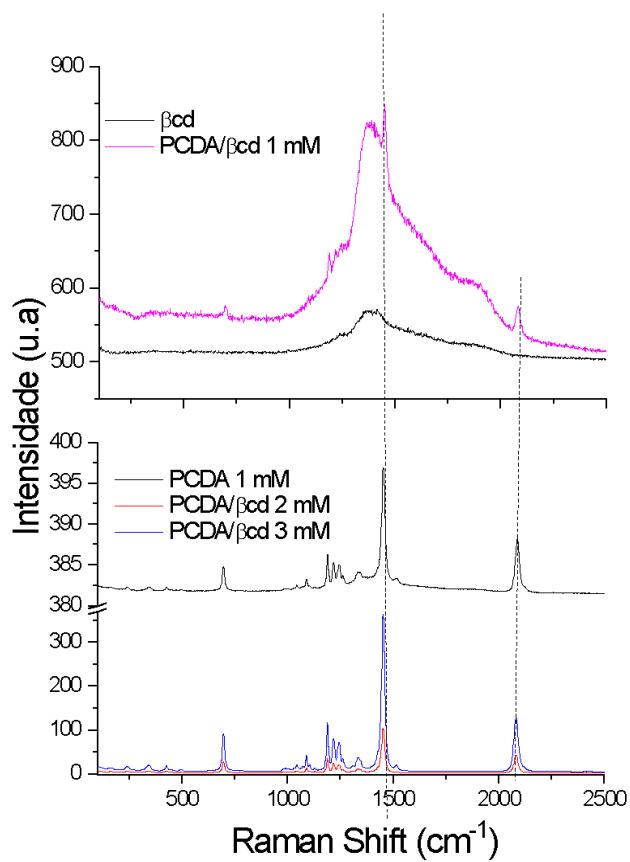
Segundo Ngampeungpis et al., (2014) essa mudança está relacionada à perturbação do sistema e altamente ligada ao processo de transição de cor do azul para o vermelho. As intensidades observadas no Raman estão de acordo com o alívio da tensão na espinha dorsal do PCDA, resultando no encurtamento das ligações duplas  $C=C$  e  $C\equiv C$  que também é observado no processo de termocromismo.

Portanto, podemos destacar que tais diferenças estão de acordo aos resultados colorimétricos obtidos nesta pesquisa, pois uma menor intensidade nos dois picos mencionados está associada a um termocromismo mais reduzido. Adicionalmente, essa observação esclarece por que a solução contendo  $\beta$ cd com uma concentração de 3 mM manteve sua coloração azul por um período mais prolongado em comparação com as outras soluções. Além disso, esses resultados justificam o fato de que a solução contendo  $\beta$ cd nessa concentração apresentou um valor de Potencial Zeta superior ao das outras, evidenciando uma maior estabilidade coloidal em comparação com as demais.

Ademais, foi possível obter evidências para a formação do complexo. Conforme destacado por Chen et al., (2013), a discrepância entre esses espectros confirma a formação do complexo de inclusão. A  $\beta$ -Ciclodextrina não exibe nenhuma banda acima de  $1500\text{ cm}^{-1}$  (MANGOLIM et al., 2014; VALENTINI et al., 2015), o que nos permite inferir que as alterações nas bandas nos complexos são decorrentes da interação com a  $\beta$ cd. Dessa forma, observamos que as bandas em torno de  $2080\text{ cm}^{-1}$  são significativamente influenciadas pela presença do agente complexante.

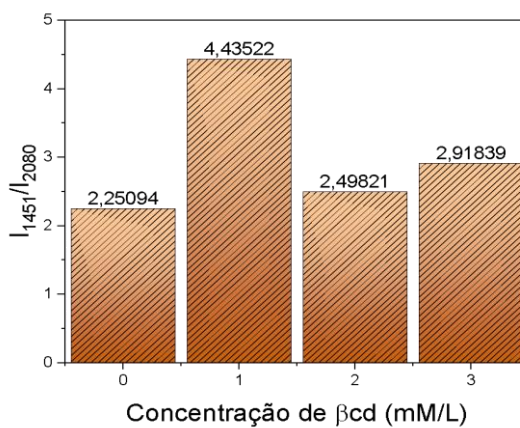
É crucial destacar a diferença significativa nos espectros Raman da solução PCDA/ $\beta$ cd 1 mM. Isso se deve ao fato de que o espectro indica a presença de ambos os materiais, PCDA e  $\beta$ cd, mas sem uma ligação química aparente. Essa observação explica a intensidade de coloração azul mais pronunciada em comparação com as demais soluções e uma razão entre os picos maior. Isso ocorre porque, na ausência da formação do complexo, não ocorre modificação na estrutura química do PCDA. Este cenário não é observado nas demais amostras. Contudo, ao comparar as amostras que contêm  $\beta$ cd em concentrações de 2 mM e 3 mM, nota-se um aumento na razão entre os picos à medida que a concentração aumenta. A representação dessa relação entre as intensidades dos picos pode ser visualizada na Figura 19.

Figura 18 - Espectros RAMAN das soluções de PCDA 1 mM; PCDA/ $\beta$ cd 1mM; PCDA/ $\beta$ cd 2 mM e PCDA/ $\beta$ cd 3 mM.



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 19 - Razão de intensidade entre os picos em 1451 e 2080 cm<sup>-1</sup> em função da concentração de  $\beta$ cd.



Fonte: Do Autor (2024).

### 3.4. Análise Térmica

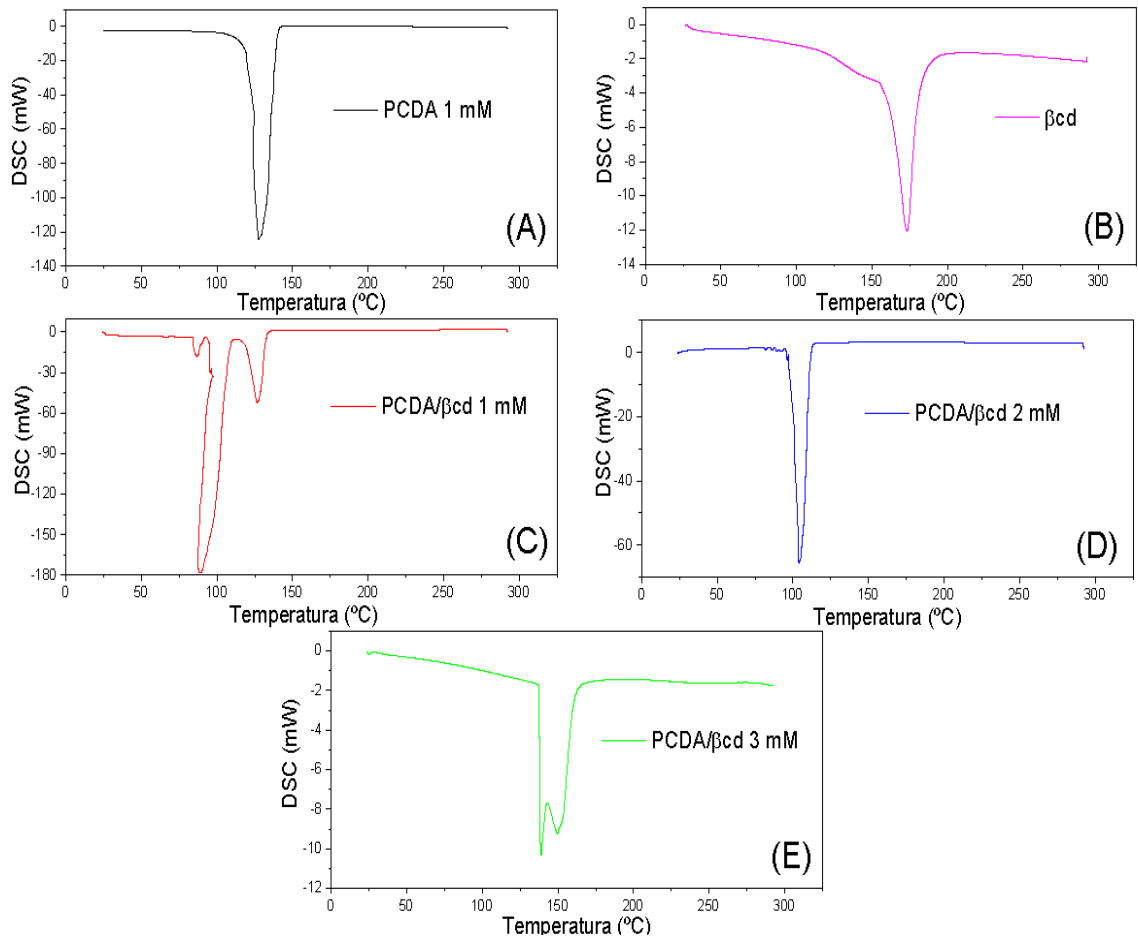
A análise de DSC foi realizada para as amostras e os resultados estão representados nos gráficos da Figura 19. Podemos observar esse processo através dos perfis térmicos de DSC, que mostram que para as soluções PCDA 1 mM e PCDA/ $\beta$ cd 1 e 2 mM (Figura 20 (A, C e D)) há a ocorrência apenas de transições de primeira ordem, ao passo que para a solução contendo  $\beta$ cd a uma concentração de 3 mM (Figura 20 (E)), pôde ser observado também evento de segunda ordem.

Tomando como referência os perfis da Figura 20 (A e B), temos que antes da adição da  $\beta$ cd no sistema, o ponto de fusão do material era de aproximadamente 127 °C e da  $\beta$ cd pura de aproximadamente 173 °C. Podemos observar na Figura 20 (C) a ocorrência de três picos endotérmicos. Aos quais atribuímos apenas o terceiro pico à aproximadamente 127 °C, como sendo a temperatura de fusão do material. Segundo Mapazi et al., (2018) os demais picos que aparecem em temperaturas mais baixas do que o ponto de fusão do PCDA são atribuídas à evolução estrutural para liberar parcialmente a tensão mecânica na cadeia principal ino e eno do PCDA.

A Figura 20 (E) mostra que no perfil DSC para concentração de PCDA/ $\beta$ cd 3 mM, ocorreu transição de segunda ordem caracterizada pela variação da capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia. A evidência para esse fenômeno está no deslocamento da linha base, muito provavelmente em virtude da concentração de  $\beta$ cd. É relevante lembrar que na Figura 10 foi observada a formação de uma sedimentação no fundo do recipiente para essa solução, atribuído na discussão em questão. Indícios dessa hipótese estão presentes na Figura 20 (B) que representa o perfil de DSC da  $\beta$ cd pura, ao qual podemos comparar e comprovar a semelhança entre os perfis. Acredita-se que essa concentração de  $\beta$ cd (3 mM) possa ter ultrapassado o limite e saturado o sistema.

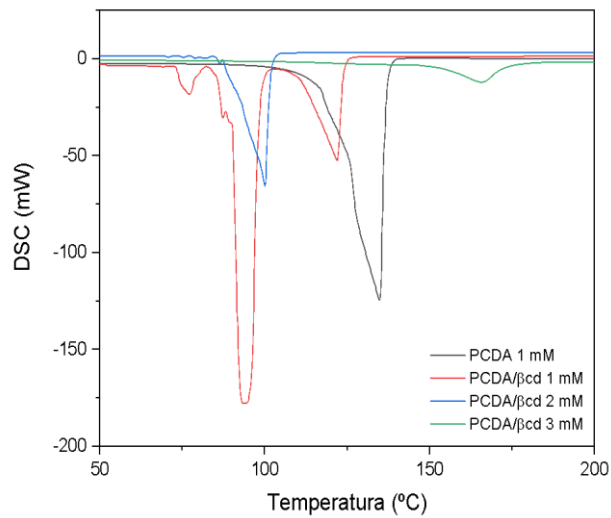
A Figura 21 revela que, após a adição de  $\beta$ cd em concentrações de 1 mM e 2 mM à solução de PCDA de 1 mM, a temperatura de fusão do material diminuiu de 135 para 127 e 104 °C, respectivamente. Além disso, essa temperatura só aumentou (139-150 °C), quando a concentração de  $\beta$ cd foi de 3 mM. No entanto, para essa concentração, como discutido anteriormente, uma quantidade significativa de  $\beta$ cd permaneceu livre no sistema.

Figura 20 - Perfil DSC para amostras de: (A) PCDA 1 mM; (B)  $\beta$ cd; (C) PCDA/  $\beta$ cd 1 mM; (D) PCDA/  $\beta$ cd 2 mM e (E) PCDA/  $\beta$ cd 3 mM.



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 21 - Perfil DSC das mudanças no ponto de fusão das amostras



Fonte: Do Autor (2024).

#### 4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a adição de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) a soluções de PCDA provoca alterações significativas nas propriedades colorimétricas, térmicas e estruturais do material. A adição de  $\beta$ cd em concentrações de 1 e 2 mM resultou em um aumento da intensidade da coloração azul, acompanhada da diminuição na intensidade da coloração vermelha. Essa interação entre o PCDA e a  $\beta$ cd pode provocar a formação de ligações intercadeias, nas quais as moléculas de  $\beta$ cd ligam-se em algum ponto à cadeia de monômeros da molécula de PCDA. Na concentração de 3 mM, observou-se uma diminuição na intensidade da coloração azul e um aumento da coloração vermelha, podendo ser justificada pela saturação dos sítios de ligação do PCDA pela  $\beta$ cd, fazendo com que as moléculas de  $\beta$ cd livres decantassem formando uma purga esbranquiçada.

As soluções contendo  $\beta$ cd em concentrações de 1 e 2 mM apresentaram uma coloração azul mais pronunciada, ao contrário da solução contendo  $\beta$ cd a 3 mM. Isso pode ser explicado pelo fato de que em concentrações mais baixas de  $\beta$ cd, a formação do complexo de inclusão é mais eficiente. Esses resultados vão de encontro aos dados obtidos na análise de RAMAN.

A análise de DSC mostrou que a adição de  $\beta$ cd à solução de PCDA pode causar alterações significativas nas propriedades do material, incluindo a temperatura de fusão, a intensidade da coloração e a estabilidade colorimétrica. Os autores sugerem, com base nos resultados desta pesquisa, que a concentração ideal de  $\beta$ cd para aplicação futura das vesículas de PCDA como nanosensores seja de 2 mM.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado (processo 140040/2021-8), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fornecimento dos equipamentos. Os autores também agradecem à Central de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras pelo apoio técnico envolvendo todas as análises.

#### Referências Bibliográficas

BAEK, S. et al. Nanoscale diameter control of sensory polydiacetylene nanoparticles on microfluidic chip for enhanced fluorescence signal. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 230, p. 623–629, 2016.

BEZERRA, F. M. et al. The Role of  $\beta$ -Cyclodextrin in the Textile Industry—Review. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3624, 9 ago. 2020.

BROCKGREITENS, J.; AHMED, S.; ABBAS, A. Kinetic analysis of  $\alpha$ -cyclodextrin interactions using polydiacetylene liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 81, n. 3–4, p. 423–427, 2015.

CARPICK, R. W. et al. Polydiacetylene films: A review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 16, n. 23, 2004.

CHEN, M. et al. Preparation and characterization water-soluble inclusion complexes of imidacloprid- $\beta$ -cyclodextrin polymer and their electrochemical behavior. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 696, p. 1–8, 2013.

CHO, E. et al. Liposome solubilization induced by complexation with dimeric  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 80, n. 3–4, p. 427–435, 2014.

DE SOUZA, L. C. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as a sensor for micellar casein: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, v. 197, p. 841–847, 2016.

FERREIRA, G. M. D. et al. A simple and inexpensive thermal optic nanosensor formed by triblock copolymer and polydiacetylene mixture. **Food Chemistry**, v. 241, p. 358–363, 2018.

KAMPHAN, A.; CHAROENTHAI, N.; TRAIPHOL, R. Fine tuning the colorimetric response to thermal and chemical stimuli of polydiacetylene vesicles by using various alcohols as additives. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 489, p. 103–112, 2016.

KASAJIMA, I. Measuring plant colors. **Plant Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 63–75, 2019.

KIM, J. M. et al. Unique effects of cyclodextrins on the formation and colorimetric transition of polydiacetylene vesicles. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 206, n. 22, p. 2299–2306, 2005.

LIMA, P. H. C. et al. Polímeros condutores com propriedades eletrocromáticas: uma revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018.

MANGOLIM, C. S. et al. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, v. 153, p. 361–370, 2014.

MAPAZI, O. et al. High temperature thermochromic polydiacetylene supported on polyacrylonitrile nanofibers. **Polymer**, v. 149, p. 106–116, 2018.

MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 62–77, 2012.

NGAMPEUNGPIIS, W. et al. Colorimetric UV sensors with tunable sensitivity from diacetylenes. **Dyes and Pigments**, v. 101, p. 103–108, 2014.

REZENDE, J. DE P. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for the detection of native and free bovine serum albumin. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 535–543, 2017.

ROMAN, M.; BARANSKA, M. Vibrational and theoretical study of diacetylenic acids. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 652–660, 2015.

SAGONG, H. Y. et al. Controllable color change of polydiacetylene vesicles under thermal-photo stimuli. **Polymer**, v. 233, n. June, p. 124211, 2021.

TRAIPHOL, N. et al. Fine tuning the color-transition temperature of thermoreversible polydiacetylene/zinc oxide nanocomposites: The effect of photopolymerization time. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 439, p. 105–111, 2015.

VALENTINI, S. R. et al. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 229–239, 2015.

WANG, X. et al. Thermochromic polydiacetylene micro- and nanocrystals: An unusual size effect in electronic spectra. **Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 773–778, 2008.

YOON, B.; LEE, S.; KIM, J. M. Recent conceptual and technological advances in polydiacetylene-based supramolecular chemosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 7, p. 1958–1968, 23 jun. 2009.

ZHENG, B. et al. Rapid colorimetric detection of arsenic (III) by glutathione functionalized gold nanoparticles based on RGB extracting system. **Optics and Laser Technology**, v. 133, n. July 2020, p. 106522, 2021.

## ARTIGO 2 – INTERAÇÃO DE SISTEMAS PCDA/ $\beta$ CD EM RESPOSTA À IVERMECTINA: ESTUDO CINÉTICO-COLORIMÉTRICO E MORFOLÓGICO

### RESUMO

A transição colorimétrica do azul para o vermelho em sistema de ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) pode ser usada para detecção óptica em diversas aplicações de reconhecimento de uma ampla variedade de moléculas. A produção de PCDAs funcionalizados com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd), é uma metodologia simples e viável. Entretanto, ainda é um desafio entender e controlar como a mudança cromática ocorre após o contato do sistema com o analito alvo. Neste estudo foram preparadas vesículas de PCDA/ $\beta$ cd a fim de investigar o termocromismo em resposta ao contato com uma solução contendo ivermectina (IVR). Dois ensaios colorimétricos foram preparados. Uma solução contendo IVR foi adicionada ao sistema em seis diferentes concentrações e as cinéticas dos ensaios foram realizadas por um período de 24 h. Os resultados mostraram que a mudança cromática apesar de não linear (dados confirmados pelos cálculos CV), é dependente da concentração de PCDA nas soluções (dados confirmados pelos cálculos de RC), bem como da maneira com a qual a molécula de IVR interage com a  $\beta$ cd. A morfologia e os tamanhos hidrodinâmicos apresentaram conformidade com a literatura. A pesquisa ainda está em seu início, entretanto é possível concluir que em concentrações mais baixas de PCDA, a resposta colorimétrica foi mais linear (dados confirmados pela RCS) e a partir dos modelos de ligação da IVR com a  $\beta$ cd, é provável que a mudança cromática esteja em grande parte dependendo do grau de ligação de cada modelo apresentado. Contudo, concluiu-se que o sistema foi responsivo à presença de IVR e portanto, poderia se tornar um potencial candidato à sensor colorimétrico.

*Palavras-chave: transição colorimétrica; ácido 10,12-pentacosadiinóico;  $\beta$ -ciclodextrina; desvio cromático; modelo de ligação IVR/ $\beta$ cd.*

### 1. Introdução

Os ácidos graxos diacetilénicos organizam-se espontaneamente em estruturas vesiculares sob determinadas condições. Os polidiacetilénos (PDAs) são obtidos por fotopolimerização de compostos diacetilénicos e possuem características estruturais e ópticas únicas. Quando os monômeros de diacetileno (DA) são adequadamente organizados suficientemente próximos uns dos outros, ocorre a polimerização de 1,4-adição e o PDA é produzidos por exposição à radiação UV a 254 nm. Após sofrerem o processo de fotopolimerização, adquirem uma estrutura energética alternada e apresentam propriedades

eletrônicas e ópticas distintas devido ao sistema de conjugação  $\pi$  deslocado. Além disso, a distorção da matriz PDA por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos induz uma transição de cor azul para vermelho (CHO et al., 2016; TOOMMEE; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2015).

Essas características estruturais faz com que o PDA seja muito utilizado como uma fascinante plataforma de sensores para moléculas alvo interessantes, como peptídeos antimicrobianos, oligonucleotídeos, ácidos orgânicos voláteis (CHO et al., 2016) e antiparasitários.

O termocromismo é uma das propriedades mais estratégicas para a aplicação de polidiacetilenos (PDAs) como sensores (ORTEGA et al., 2021). Muitos estudos mostram que a transição de cor azul para vermelho dependem da estrutura dos monômero de diacetileno (DAs) e da forma com que são montados (CARPICK et al., 2004; CHAMPAIBOON et al., 2009; FERREIRA et al., 2018; KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAIIPHOL, 2016; KIM et al., 2005; WESTON et al., 2020)

Os PDAs mais comuns possuem termocromismo irreversível e são construídos com ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) e embora muitos estudos sejam dedicados à obtenção de PDAs com termocromismo reversível (CHANAKUL; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2013; CHEN; YOON, 2011; KAMPHAN; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2016; TOOMMEE; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2015), a irreversibilidade é desejada em diversas situações como na produção de embalagens de alimentos e medicamentos, detecção de moléculas contaminantes em alimentos, para evitar fraudes e garantir o controle de qualidade (ORTEGA et al., 2021).

A ivermectina (IVR), um derivado semi-sintético da abamectina, pertencente a classe das avermectinas (AVMs), são lactonas macrocíclicas de 16 membros, que possuem potente atividade anti-helmínticas e inseticidas. Tem sido amplamente utilizadas como excelentes parasiticidas na medicina veterinária (MOREIRA et al., 2018). Entretanto, os resíduos de medicamentos veterinários na cadeia alimentar representam risco potencial à saúde pública e são percebidos como indesejáveis pelos consumidores (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019).

A determinação de resíduos de Lactonas Macrocíclicas (LM) em produtos de origem animal requer métodos com alta seletividade e sensibilidade, isso porque as concentrações de interesse são tipicamente muito baixas. Analiticamente, as abordagens usadas para detectar estes resíduos em matrizes alimentares e biológicas foram revisadas por Danaher et al., (2012). Métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido amplamente utilizados para determinar esses compostos no leite (DANAHER et al., 2012) e tecidos animais como fígado, músculo e gordura (INOUE et al., 2009; WANG et al., 2011).

Para garantir uma resposta correta de um sensor, todos eles devem conter uma molécula que se liga facilmente ao analito alvo, quase que como um antígeno-anticorpo, quanto mais específica é a ligação, melhor o desempenho final do sensor. Neste caso, uma molécula com alto potencial de ligação a resíduos de ivermectina é a  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ cd). As  $\beta$ cd são oligossacarídeos de baixa massa molar, formadas por unidades de D-glucopiranosose ligadas por uma ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídicas que se organizam em forma de tronco cônico, proporcionando uma cavidade bem definida para a formação de complexos hospedeiro-hóspede com uma série de moléculas (BEZERRA et al., 2020; MOREIRA et al., 2018; SHERJE et al., 2017)

O objetivo deste estudo foi projetar um sistema contendo PCDA funcionalizado com  $\beta$ cd e avaliar a resposta colorimétrica do sistema após o contato com uma solução de ivermectina (IVR) em diferentes concentrações. Além disso, a morfologia e tamanhos hidrodinâmicos das vesículas formadas também foram estudadas antes e de depois do contato. A resposta colorimétrica obtida nos dois estudos cinéticos realizados foi avaliada de maneira que a perturbação e agregação da membrana pudesse ser visualizada exclusivamente como uma mudança de cor azul para vermelho com base no domínio PCDA responsivo a uma análise RGB.

## 2. Material e Métodos

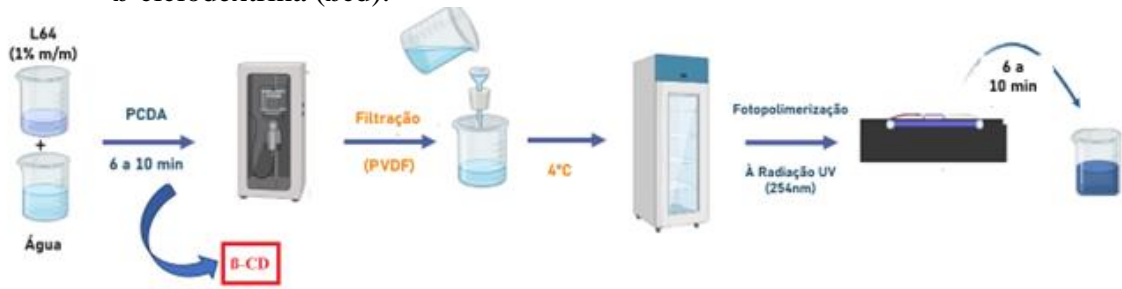
### 2.1. Material

O ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA, 97% em massa), precursor do PDA, o poli(óxido de etileno)- poli(óxido de propileno)- poli(óxido de etileno), copolímero Tribloco L64 [(EO)<sub>13</sub> (PO)<sub>30</sub> (EO)<sub>13</sub>], com massa molar média ( $M_m$ ) de  $2900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , a  $\beta$ -ciclodextrina e a Ivermectina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Os filtros para seringa (PVDF 25mm 0,45um) BioNaky foram adquiridos da Forlab Express.

### 2.2. Produção e funcionalização de nanossensores a base de PCDA

Nanossensores de PDA e L64 foram preparados seguindo metodologia proposta por De Souza et al., (2016) e Rezende et al., (2017). O L64 foi solubilizado em água na concentração de 1% (m/m). Posteriormente, o PCDA ( $0,5$  e  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram dissolvidos nesta solução e sonicada por cerca de 6 a 10 minutos, e imediatamente filtrada em filtro PVDF. A suspensão então foi mantida durante 12 horas a  $4^\circ\text{C}$ , objetivando-se orientar os monômeros de PCDA para que a polimerização fosse promovida. A fotopolimerização foi realizada expondo as suspensões à radiação UV (254 nm) por 10 minutos como mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Esquema prático da produção e funcionalização dos nanosensores de PCDA com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd).



Fonte: Do Autor (2024).

### 2.3.Preparo das amostras para o Ensaio Colorimétrico com Ivermectina

Dois ensaios foram preparados para análise da interação dos nanosensores de PCDA na presença de IVR. A descrição detalhada dos ensaios está disposta na Tabela 7.

Uma solução estoque de ivermectina (IVR) foi preparada em etanol e diferentes alíquotas dessas soluções foram adicionadas as soluções de PCDA em frascos de vidro. Foram produzidas 7 amostras de concentrações diferentes de IVR, contendo no total 2000  $\mu$ L, as quais continham PCDA + etanol e diferentes volumes de solução de IVR, Tabela 8. O controle utilizado foi a solução de PCDA + etanol.

Tabela 7 - Descrição das concentrações das soluções utilizadas nos ensaios.

ENSAIO	Concentração de PCDA ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Concentração de $\beta$ -ciclodextrina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Concentração da solução estoque de IVR ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	1	2	128
2	0,5	2	123

Tabela 8 - Ensaio colorimétrico com Ivermectina.

AMOSTRA	Volume de solução de PCDA ( $\mu$ L)	Volume de solução de Ivermectina ( $\mu$ L)	Volume de etanol ( $\mu$ L)	*Concentração final de Ivermectina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	**Concentração final de Ivermectina no ensaio 2 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Controle		0	1000	0,0	0,0
A1		30	970	3,96	3,34
A2		60	940	8,17	6,20
A3	1000	90	910	12,65	10,68
A4		120	880	17,45	14,73
A5		150	850	22,59	19,05
A6		240	760	40,42	34,11

<b>A7</b>	300	700	54,86	46,29
-----------	-----	-----	-------	-------

\* Ensaio 1: PCDA 1 mM;  
\*\*Ensaio 2: PCDA 0,5 mM.

## 2.4. Ensaio Colorimétrico

Para a análise colorimétrica dos nanosensores, um estudo cinético foi conduzido durante um período de 24 h para os 2 ensaios (em tempos distintos (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24 h)). Objetivando examinar a dinâmica temporal da mudança de coloração conforme a reação progredia, as leituras das absorvâncias foram realizadas para cada tempo e concentração em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, na faixa de 300 a 900 nm utilizando uma Leitora de Microplacas de Detecção Múltipla Synergy HT (Biotek, EUA), e os dados coletados pelo software Gen5™. Concomitantemente, fotos foram capturadas para ambos os ensaios e portanto, foram capturadas em todos os tempos e concentrações, utilizando um smartphone Moto g42, com resolução de câmera tripla de 50MP + 2MP + 8MP. Em seguida, uma fração de 228 x 341 pixels foi extraída de cada imagem original para estudo das cores RGB (Red, Green, Blue) usando o software OringPro 8.5.

A mudança de coloração via método RGB foi realizada a fim de análise das diferentes combinações das cores vermelho, verde e azul e a reprodução de um largo espectro cromático. Com este propósito foram utilizadas as equações 5 e 6, nas quais avaliou-se a intensidade do componente vermelho e azul, respectivamente, em comparação com a intensidade total dos componentes primários vermelho, verde e azul.

$$CV (dB) = 10 \log \left[ \frac{R}{(R + G + B)} \right] \quad Eq (5)$$

$$CV (dB) = 10 \log \left[ \frac{B}{(R + G + B)} \right] \quad Eq (6)$$

Em que, R, G e B representam a intensidade óptica do vermelho, verde e azul, respectivamente. A escala padrão RGB é determinada por números inteiros que vão de 0 a 255, para cada uma das três cores, sendo o (0,0,0) representado pelo preto e (255,255,255) correspondente à cor branca (ZHENG et al., 2021).

Por fim, foram aplicados dois métodos de análise da resposta colorimétrica, o primeiro através de UV-Vis (RC) e o segundo através das fotos digitais (RCS) para quantificar a mudança de cor do PCDA em termos de desvio cromático para o vermelho.

O método de análise da resposta colorimétrica (RC) seguiu protocolo adaptado de Ferreira et al., (2018). As leituras foram realizadas em uma Leitora de Microplacas de Detecção Múltipla Synergy HT com varredura entre os comprimentos de onda de 300 a 900 nm e os

dados coletados pelo software Gen5™. Para avaliar a variação das cores das soluções de PCDA, o parâmetro de Resposta Colorimétrica (RC) foi calculado conforme Equação 7.

$$RC (\%) = \left( \frac{\left( \frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}} \right)_b - \left( \frac{A_{540}}{A_{650} + A_{540}} \right)_a}{\left( \frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}} \right)_b} \right) \times 100 \quad Eq (7)$$

Onde A é a absorbância dos componentes azul ( $\lambda \sim 650$  nm) e vermelho ( $\lambda \sim 540$  nm), determinada por espectroscopia UV-Vis. Os termos “azul” e “vermelho” estão relacionados à aparência do material. E os índices “b” e “a” representam as absorbâncias antes e depois da exposição à IVR, respectivamente.

Posteriormente, seguindo protocolo adaptado de Weston et al., (2020). As imagens capturadas no ensaio cinético foram usadas para medição dos valores RGB. A intensidade do vermelho para cada pixel ou em uma seleção de pixels pode ser expressa em termos de cromaticidade do vermelho (R), onde seguiu-se as mesmas diretrizes mencionadas para o cálculo de CV, ou seja, R (vermelho), G (verde) e B (azul), usando a Equação 8.

$$r = \frac{R}{R + G + B} \quad Eq (8)$$

O RCS pode ser calculado comparando a cromaticidade vermelha do PCDA/βcd em sua fase azul ( $r_0$ ), a cromaticidade vermelha da amostra de interesse PCDA/βcd/IVR ( $r_{amostra}$ ) e a cromaticidade vermelha do PCDA/βcd/IVR na concentração de maior resposta visual, em sua fase vermelha ( $r_{max}$ ). Assim sendo, o RCS foi calculado a partir da Equação 9 a seguir.

$$RCS(\%) = \frac{r_{amostra} - r_0}{r_{max} - r_0} \quad Eq (9)$$

## 2.5. Análise da Morfologia

A morfologia das vesículas produzidas neste trabalho foi investigada e as imagens TEM foram obtidas usando um JEOLL<sub>1400</sub> TEM (JEOL, Akishima, Japão) operando a uma tensão de aceleração de 15 keV. As amostras foram preparadas por gotejamento e dispostas em grades de filme de carbono (CF400-CU) de 400 mesh, sem coloração. As amostras foram deixadas por um período de 24 h em dessecador e prosseguiu-se a análise.

## 2.6. Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta

O tamanho hidrodinâmico das nanoestruturas e o potencial Zeta foram determinados no Zetasizer PN3702 (Malvern Instruments, UK) via espalhamento de dinâmico de luz. As medidas foram realizadas utilizando um detector de fotodiodo de avalanche e um correlacionador sem qualquer purificação adicional. A fonte de luz foi um laser HeNe de 35

mW e potência de  $\lambda = 632,8$  nm, linearmente polarizada. Para o controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. O ângulo de detecção foi fixo em  $173^\circ$  e as medidas correlacionadas pelo algoritmo CONTIN.

## **2.7. Análise estatística**

As determinações analíticas para cada amostra foram feitas repetições em delineamento inteiramente casualizado. A comparação de médias foi realizada pelo teste de médias de Tukey ao nível de significância de 5%, por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o software OringPro 2018 versão 95E.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1. Ensaio cinético e avaliação colorimétrica**

Os nanosensores produzidos neste estudo evidenciam o que há muito já é relatado na literatura (KIM; HONG; LEE, 2021), que o mecanismo envolvido na mudança de cor das vesículas de PCDA ainda não é totalmente compreendido. A hipótese mais aceita é a de que a transição colorimétrica ocorre devido a uma mudança na conformação da estrutura conjugada do Polidiacetileno (WESTON et al., 2020; WESTON; KUCHEL; CHANDRAWATI, 2020). Sendo verdadeira esta hipótese, a forma azul seria associada a uma conformação mais linear, ao passo que a forma vermelha exibiria uma conformação mais enovelada.

As ciclodextrinas podem perturbar a estrutura automontada e densamente compactada das vesículas de Polidiacetileno (PDA), formando complexos de inclusão. O estresse gerado pela formação de um complexo de inclusão forneceria uma força motriz energética suficiente para promover alterações de cor nas vesículas de Polidiacetileno. Entretanto, sabe-se que os grupos principais carboxílicos dos Polidiacetilenos interagem entre si por ligações de hidrogênio, assim se as ligações de hidrogênio forem perturbadas pelas ciclodextrinas e forem impostas tensões nas estruturas do polímero, o comprimento de conjugação eficaz do polímero seria alterado. Isto está representado na estrutura modelo de Polidiacetilenos tendo os seus grupos principais de ácido carboxílico rompidos por inclusão em ciclodextrina. (KIM et al., 2005)

O efeito da irradiação de soluções de PCDA contendo  $\beta$ cd foi estudado por Kim et al., (2005) para investigar o efeito da  $\beta$ cd na formação de polidiacetileno e na mudança de coloração. E em seus estudos os autores relatam que houve um retardamento da fotopolimerização na presença da  $\beta$ cd. E que a inibição da fotopolimerização de PCDA pode ser atribuída à formação de complexos PCDA/  $\beta$ cd, bem como a um efeito detergente da  $\beta$ cd.

Como a  $\beta$ cd não produziu precipitados sólidos, eles parecem funcionar apenas como detergentes, evitando a formação de lipossomas PCDA molecularmente organizados.

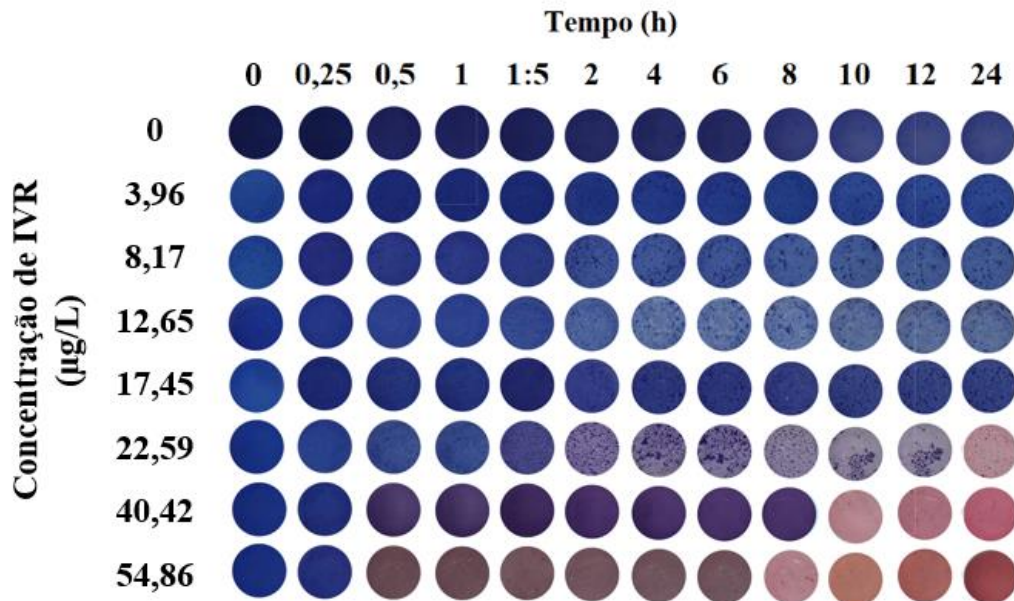
O diâmetro interno e externo aproximado da  $\beta$ cd é de 0,78 e 1,53 nm. Se o PCDA existir como monômeros livres, apenas o diâmetro interno seria o fator importante. No entanto, nas estruturas de camadas montadas molecularmente, os diâmetros externos da  $\beta$ cd pode ser tão importante quanto os internos. Devido ao fato de que a distância entre cadeias nas supramoléculas de PCDA é de aproximadamente 0,5 nm, é razoável que  $\beta$ cd perturbe um pouco as estruturas ordenadas dos lipossomas. Entretanto, seria difícil penetrar nas camadas de diacetileno densamente compactadas devido aos diâmetros externos.

Deste modo, observamos que o grau de ruptura das estruturas ordenadas de diacetileno pelas moléculas de  $\beta$ cd está intimamente relacionado com as alterações de cor no PCDA. A  $\beta$ cd portanto, altera o espectro visível do PCDA, mas não o suficiente para ocasionar a mudança de coloração do azul para o vermelho. Este fato pode ser confirmado a partir dos espectros já discutidos até aqui, onde observa-se uma mudança no espectro de absorção principalmente nos comprimentos de onda próximos a 650 e 550 nm. Mas sempre mantendo a coloração azul, Resultados semelhantes foram relatados por Kim et al., (2005).

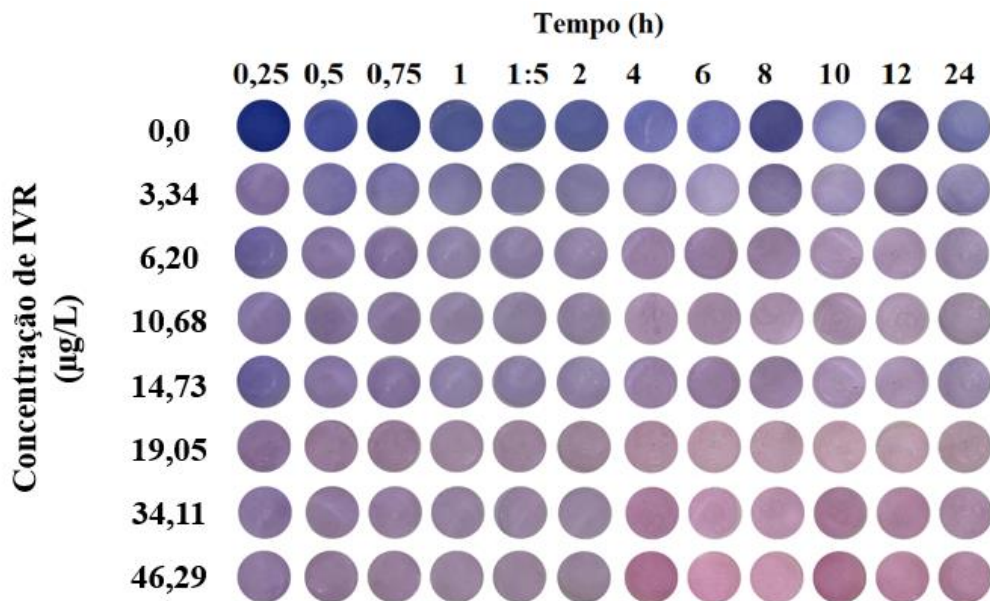
Com o intuito de investigar as alterações na coloração das amostras ao longo do tempo com a funcionalização do sistema com  $\beta$ cd, o estudo cinético das cores foi conduzido individualmente para cada concentração de IVR em dois ensaios (Figura 23) Observa-se que, no Ensaio 1, embora não tenha ocorrido a esperada mudança de cor do azul para tonalidades de rosa/vermelho imediatamente após o contato com a solução de ivermectina (IVR), esta variação fica evidente com o passar do tempo principalmente para as concentrações 22,59; 40,42 e 54,86  $\mu$ g/L (Figura 23-A).

Na cinética em questão, observa-se que quanto maior a concentração de IVR, maior é a perturbação da estrutura do PCDA, uma vez que, a mudança de coloração ocorre devido à mudança na conformação da estrutura conjugada do PCDA (WESTON et al., 2020; WESTON; KUCHEL; CHANDRAWATI, 2020). Nas demais concentrações de IVR, o que observa-se é uma mudança muito sutil, sugerindo que houve alguma interação entre as moléculas de IVR e a estrutura de PCDA funcionalizada com  $\beta$ cd., mas não o suficiente para provocar alterações mais bruscas.

Figura 23 - Cinética das cores da interação entre PCDA/ $\beta$ cd/IVR ao longo de 24 horas na Presença de diferentes concentrações de Ivermectina; A) Ensaio 1: PCDA 1 mM e B) Ensaio 2: PCDA 0,5 mM.



(A)



(B)

Fonte: Do Autor (2024).

A transição da coloração azul nas amostras demorou um pouco mais no Ensaio 1 (Figura 23-A) em relação ao Ensaio 2 (Figura 23-B). Este fato pode ter relação com a concentração de PCDA usada em cada ensaio (1 mM e 0,5 mM nos Ensaios 1 e 2, respectivamente). É notado também que em concentrações mais baixas de PCDA, o tempo requerido para que a transição

de coloração de azul para diferentes tonalidades de roxo, rosa e vermelho ocorra também é menor. De fato é possível constatar visualmente que há uma mudança de coloração no Ensaio 2, imediatamente após o contato da solução de IVR para todas as concentrações testadas.

Os espectros UV-Vis dos ensaios cinéticos foram realizados. No que diz respeito ao primeiro ensaio, realizado com o PCDA em uma concentração de 1 mM (Figura 24- A-B) observa-se que no tempo inicial (Figura 24-A), logo após o contato da solução com diferentes concentrações de IVR, há uma diminuição gradativa da absorção máxima em ~650 nm quando comparado ao controle. Isso indica que a mudança cromática começa a acontecer logo após o contato com a molécula alvo, mesmo que a olho nu isso não seja observado. À medida em que a concentração de IVR aumenta, há o decaimento gradativo da absorbância em 650 nm, comparado ao controle.

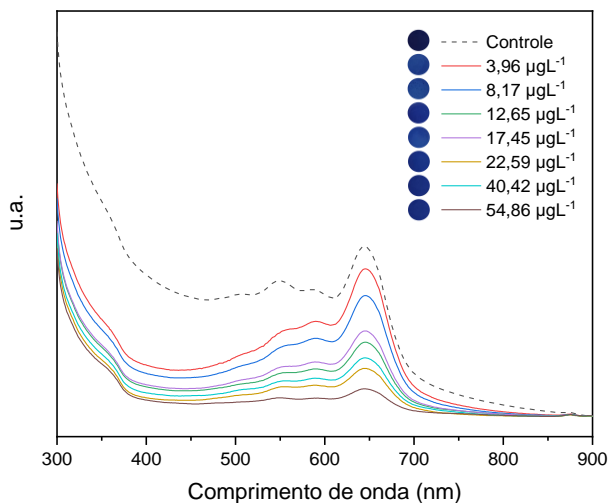
No último tempo da cinética, ou seja, 24 horas após o contato com as soluções de IVR (Figura 24-B), observa-se o surgimento de picos em ~500 e 550 nm, indicando a presença da coloração rosa/vermelho nas amostras, principalmente nas concentrações de 22,59; 40,42 e 50,86  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Isso pode ser observado tanto pelos espectros de absorbância, quanto pelas imagens digitais das amostras em questão. Portanto, à medida em que a concentração de IVR aumenta a amplitude desses picos tornam-se mais evidenciados, indicando que a mudança cromática está ocorrendo.

A transição da coloração azul/roxo nas amostras no Ensaio 2 (Figura 24-C-D) seguida por uma mudança para rosa, com diferenças sutis de tonalidade em um curto período de tempo, pode ser atribuída à dinâmica das interações moleculares envolvidas no sistema. Esta rápida transformação de cores sugere a ocorrência de processos dinâmicos e equilíbrios químicos durante a interação entre PCDA/ $\beta$ cd/IVR.

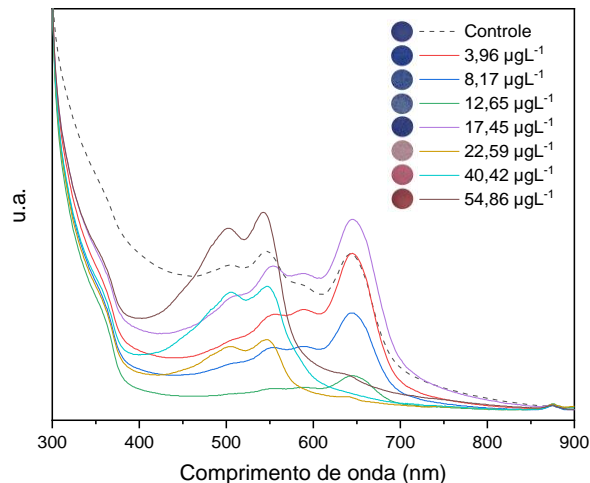
Esse sistema pode envolver reorganização nas estruturas moleculares, alterações nas interações hidrofóbicas e ajustes na microestrutura da vesícula, influenciando diretamente na absorção de luz e, conseqüentemente, na percepção visual da cor. Portanto, a transição de coloração pode ser resultado de modificações nas condições de conjugação e comprimento de onda de absorção das moléculas presentes no sistema, indicando uma complexidade nas interações que se desdobram ao longo do tempo.

Segundo Kim; Hong & Lee, (2021) na maioria das vezes o esqueleto do PDA é descrito como tendo ligações conjugadas alternadas eno-ino, mas possui estruturas de ressonância dos grupos acetilênico e butatriênico.

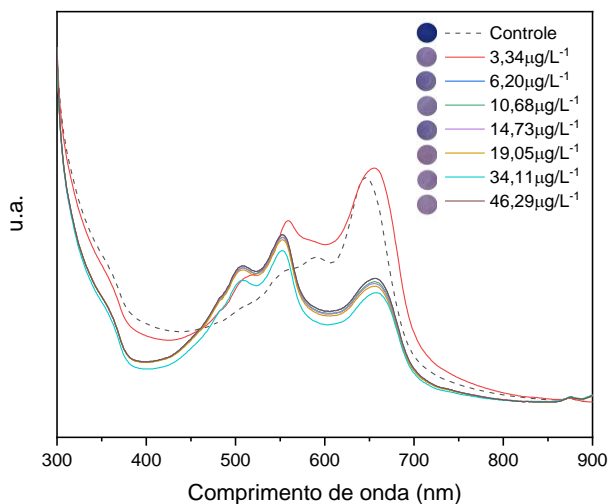
Figura 24 - Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/ $\beta$ cd na presença de ivermectina em várias concentrações: (A) PCDA 1 mM no tempo inicial; (B) PCDA 1 mM 24 horas após o contato com a solução de ivermectina; (C) PCDA 0,5 mM no tempo inicial; (B) PCDA 0,5 mM 24 horas após o contato com a solução de ivermectina.



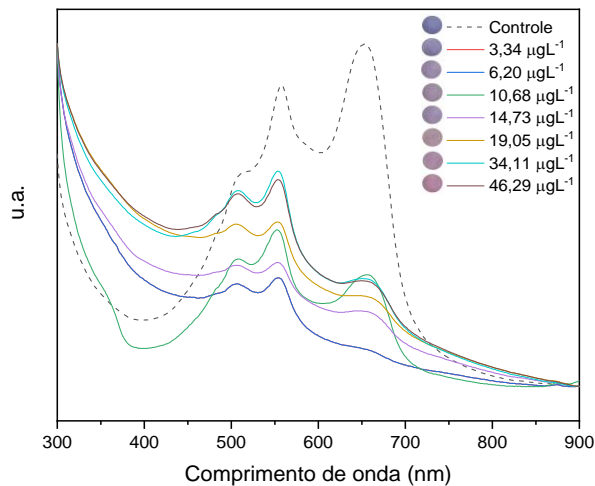
(A)



(B)



(C)



(D)

Fonte: Do Autor (2024).

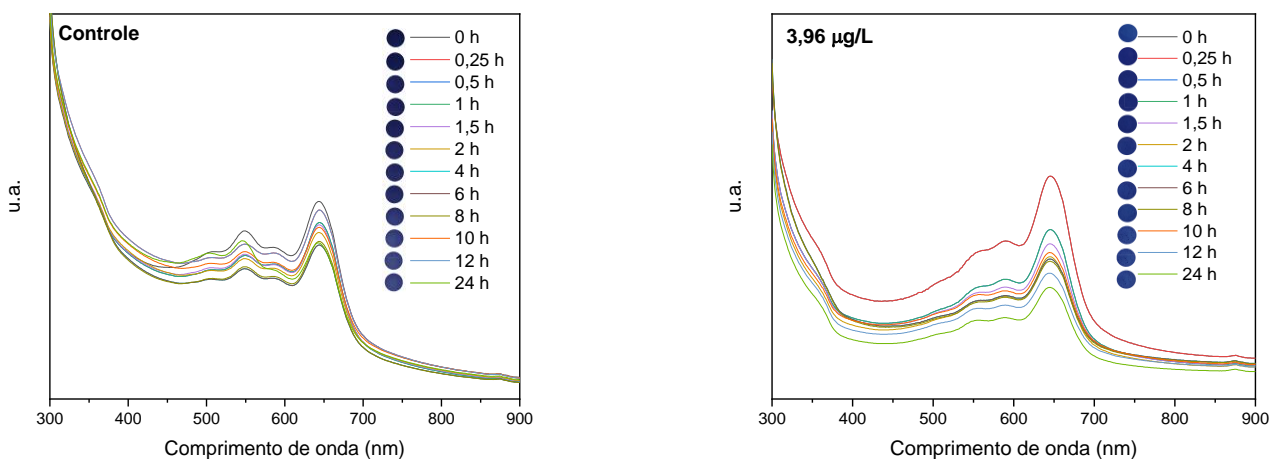
No entanto, devido ao curto comprimento de ligação do grupo butatriênico, o grupo butatriênico é mais instável que o grupo acetilênico e por esta razão, os grupos butatriênicos raramente ocorrem em estruturas de estado azul densamente compactada. Esta hipótese nos faz sugerir que em menores concentrações de PCDA, as nanoestruturas estejam menos densas e

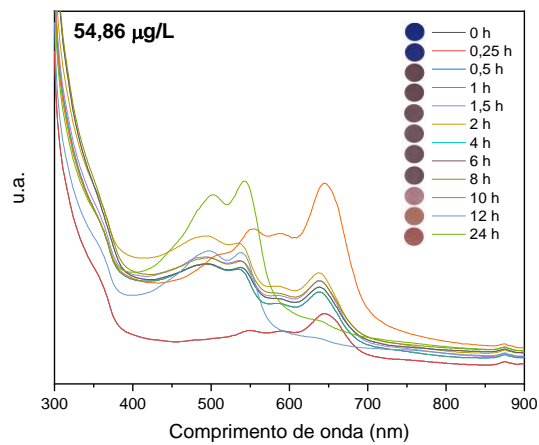
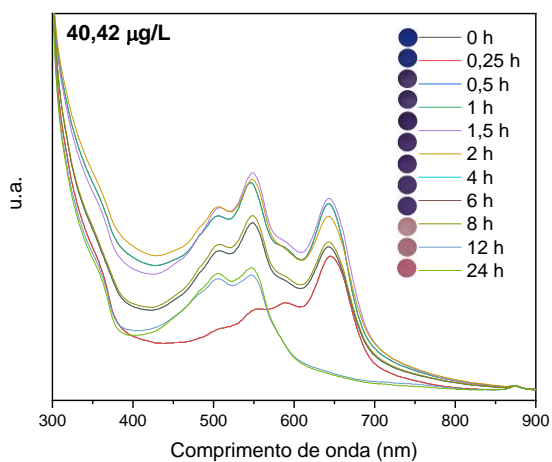
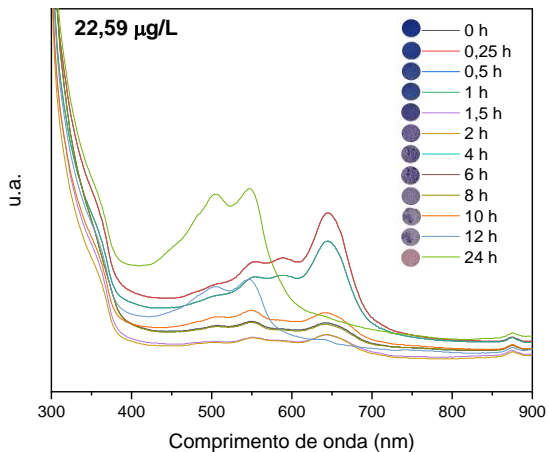
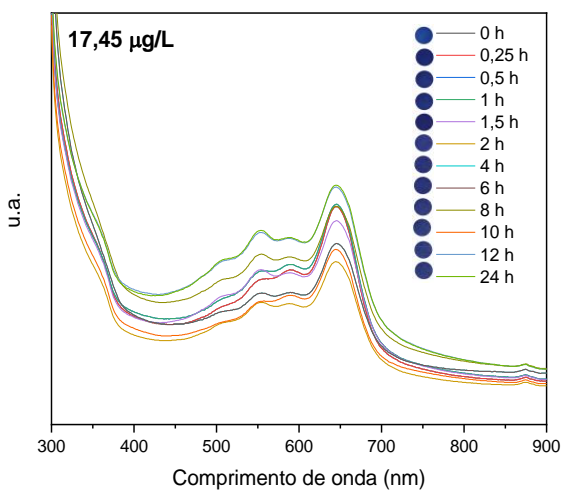
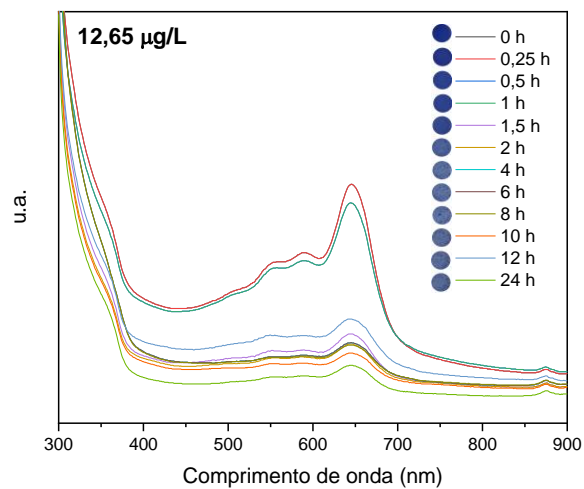
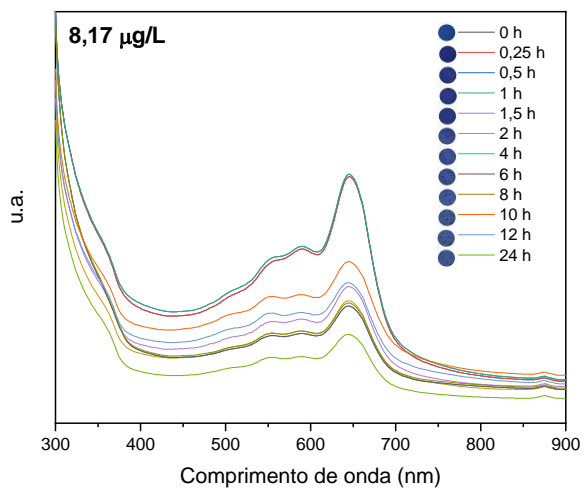
compactadas, permitindo então o aparecimento de mais grupos butatriênicos na nanoestrutura, ocasionando uma maior percepção de mudança de coloração já nos primeiros instantes de contato com a solução de IVR no Ensaio 2.

O espectro de absorção do PCDA muda em três faixas específicas de comprimento de onda dependendo do estado, e o pico correspondente pode variar dependendo de fatores como tipo de diacetileno, estrutura de montagem, progresso da polimerização e estímulo externo. O PCDA no estado azul nativo e no estado perturbado vermelho atinge o pico em aproximadamente 650 nm e 550 nm, respectivamente, e pode formar picos menores na região de dezenas de nm abaixo disso. Quando o espectro do PCDA muda, o pico na região de comprimento de onda mais longo diminui gradualmente em torno do ponto onde a absorbância não muda (ponto isobéstico). Ao mesmo tempo, o pico na região de comprimento de onda curto é recém-formado e aumenta gradualmente (KIM; HONG; LEE, 2021; ZHANG et al., 2018).

Ao analisar os perfis espectrais para cada concentração testada e em cada tempo em que as absorbâncias foram medidas, Figura 25, é possível observar no Ensaio 1, que um aumento na concentração de IVR resulta em alterações significativas do padrão de absorção. A banda de absorção principal torna-se menos robusta e os comprimentos de ondas se deslocam tempo a tempo diminuindo suas intensidades.

Figura 25 - Cinética temporal da mudança de cromática na presença de IVR em diferentes concentrações no Ensaio 1 (PCDA 1 mM).





Fonte: Do Autor (2024).

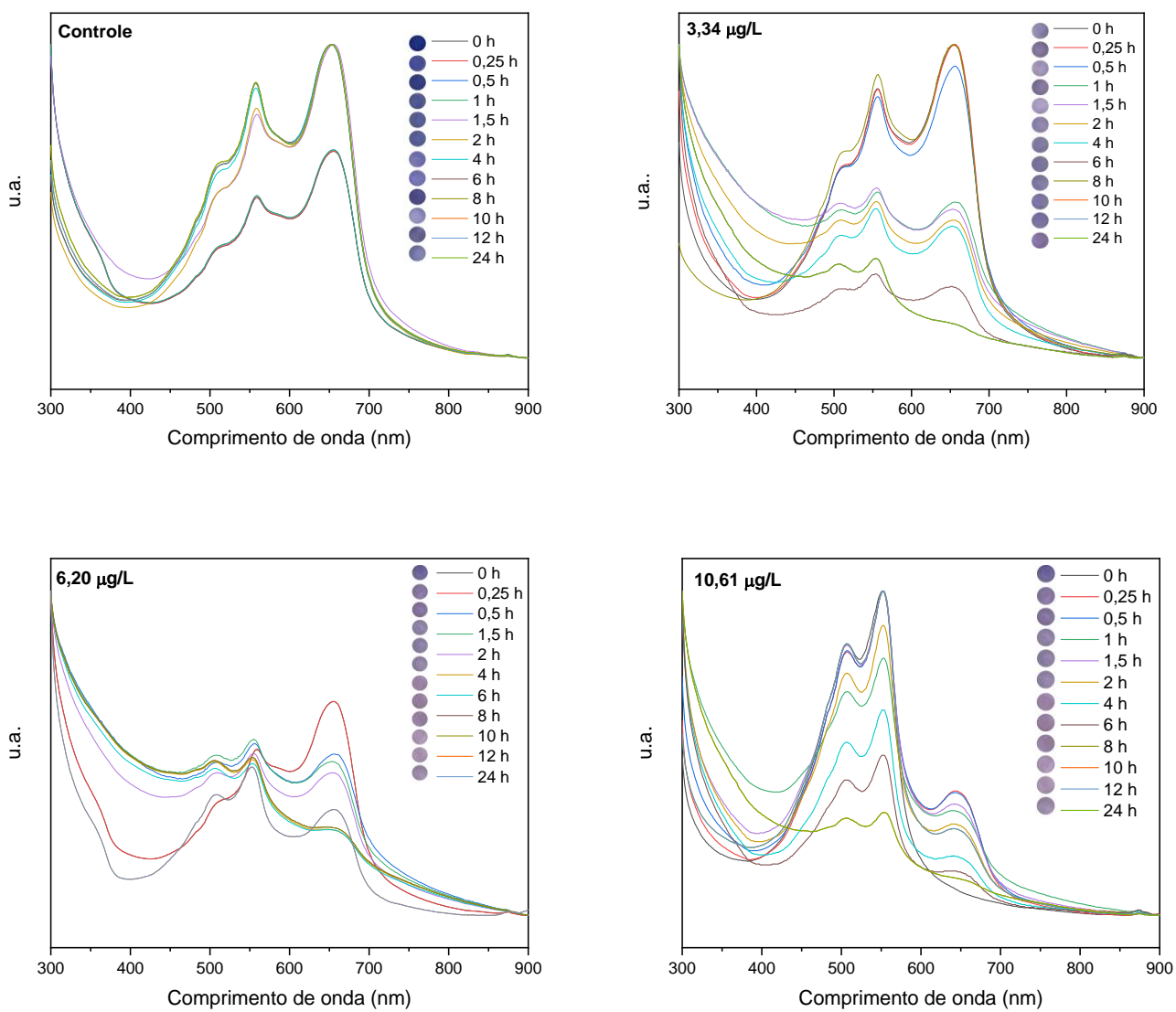
A diminuição gradativa nas intensidades das bandas de absorção são notadas à medida em que o tempo passa, sem mudança brusca de coloração, com predominância da cor azul (bandas com picos em ~640) na amostra controle e nas concentrações abaixo de 12,65 µg/L. Conforme a concentração de ivermectina (IVR) aumenta para 17,45 µg/L há o começo do surgimento de uma banda em ~550 nm. Sem mudança de coloração aparente. Quando a concentração da solução de IVR aumenta para 22,59 µg/L, com o passar do tempo observa-se o começo da mudança de coloração e somente após 12 e 24 hrs a banda em ~640 reduz drasticamente e duas bandas em 547 e 505 nm surgem, indicando a predominância da coloração avermelhada em relação à coloração azul. A percepção visual só se torna perceptível após as 24 h de contato. Na concentração de 40,42 µg/L, o surgimento as bandas características da mudança de coloração surgem já após 0,5 h do contato, sendo esta mudança perceptível a olho nu apenas após 8 h do contato inicial. Por fim, na última concentração testada (54,86 µg/L), a mudança de coloração é notada a partir de 0,5 h do contato com a solução de IVR. Este fato é evidenciado tanto pela sobreposição da banda característica da mudança de coloração, quanto pela percepção visual da amostra.

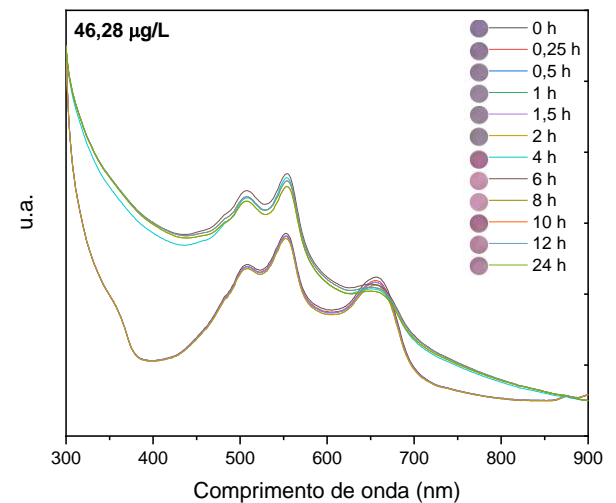
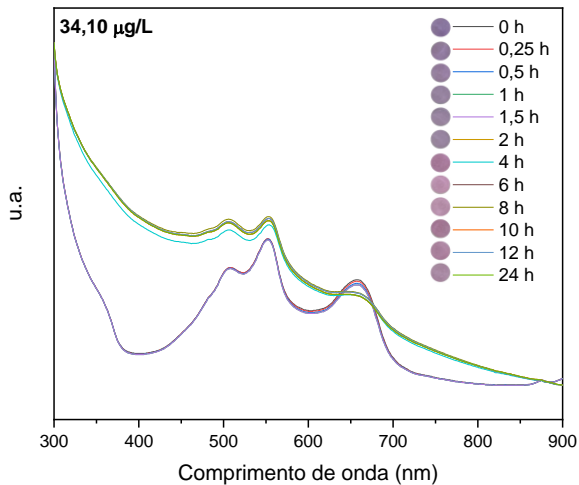
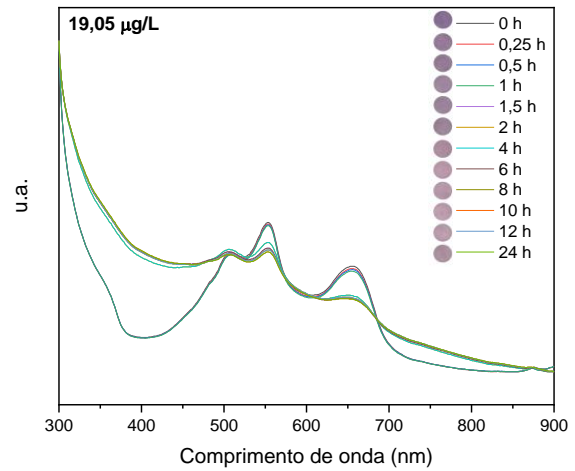
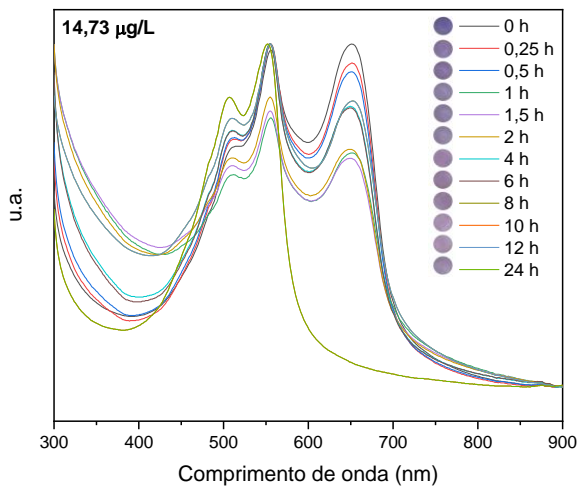
Kamphan, Traiphol & Traiphol (2016) observaram o mesmo comportamento, em seus estudos com nanocompósitos poli PCDA/PVP10. Resultados semelhantes de comportamento de mudança de coloração também foram obtidas por Sagong et al., (2021) em seus estudos de diferentes tipos de combinações de vesículas de PCDA, (poli (PCDA), poli (PCDA-EDA) e poli(PCDA/PCDA-EDA)).

A largura da banda de absorção reflete o entorno do local dos cromóforos. A desordem ao redor desses cromóforos causa grande variação do campo elétrico local e como resultado, há o aumento da distribuição estatística da transição eletrônica (ampla banda de absorção) (KAMPHAN; TRAIIPHOL; TRAIIPHOL, 2016), e o estreitamento da banda portanto, indica o aumento da ordenação local desses cromóforos dentro dos nanocompósitos PCDA/βcd/IVR.

De maneira geral, percebe-se que a coloração das soluções no Ensaio 2 (Figura 26) onde foi utilizada uma concentração de 0,5 mM de PCDA, concentração esta mais baixa que no Ensaio 1, foram observadas mudanças nos espectros até mesmo para o controle. A mudança de coloração pôde ser percebida logo após alguns instantes do contato com a solução de IVR. Foram identificados picos característicos em ~556 e 652 nm em todos os tempos, variando apenas em intensidade. As soluções assumem uma coloração em diversos tons de roxo inicialmente.

Figura 26 - Cinética temporal da mudança de cromática na presença de IVR em diferentes concentrações no Ensaio 2 (PCDA 0,5 mM).





Fonte: Do Autor (2024).

Os espectros comprovam o que é observado visualmente, ainda que exista a predominância da coloração primária azul, é possível também notar uma grande influência da vermelha. O surgimento de bandas em torno de 550 nm é notado em todas as amostras testadas, e a partir da concentração de 6,20 µg/L, o surgimento de uma outra banda em ~505 nm. A sobreposição da banda característica da coloração azul (~650) pela banda característica do vermelho só ocorre a partir da concentração de 10,61 µg/L. A percepção visual é de que uma coloração roxa/rosa. O padrão se repete para todas as demais concentrações maiores que 19,05 µg/L. A percepção visual fica mais nítida a medida em que há a diminuição da banda em ~650 com concomitante aumento na banda em ~550, até que a primeira quase seja imperceptível após as 24 h de análise.

Resultados semelhantes a respeito da relação entre os espectros e a mudança da coloração do PCDA foram obtidas por CHO et al., (2014) em seus estudos com a pralidoxima carregada positivamente com o terminal diacetileno (PDA-PAM) observaram que a absorvância acima de 600 nm diminuiu, enquanto a absorvância entre 400 nm e 600 nm à medida em que a coloração das soluções mudava de azul para tons de rosa/vermelho .

A análise cromática alternativa em uma fotografia pode também ser usada para fins de complementação dos resultados cromáticos. Este método é usado principalmente na medição de um substrato opaco e é obtido usando a intensidade relativa dos canais vermelho, verde e azul, extraído a cor da superfície como uma imagem digital.

Entre os diversos métodos de detecção, a mudança de cor causada pela mudança no espectro de absorção é um método de detecção intuitivo que pode ser suficientemente observado a olho nu. Segundo Kim; Hong e Lee, (2021), o modelo de cores RGB é um sistema aditivo que combina as luzes vermelha (R), verde (G) e azul (B) em diversas proporções para retratar as cores em uma imagem. As análises desses valores tem se revelado eficaz na quantificação da variação de cor em sensores colorimétricos por meio da integração dessas três cores.

E o RGB final pode ser quantificado através do processo de digitalização ou normalização da mudança de cor do PCDA utilizando várias tecnologias de análise. Desta forma, o sensor pode ser utilizado como uma intensidade de sinal com base no PCDA quantificado (KIM; HONG; LEE, 2021; WESTON et al., 2020).

Os dados obtidos de RGB das imagens capturadas nos ensaios cinéticos, estão representados nas Tabelas 8 e 9, juntamente com os valores de CV (valor de cor) para as intensidades vermelho e azul, calculados a partir das equações 5 e 6 em que a expressão CV (red) indica a magnitude do componente vermelho, ao passo que CV (blue) reflete a magnitude do componente azul, ambos relativos à magnitude total dos demais componentes (vermelho, verde e azul).

Tabela 8 - Valores de RGB e CV para Ensaio 1 (PCDA 1 mM) na presença de diferentes concentrações de Ivermectina (IVR).

Tempo (h)	Concentração (µL)	R	G	B	CV (RED)	CV (BLUE)
0	0	19,4±1,67	25,6±2,07	73,4±4,62	-7,855±0,002 <sup>a</sup>	-2,076±0,003 <sup>c</sup>
	3,96	32,6±4,04	63,0±6,44	137,0±4,64	-8,534±0,063 <sup>a</sup>	-2,298±0,085 <sup>c</sup>
	8,96	32,6±4,04	66,0±7,41	139,0±5,33	-8,626±0,003 <sup>a</sup>	-2,328±0,004 <sup>c</sup>
	12,65	28,8±4,96	47,2±4,55	131,6±5,12	-8,553±0,004 <sup>a</sup>	-1,994±0,007 <sup>c</sup>
	17,45	35,8±7,05	67,8±9,01	146,8±4,91	-8,447±0,012 <sup>a</sup>	-2,319±0,035 <sup>c</sup>

	22,59	25,4±1,95	50,0±3,87	130,6±5,86	-9,090±0,031 <sup>a</sup>	-1,979±0,001 <sup>c</sup>
	40,42	25,6±1,82	45,4±2,97	123,4±4,04	-8,805±0,074 <sup>a</sup>	-1,974±0,046 <sup>c</sup>
	54,86	25,4±2,07	45,0±2,64	123,0±3,54	-8,816±0,062 <sup>a</sup>	-1,965±0,085 <sup>c</sup>
<b>24</b>	0	59,2±6,37	68,0±7,84	126,6±5,03	-6,322±0,048 <sup>b</sup>	-3,021±0,052 <sup>d</sup>
	3,96	44,4±4,28	68,0±4,30	138,0±4,30	-7,513±0,032 <sup>b</sup>	-2,588±0,02 <sup>d</sup>
	6,20	65,2±1,67	83,8±1,93	140,1±2,52	-5,386±0,002 <sup>b</sup>	-3,552±0,008 <sup>d</sup>
	8,96	67,4±1,82	89,6±1,87	145,2±1,92	-6,516±0,006 <sup>b</sup>	-3,183±0,002 <sup>d</sup>
	12,65	75,8±7,19	92,2±9,42	136,6±9,74	-6,041±0,008 <sup>b</sup>	-3,483±0,009 <sup>d</sup>
	17,45	52,4±6,95	64,0±5,22	125,6±5,55	-6,644±0,013 <sup>b</sup>	-2,848±0,018 <sup>d</sup>
	22,59	180,2±6,02	142,6±6,66	152,2±6,10	-4,210±0,023 <sup>b</sup>	-4,943±0,084 <sup>d</sup>
	40,42	173,0±2,00	91,6±4,34	112,2±4,76	-3,370±0,023 <sup>b</sup>	-5,289±0,063 <sup>d</sup>
	54,86	143,2±8,44	66,8±7,26	72,0±6,16	-2,943±0,058 <sup>b</sup>	-5,929±0,001 <sup>d</sup>

Resultados expressos como médias ± desvio padrão. Teste tukey determinando diferenças significativas entre os valores encontrados de RGB ( $p < 0,05$ ). Subscrito a-d: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por concentração.

Tabela 9 - Valores de RGB e CV para Ensaio 2 (PCDA 0,5 mM) na presença de diferentes concentrações de Ivermectina (IVR).

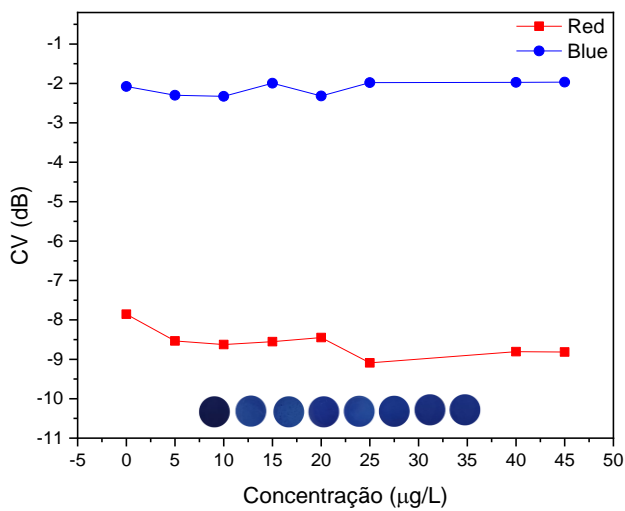
Tempo (h)	Concentração (µL)	R	G	B	CV (RED)	CV (BLUE)
<b>0</b>	0	28,2±3,11	45,4±3,51	121,0±5,05	-8,389±0,021 <sup>a</sup>	-2,064±0,028 <sup>c</sup>
	3,34	128,6±9,40	111,0±9,51	157,2±11,82	-4,893±0,103 <sup>a</sup>	-4,021±0,006 <sup>c</sup>
	6,20	105,3±5,22	95,6±5,94	146,4±8,36	-5,386±0,143 <sup>a</sup>	-3,552±0,036 <sup>c</sup>
	10,61	106,4±5,94	98,4±6,69	149,8±7,56	-5,228±0,158 <sup>a</sup>	-3,742±0,084 <sup>c</sup>
	14,73	131,0±6,36	116,8±7,19	159,6±8,85	-4,958±0,085 <sup>a</sup>	-4,069±0,067 <sup>c</sup>
	19,05	134,6±2,79	110,2±2,95	147,2±5,81	-4,642±0,025 <sup>a</sup>	-4,254±0,012 <sup>c</sup>
	34,10	137,0±8,00	116,8±8,67	156,4±9,42	-4,763±0,038 <sup>a</sup>	-4,188±0,046 <sup>c</sup>
	46,28	141,4±2,51	118,6±4,39	157,4±2,88	-4,701±0,074 <sup>a</sup>	-4,235±0,023 <sup>c</sup>
<b>24</b>	0	120,6±9,69	122,0±9,59	168,4±9,21	-5,325±0,023 <sup>b</sup>	-3,875±0,018 <sup>d</sup>
	3,34	139,6±13,61	132,4±14,66	170,2±12,49	-5,007±0,342 <sup>b</sup>	-4,147±0,058 <sup>d</sup>
	6,20	150,3±1,67	135,2±6,25	165,9±8,37	-4,742±0,009 <sup>b</sup>	-4,369±0,043 <sup>d</sup>
	10,61	152,8±6,83	137,4±7,27	166,8±7,56	-4,758±0,066 <sup>b</sup>	-4,377±0,038 <sup>d</sup>
	14,73	154,8±8,44	137,2±7,26	160,0±8,37	-4,654±0,046 <sup>b</sup>	-4,510±0,091 <sup>d</sup>
	19,05	143,4±54,55	126,0±39,76	156,6±5,22	-4,729±0,015 <sup>b</sup>	-4,346±0,057 <sup>d</sup>
	34,10	168,8±3,35	137,6±3,97	162,0±4,36	-4,432±0,031 <sup>b</sup>	-4,611±0,024 <sup>d</sup>
	46,28	173,2±8,17	131,0±9,95	155,8±11,69	-4,242±0,012 <sup>b</sup>	-4,702±0,058 <sup>d</sup>

Resultados expressos como médias ± desvio padrão. Teste tukey determinando diferenças significativas entre os valores encontrados de RGB ( $p < 0,05$ ). Subscrito a-d: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por concentração.

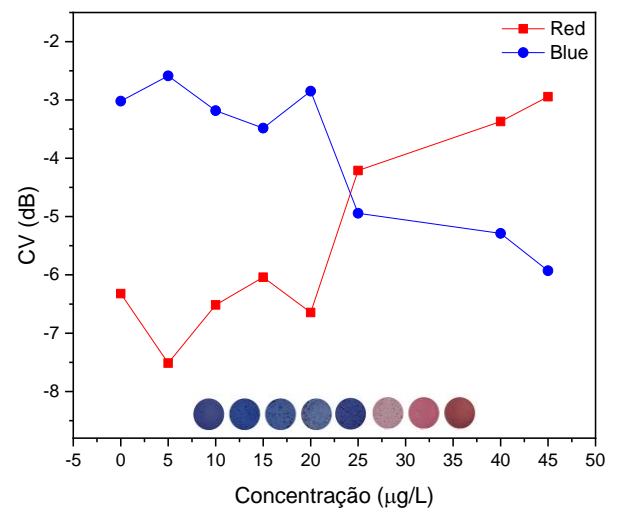
O RGB final pode ser quantificado através do processo de digitalização ou normalização da mudança de cor do PCDA usando várias tecnologias de análise, e o sensor pode ser usado como uma intensidade de sinal com base no valor quantificado do sinal do PCDA (KIM; HONG; LEE, 2021).

Os gráficos na Figura 27 ilustram os parâmetros de valor da cor (CV) vermelha e azul em relação à concentração de IVR no Ensaio 1, Figura 27 (A-B), e no Ensaio 2, Figura 27 (C-D).

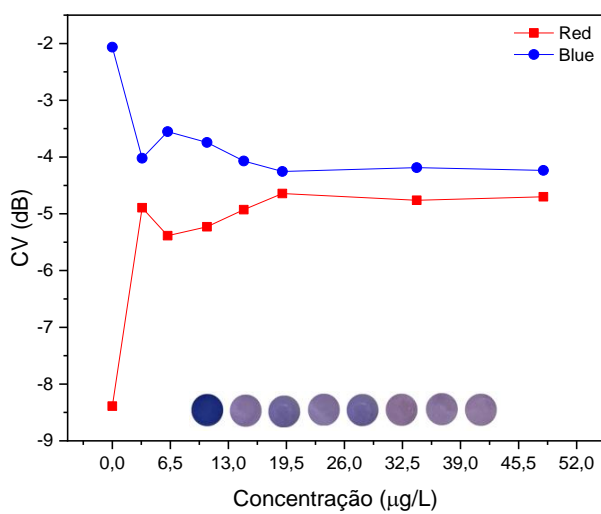
Figura 27 - Valor de cor (CV) do vermelho e azul para os ensaios colorimétricos utilizando PCDA/ $\beta$ cd na presença de diferentes concentrações de IVR (A) PCDA 1 mM imediatamente após contato (0); (B) PCDA 1 mM 24h após contato; (C) PCDA 0,5 mM no tempo inicial; (D) PCDA 0,5 mM 24h após contato.



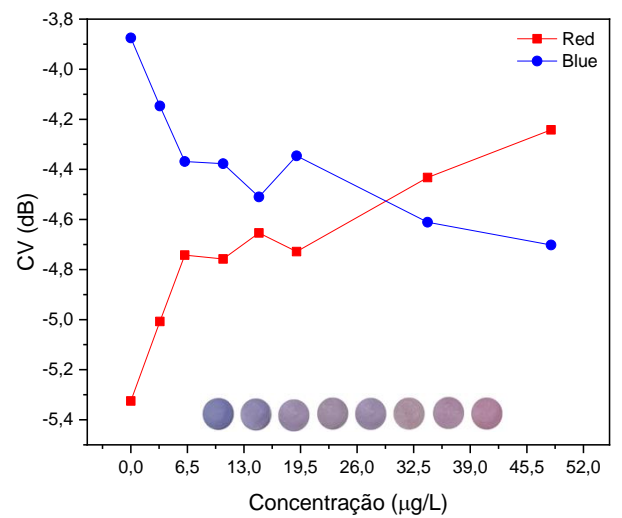
(A)



(B)



(C)



(D)

















Fonte: Do Autor (2024).

Observa-se que a medida em que a concentração de IVR aumenta, a intensidade da cor vermelha aumenta ao passo que a da cor azul diminui para ambos os ensaios. Essa transição é evidenciada pelo cruzamento das linhas de vermelho e azul nos gráficos da Figura 27 (B-D).

A não linearidade da mudança de cor é evidenciada através do cruzamento das linhas evidenciando a transição cromática do azul para o rosa/vermelho. A intensidade de azul diminui enquanto a de vermelho aumenta, ainda que de maneira não linear. Esta não linearidade na transição colorimétrica pode ser resultado da complexidade da interação hidrofóbica e da formação de microdomínios na membrana da vesícula.

Como já mencionado, o PCDA azul muda de cor na ordem de roxo, rosa e vermelho. A mudança colorimétrica do PDA pode ser quantificada de acordo com o pico do comprimento de onda absorvido em cada estado (HEO et al., 2017; KIM; HONG; LEE, 2021). Assim, calcula-se o que chamamos de Resposta colorimétrica (RC) e Resposta colorimétrica em termos de desvio cromático para o vermelho (RCS), fazendo-se uso das Equações 7 e 9, Tabela 10.

Tabela 10 - Resposta colorimétrica da porcentagem de conversão de moléculas de PCDA na Fase azul para fase vermelha (RC) e em termos de desvio cromático para o vermelho (RCS).

AMOSTRA	*RC (%)	*RCS (%)	*	**RC (%)	**RCS (%)	**
Controle	3,98	-		1,36	-	
A <sub>1</sub>	27,44	16		4,75	77	
A <sub>2</sub>	28,29	30		45,23	85	
A <sub>3</sub>	41,14	35		35,68	86	
A <sub>4</sub>	3,81	21		41,62	87	
A <sub>5</sub>	90,34	100		53,21	79	
A <sub>6</sub>	91,83	96		75,11	97	
A <sub>7</sub>	89,60	77		81,36	100	

\*Ensaio 1: PCDA 1 mM;

\*\*Ensaio 2: PCDA 0,5 mM

A resposta colorimétrica obtida no Ensaio 1 não foi linear e ainda, para cada concentração de IVR testado, um comportamento cromático foi verificado. A resposta colorimétrica nos diz a porcentagem de moléculas de PCDA que migraram da fase azul para a fase vermelha e é uma medida relacionada à absorção de luz mostrada nos gráficos de absorvância x comprimento de onda.

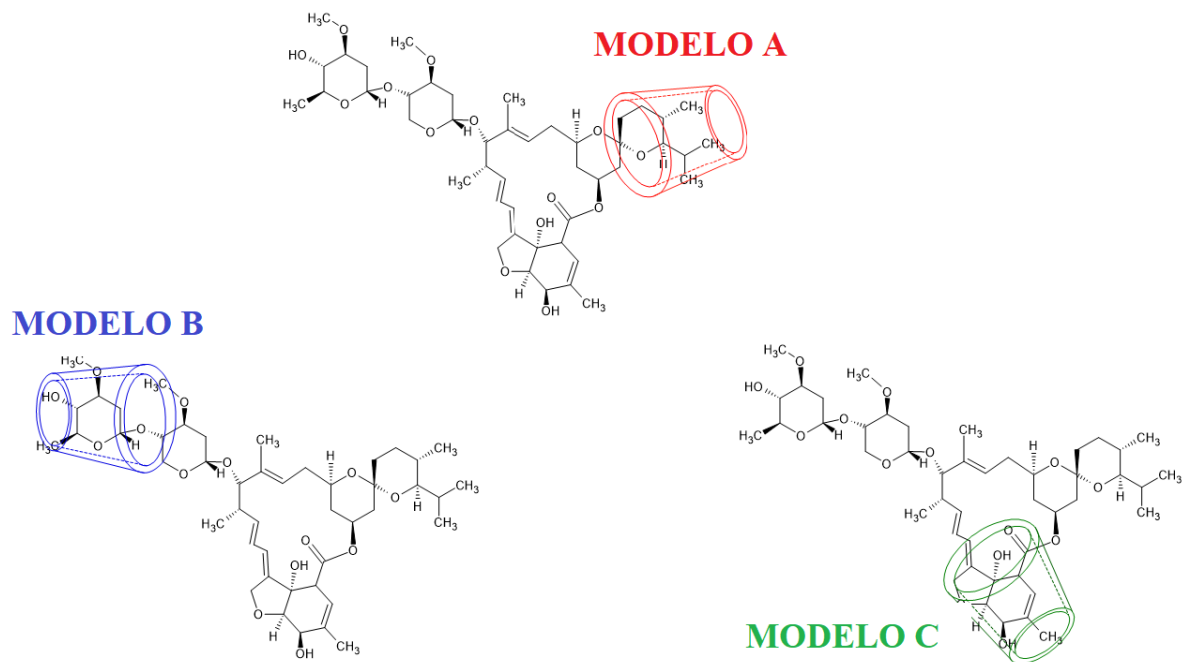
Observou-se que em todos os casos, as transições colorimétricas não foram lineares. Essas observações também foram feitas por Ortega et al., (2021) em seus estudos sobre Termocromismo em Hidrogéis de Polidiacetileno/Poli(álcool vinílico). A resposta colorimétrica pode ser utilizada para avaliar a estabilidade das vesículas de PCDA em diferentes

condições. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a agregação ou ruptura das vesículas do sistema, leva à alterações na absorção de luz ou da coloração do sistema, indicando instabilidade.

Essa dinâmica pode envolver reorganizações nas estruturas moleculares, alterações nas interações hidrofóbicas e ajustes na microestrutura da vesícula, influenciando diretamente na absorção de luz e, conseqüentemente, na percepção visual da cor, uma vez que nem sempre a percepção visual da amostra que teve maior resposta, é de fato a que teve a maior resposta. A transição para a coloração rosa pode ser resultado de modificações nas condições de conjugação e comprimento de onda de absorção das moléculas presentes no sistema, indicando uma complexidade nas interações que se desdobram ao longo do tempo.

Essa observação pode sugerir que a IVR possa se ligar de maneira diferentes ao sistema, principalmente à  $\beta$ cd. Seriam portanto, consideradas três hipótese de ligação (Figura 28).

Figura 28 - Modelos propostos para inclusão da molécula de ivermectina (IVR) na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) (Modelo A, B e C)



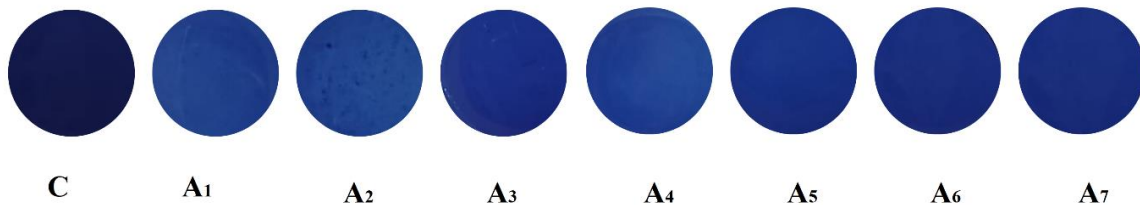
Fonte: Do Autor. Adaptada de Moreira et al., (2018).

A formação de um complexo de inclusão pode ser entendida em termos da estabilização de partes ou de todo o hóspede dentro da cavidade hidrofóbica da  $\beta$ cd (MOREIRA et al., 2018). As energias relativas de interação ( $\Delta\Delta E$ ) e as energias livres relativas de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) foram calculadas em fase aquosa para o complexo de inclusão formado por IVR e  $\beta$ cd por Moreira et

al., (2018). No referido estudo, com base nos valores de  $\Delta\Delta E$  e  $\Delta\Delta G$ , os autores observaram que o complexo de inclusão mais estável entre os três arranjos possíveis é o modelo A de inclusão. E relatam que a razão para esta estabilização deste complexo pode ser explicada por uma análise estrutural meticulosa ao nível molecular, que revelou que duas ligações de hidrogênio são estabelecidas entre IVR e o grupo hidroxila secundário da  $\beta$ cd. E concluem que estas ligações de hidrogênio podem ser consideradas as principais forças responsáveis pela estabilização do complexo, o que faz com que o complexo do modelo A seja o mais favorecido em comparação aos outros dois complexos (Modelos B e C).

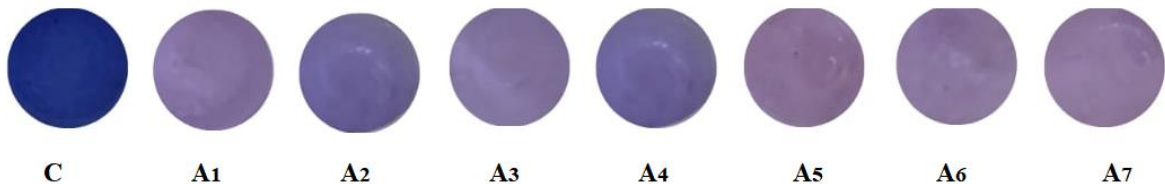
Feitas tais observações, como já mencionado, após a fotopolimerização via irradiação UV, foi observada a intensa cor azul devido à alternância de ligação tripla e dupla conjugada no PCDA. As imagens das soluções originais de vesículas de PCDA funcionalizadas com  $\beta$ cd logo após o contato com a solução de ivermectina são mostradas para o Ensaio 1 (Figura 29) e 2 (Figura 30).

Figura 29 - Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA/  $\beta$ cd, instantes após contato com solução de ivermectina (IVR) em diferentes concentrações: C (controle); A<sub>1</sub> (3,96  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>2</sub> (8,17  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>3</sub> (12,65  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>4</sub> (17,45  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>5</sub> (22,59  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>6</sub> (40,42  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) e A<sub>7</sub> (54,86  $\mu\text{gL}^{-1}$ ).



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 30 - Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA/  $\beta$ cd, instantes após contato com solução de ivermectina (IVR) em diferentes concentrações: C (controle); A<sub>1</sub> (3,34  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>2</sub> (6,20  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>3</sub> (10,68  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>4</sub> (14,73  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>5</sub> (19,05  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>6</sub> (34,11  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) e A<sub>7</sub> (46,29  $\mu\text{gL}^{-1}$ ).



Fonte: Do Autor (2024).

Foi observado que a resposta colorimétrica para o Ensaio 2 ocorre quase imediatamente após o contato com a solução de IVR, em todas as concentrações, quando comparadas ao

controle. Já no Ensaio 1, o que observa-se é o decaimento da tonalidade azul para tons mais claros.

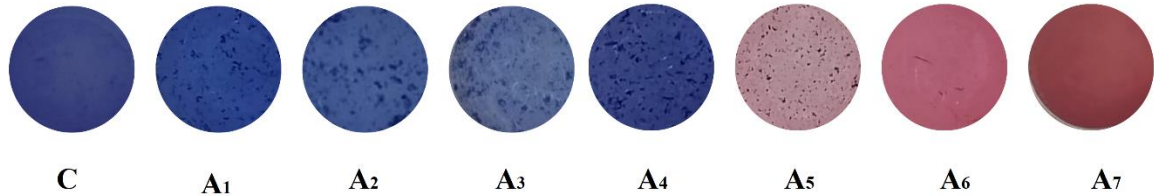
Os resultados visuais demonstram que a adição de IVR provoca uma transição seletiva da cor azul para vermelho. A mudança de cor do PCDA está relacionada à integridade da vesícula. Se levarmos em consideração os modelos apresentados na Figura 28, para a inclusão da molécula de IVR à  $\beta$ cd, apesar de que o Modelo A ser favorecido termodinamicamente, os outros Modelos podem também representar parte das interações ocorridas no processo como um todo. A ocorrência dos três modelos nos faz pensar que a transição colorimétrica pode ocorrer proporcionalmente à quantidade de moléculas de IVR que se liga a  $\beta$ cd em decorrência dos outros modelos termodinamicamente menos estáveis. Se este for o caso, explicaria a mudança de coloração não linear nos sistemas PCDA/ $\beta$ cd/IVR.

Sendo assim, uma combinação de causa e efeitos teria que ser estudada mais a fundo. Entretanto, o que podemos constatar a partir da observação acerca das Figuras 29 e 30 e a partir da Tabela 10 é que o sistema se torna menos estável em concentrações mais baixas de PCDA, por este motivo, a mudança cromática começa a ocorrer já nos primeiros instantes após o contato com a solução de IVR.

A técnica de análise colorimétrica digital foi utilizada para quantificar a mudança de cor do PCDA em termos de desvio cromático para o vermelho (RCS) para isso utilizou-se como referência a partir dos dados obtidos nas análises de RGB o sistema que passou as 24 h de análise obtiveram o valor R (vermelho) maior. O que constatou-se foi que a concentração de PCDA influenciou em grande parte os resultados, uma vez que para uma concentração de 1 mM de PCDA (Figura 31), a resposta cromática foi bastante irregular e o que observou-se visualmente não foi condizente com os dados obtidos pelo RGB. Isso porque, a olho nu, a amostra que pareceu ter apresentado maior resposta colorimétrica na verdade, a partir da análise de RCS, mostrou ser a terceira maior resposta em termos de desvio cromático para o vermelho (dados mostrados na Tabela 10).

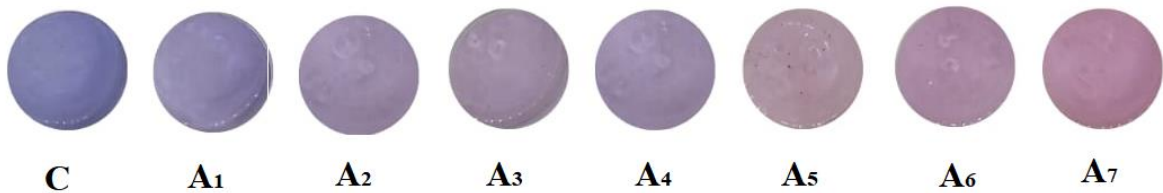
Já em menores concentrações de PCDA, como no caso do Ensaio 2 (Figura 32), a Resposta colorimétrica em termos de desvio cromático para o vermelho foi linear e o que observou-se visualmente, também foi representado pelos valores obtidos em RCS (dados mostrados na Tabela 10).

Figura 31 - Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA/  $\beta$ cd, 24 h após contato com solução de ivermectina (IVR) em diferentes concentrações: C (controle); A<sub>1</sub> (3,96  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>2</sub> (8,17  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>3</sub> (12,65  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>4</sub> (17,45  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>5</sub> (22,59  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>6</sub> (40,42  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) e A<sub>7</sub> (54,86  $\mu\text{gL}^{-1}$ ).



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 32 - Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA/  $\beta$ cd, 24 h após contato com solução de ivermectina (IVR) em diferentes concentrações: C (controle); A<sub>1</sub> (3,34  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>2</sub> (6,20  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>3</sub> (10,68  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>4</sub> (14,73  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>5</sub> (19,05  $\mu\text{gL}^{-1}$ ); A<sub>6</sub> (34,11  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) e A<sub>7</sub> (46,29  $\mu\text{gL}^{-1}$ ).



Fonte: Do Autor (2024).

### 3.2. Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta

A incorporação da  $\beta$ cd, sugere um aumento no tamanho dos conjugados, como pode ser observado na Tabela 11, esse aumento é acentuado ainda mais quando há a adição da ivermectina (IVR).

Os diâmetros das vesículas de PCDA podem variar de 23,8 à 384,2 nm e seu tamanho varia de acordo com a molécula incorporada ao sistema. As diferentes arquiteturas formadas pelos PCDA quando são preparados, ainda é de difícil controle e são formadas na maioria das vezes de maneira aleatória (FERREIRA et al., 2018; OKADA et al., 1998).

Tabela 11 - Valores de raio hidrodinâmico, potencial Zeta

Sistemas	Concentração de PCDA (mM)	Raio Hidrodinâmico (nm)	Zeta (mV)
PCDA	1	$42,3 \pm 11,2^b$	$-18,3 \pm 0,4^C$
PCDA	0,5	$31,8 \pm 8,2^b$	$-21,8 \pm 5,2^{BC}$

<b>PCDA/βcd</b>	1	189,4 ± 16,9 <sup>a</sup>	-29,6 ± -0,7 <sup>A</sup>
<b>PCDA/βcd</b>	0,5	146,3 ± 12,9 <sup>c</sup>	-21,7,4 ± -0,2 <sup>B</sup>
<b>*PCDA/βcd/IVR</b>	1	362,8 ± 21,4 <sup>c</sup>	-28,4 ± -0,2 <sup>A</sup>
<b>**PCDA/βcd/IVR</b>	0,5	268,3 ± 24,7 <sup>d</sup>	-19,8 ± -0,3 <sup>B</sup>

Teste Tukey (p<0,05);

Legendas com letras minúsculas referentes ao Raio Hidrodinâmico e maiúsculas ao potencial Zeta;

\*Ensaio 1: PCDA 1 mM e IVR 54,86µg/L;

\*\*Ensaio 2: PCDA 0,5 mM e IVR 46,28 µg/L.

Após a funcionalização do PCDA a uma concentração de 1 mM com βcd, houve um aumento considerável nos valores de Tamanho hidrodinâmico do sistema de  $42,3 \pm 11,2$  para  $189,4 \pm 16,9$  nm. E ainda, ao adicionar a solução contendo IVR, os tamanhos também aumentaram ( $362,8 \pm 21,4$  nm). O mesmo pôde ser observado quando a concentração de PCDA do sistema foi de 0,5 mM. Todos os sistemas que continham PCDA nesta concentração obtiveram valores de tamanho hidrodinâmico menores que seus análogos quando a concentração era de 1 mM. Segundo Champaiboon et al., (2009), a deformação das vesículas de PCDA e o aumento no tamanho hidrodinâmico é provavelmente causado por uma ruptura da ligação de hidrogênio entre os grupos de carboxílicos na superfície da vesícula após a inserção da βcd.

A resposta colorimétrica que ocorre no sistema devido à transição de cor, fenômeno chamado termocromismo, pode afetar até certo ponto o tamanho das partículas (DE OLIVEIRA et al., 2015), uma vez que resulta na quebra, fusão e agregação dessas partículas (SEO et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados por Guo et al., (2010), que estudaram vesículas polidiacetileno-fosfolipídicas carregadas com paclitaxel e o efeito da composição vesicular na distribuição do tamanho das partículas e no potencial Zeta e também por (FERREIRA et al., 2018) em seus estudos com polidiacetileno(PDA)/Copolímero tribloco (TC) para aplicação como termosensor para a indústria alimentícia.

O aumento da proporção de PCDA resulta em vesículas de tamanho maior. Esse resultado pode ser interpretado a partir dos pontos de arranjo e construção molecular, ou seja, quando os compostos anfílicos são dissolvidos em água, eles podem formar conjuntos moleculares ordenados para satisfazer a necessidade termodinâmica de energia mais baixa (GUO et al., 2010).

Esses conjuntos moleculares compreendem membrana monocamada, membrana bicamada, vesículas e micelas, etc. Os seus tamanhos podem ser indicados pelo número montado  $\eta$ . Se substituirmos um grupo polar mais fraco por um mais forte ou adicionarmos um -CH<sub>2</sub>- às cadeias hidrofóbicas, a afinidade entre o composto anfílico e a água será

enfraquecida. Como consequência, o composto anfifílico tem tendência a escapar da água, o que certamente resultará no aumento de  $\eta$ . (CUI; HONG; AHN, 2018; GUO et al., 2010). Devido à hidrofiliidade mais fraca do grupo principal do PCDA e à hidrofobicidade mais forte da sua cadeia hidrofóbica em comparação à  $\beta$ -ciclodextrina, o aumento da concentração de PCDA proporciona também o aumento do tamanho das vesículas.

De Oliveira et al., (2015b) estudaram a influência dos fatores pH, temperatura de incubação, tempo de incubação e concentração de anticorpos simultaneamente em vesículas de BDA para detectar *Salmonella* em meio de cultura e relataram que o tamanho da vesícula variou de 300 para 700 nm após a adição de *Salmonella*. Os autores atribuem esse aumento à interação dessas bactérias patogênicas com o anticorpo. E ainda concluíram que pequenas partículas relacionadas tem uma melhor capacidade de mudança de cor, ou seja, um sistema composto por vesículas menores, pode gerar um sinal equivalente a um lipossoma maior, apesar de menos ligação das moléculas alvo na superfície da vesícula. Esta hipótese também foi relatada por Guo et al., (2005).

Chen et al., (2010) estudaram a interferência da  $\beta$ cd no tamanho do sistema PDA/PNADA e relataram que embora o tamanho e a estrutura das vesículas não tenham apresentado alterações significativas, a agregação aparente apareceu após mistura com  $\beta$ cd.

As cargas nos grupos terminais de diacetileno desempenham um papel importante na estabilização do conjunto como todo (CHO et al., 2014). O potencial Zeta é um importante indicador da carga na superfície coloidal e pode ser usado para prever e controlar estabilidade em de sistemas coloidais (GUO et al., 2010). Ainda na Tabela 11 estão dispostos os dados do potencial Zeta.

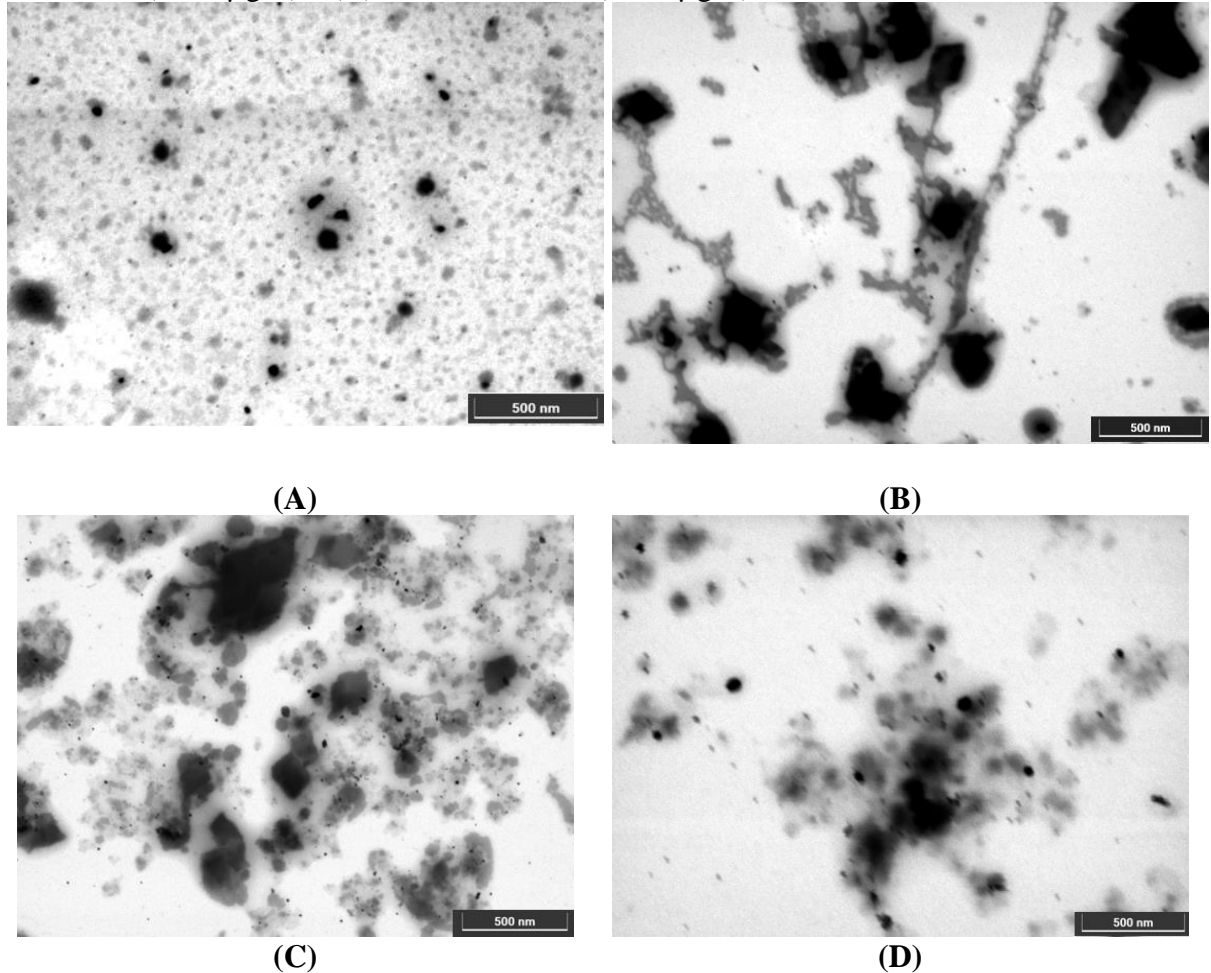
Sabemos que quanto maiores os valores de potencial Zeta, maior a probabilidade da suspensão ser estável (maior que 30 em módulo), pois as partículas carregadas se repelem e, assim, superam a tendência natural de agregação. Segundo Guo et al., (2010), o grupo principal do PCDA, -COOH, pode ser fracamente ionizado em solução aquosa, fazendo com que a carga negativa na superfície vesicular aumente. Assim, justificamos o fato de que o potencial Zeta dos sistemas que continham PCDA 1 mM ter sido maior que o de sistemas com 0,5 mM.

### **3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)**

A nanostrutura do nanocompósito à base de PCDA/ $\beta$ cd pode ser visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As imagens de TEM mostram que as vesículas

de PCDA estão dispersas. As partículas de PCDA são pequenas e esféricas (Figura 33-A). A  $\beta$ cd forma uma rede tridimensional que envolve as partículas de PCDA (Figura 33-B).

Figura 33 - Imagens TEM dos sistemas: (A) PCDA; (B) PCDA/ $\beta$ cd; (C) PCDA/ $\beta$ cd/IVR (54,86 $\mu$ g/L) e (D) PCDA/ $\beta$ cd/IVR (46,29 $\mu$ g/L).



Fonte: Do Autor (2024).

Os colóides de PCDA são predominantemente de formato oval ou retangular. Esta é a morfologia típica das vesículas de PCDA e está de acordo com a imagem TEM e com imagens já relatadas na literatura (CHAMPAIBOON et al., 2009; CHO et al., 2016; SEO et al., 2013; SHIN; SHIN; SHIN, 2017; WESTON et al., 2020). A agregação das vesículas é evidenciada pelas imagens TEM das amostras de PCDA antes e depois da adição de  $\beta$ cd (Figura 33-B).

A adição da IVR resulta na quebra, fusão e agregação dessas partículas (Figura 33-C-D), corroborando com os resultados obtidos por DLS para o tamanho hidrodinâmico, que variou de 175 a 362 nm. Estes eventos perturbaram de tal forma as cadeias de PCDA que acabaram

provocando a mudança de coloração. Estas observações também foram relatadas por Seo et al., (2013).

Como já mencionado anteriormente, as diferentes arquiteturas formadas pelo PCDA quando são preparados ainda é de difícil controle e na maioria das vezes são formadas de maneira aleatória e o controle da transição colorimétrica é de fundamental importância para o sucesso do processo como um todo. A capacidade de controlar esse comportamento é bastante relevante, uma vez que o parâmetro chave para o controle da transição de cores é a força das interações entre e intra cadeias do conjunto (KAMPHAN; CHAROENTHAI; TRAI PHOL, 2016; TRAI PHOL et al., 2015).

Os dados obtidos para o tamanho hidrodinâmico das vesículas, determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS), também comprovam a hipótese de agregação, já que foi observado um aumento de 42 para 175 nm no tamanho hidrodinâmico das vesículas após a inserção da  $\beta$ cd, corroborando com a agregação proposta.

#### **4. Conclusões**

Neste estudo observamos que a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) teve um efeito mínimo na formação e na alteração de cor dos ácidos 10,12-pentacosadiinóicos (PCDAs) polimerizados. Assim sendo, ainda que perturbe em parte a estrutura ordenada do PCDA, essa perturbação não é suficiente para causar uma mudança de coloração (resposta cromática) considerável e por esta razão, pode ser utilizada em conjunto para formar sistemas PCDA/ $\beta$ cd para detecção de ivermectina (IVR).

A combinação do PCDA e da  $\beta$ cd em nanosensores oferece uma plataforma promissora para detecção não só de ivermectina, mas de muitas outras moléculas orgânicas de interesse. Essa sinergia entre os dois materiais se baseia em suas propriedades físico-químicas complementares. A cadeia alquílica longa do PCDA fornece propriedades hidrofóbicas e juntamente com o grupo carboxílico terminal, fornece um local para funcionalização com grupos específicos para a ivermectina, aprimorando a seletividade da detecção. A cavidade interna hidrofóbica da  $\beta$ -ciclodextrina pode encapsular moléculas hidrofóbicas como a ivermectina, aumentando a sensibilidade da detecção.

Através do estudo cinético foi possível observar uma mudança não linear da cromaticidade dos sistema testados e a necessidade de se investigar mais a fundo as propriedades de ligação que regem o sistema como um todo, uma vez que a molécula de IVR pode penetrar na cavidade da  $\beta$ cd de três maneiras diferentes e que, o grau de perturbação do sistema e conseqüentemente a mudança de coloração dependerá da extensão dessa perturbação.

Através dos cálculos de Resposta colorimétrica (RC e RCS), foi possível concluir que em concentrações menores de PCDA, o sistema se mostrou mais responsivo e obteve uma linearidade na mudança cromática. Por fim, apesar das interações dinâmicas que ocorrem dentro do sistema com o passar do tempo, não serem completamente entendidas a presente estratégia para a resposta seletiva colorimétrica tem potencial para ser desenvolvida como uma amplificação do sinal do sistema de sensores PCDA.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro (processo 140040/2021-8), à Universidade Federal de São João Del Rei, à Embrapa Instrumentação de São Carlos – SP e à Central de Análises e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras pelo apoio técnico-científico envolvendo todas as análises e ao Grupo de Pesquisa de Nanotecnologia em Bioprocessos (UFSJ) pelo suporte para o desenvolvimento desta pesquisa. Os autores agradecem ainda, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fornecimento dos equipamentos.

### Referencial Bibliográfico

BEZERRA, F. M. et al. The Role of  $\beta$ -Cyclodextrin in the Textile Industry—Review. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 3624, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3624>>

CARPICK, R. W. et al. Polydiacetylene films: A review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, [s. l.], v. 16, n. 23, 2004.

CHAMPAIBOON, T. et al. A polydiacetylene multilayer film for naked eye detection of aromatic compounds. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 532–537, 2009.

CHANAKUL, A.; TRAIPIHOL, N.; TRAIPIHOL, R. Controlling the reversible thermochromism of polydiacetylene/zinc oxide nanocomposites by varying alkyl chain length. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 389, n. 1, p. 106–114, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.066>>

CHEIBUB, A. M. de S. S.; LYRA, E. S. B. De; NETTO, A. D. P. Development and validation of a method for simultaneous determination of trace levels of five macrocyclic lactones in cheese by HPLC-fluorescence after solid–liquid extraction with low temperature partitioning.

**Food Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. March 2018, p. 148–156, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.027>>

CHEN, X. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin-induced fluorescence enhancement of a thermal-responsive azobenzene modified polydiacetylene vesicles for a temperature sensor. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 36–40, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.07.015>>

CHEN, X.; YOON, J. A thermally reversible temperature sensor based on polydiacetylene: Synthesis and thermochromic properties. **Dyes and Pigments**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 194–198, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2009.12.015>>

CHO, E. et al. Liposome solubilization induced by complexation with dimeric  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 80, n. 3–4, p. 427–435, 2014.

CHO, E. et al. Polydiacetylenyl  $\beta$ -cyclodextrin based smart vesicles for colorimetric assay of arginine and lysine. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. July, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep31115>>

CUI, C.; HONG, N. Y.; AHN, D. J. Monitoring Based on Narrow-Band Resonance Raman for “Phase-Shifting”  $\pi$ -Conjugated Polydiacetylene Vesicles upon Host–Guest Interaction and Thermal Stimuli. **Small**, [s. l.], v. 14, n. 24, p. 1–5, 2018.

DANAHER, M. et al. Recent Developments in the Analysis of Avermectin and Milbemycin Residues in Food Safety and the Environment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 936–951, 2012.

DE OLIVEIRA, T. V. et al. Application of PCDA/SPH/CHO/Lysine vesicles to detect pathogenic bacteria in chicken. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 172, p. 428–432, 2015. a.

DE OLIVEIRA, T. V. et al. Stability and sensitivity of polydiacetylene vesicles to detect Salmonella. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 221, p. 653–658, 2015. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.130>>

DE SOUZA, L. C. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as a sensor for micellar casein: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 841–847, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.071>>

FERREIRA, G. M. D. et al. A simple and inexpensive thermal optic nanosensor formed by triblock copolymer and polydiacetylene mixture. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 241, p. 358–363, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.115>>

GUO, C. et al. Polydiacetylene vesicles as a novel drug sustained-release system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 362–365, 2010.

GUO, C. X. et al. Size effect of polydiacetylene vesicles functionalized with glycolipids on their colorimetric detection ability. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 109, n. 40, p. 18765–18771, 2005.

HALL, A. V. et al. The crystal engineering of radiation-sensitive diacetylene cocrystals and salts. **Chemical Science**, [s. l.], v. 11, n. 30, p. 8025–8035, 2020.

HEO, J. M. et al. Chromogenic Tubular Polydiacetylenes from Topochemical Polymerization of Self-Assembled Macrocyclic Diacetylenes. **Macromolecules**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 900–913, 2017.

INOUE, K. et al. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 32, n. 21, p. 3596–3602, 2009.

KAMPHAN, A.; CHAROENTHAI, N.; TRAIPIHOL, R. Fine tuning the colorimetric response to thermal and chemical stimuli of polydiacetylene vesicles by using various alcohols as additives. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 489, p. 103–112, 2016.

KAMPHAN, A.; TRAIPIHOL, N.; TRAIPIHOL, R. Versatile route to prepare reversible thermochromic polydiacetylene nanocomposite using low molecular weight poly(vinylpyrrolidone). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 497, p. 370–377, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.041>>

KIM, C. et al. Multi-target polydiacetylene liposome-based biosensor for improved exosome detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 355, n. November 2021, p. 131286, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131286>>

KIM, C.; HONG, C.; LEE, K. Structures and strategies for enhanced sensitivity of polydiacetylene(PDA) based biosensor platforms. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 181, n. October 2020, p. 113120, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113120>>

KIM, J. M. et al. Unique effects of cyclodextrins on the formation and colorimetric transition of polydiacetylene vesicles. **Macromolecular Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 206, n. 22, p. 2299–2306, 2005.

MOREIRA, A. M. et al. Hydrophobic Nanoprecipitates of  $\beta$ -Cyclodextrin/Avermectins Inclusion Compounds Reveal Insecticide Activity against *Aedes aegypti* Larvae and Low Toxicity against Fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 28, p. 7275–7285, 2018.

OKADA, S. et al. Color and Chromism of Polydiacetylene Vesicles. **Accounts of Chemical Research**, [s. l.], v. 31, p. 229–239, 1998.

ORTEGA, P. F. R. et al. Thermochromism in Polydiacetylene/Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Obtained by the Freeze-Thaw Method: A Theoretical and Experimental Study. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 60, n. 36, p. 13243–13252, 2021.

PIRES, A. C. D. S. et al. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 153, n. 1, p. 17–23, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.09.069>>

REZENDE, J. de P. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for the detection of native and free bovine serum albumin. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 70, p. 535–543, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.009>>

SAGONG, H. Y. et al. Controllable color change of polydiacetylene vesicles under thermal-photo stimuli. **Polymer**, [s. l.], v. 233, n. June, p. 124211, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124211>>

SEO, S. et al. Fluorescence resonance energy transfer between polydiacetylene vesicles and embedded benzoxazole molecules for pH sensing. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 451–456, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.11.016>>

SHERJE, A. P. et al. Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 173, n. 1, p. 37–49, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.086>>

SHIN, Y. J.; SHIN, M. J.; SHIN, J. S. Permeation-induced chromatic change of a polydiacetylene vesicle with nonionic surfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 520, p. 459–466, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.014>>

TOOMMEE, S.; TRAIPIHOL, R.; TRAIPIHOL, N. High color stability and reversible thermochromism of polydiacetylene/zinc oxide nanocomposite in various organic solvents and polymer matrices. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 468, p. 252–261, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.055>>

WANG, X. et al. Multicolor luminescent carbon nanoparticles: Synthesis, supramolecular assembly with porphyrin, intrinsic peroxidase-like catalytic activity and applications. **Nano Research**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 908–920, 2011.

WESTON, M. et al. A polydiacetylene-based colorimetric sensor as an active use-by date indicator for milk. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 572, p. 31–38, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.03.040>>

WESTON, M.; KUCHEL, R. P.; CHANDRAWATI, R. A Polydiacetylene-Based Colorimetric Sensor as an Active Use-By Date for Plant-Based Milk Alternatives. **Macromolecular Rapid Communications**, [s. l.], v. 41, n. 18, p. 1–7, 2020.

ZHANG, Y. et al. Polydiacetylene functionalized with charged termini for device-free colorimetric detection of malathion. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 528, p. 27–35, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.098>>

ZHENG, B. et al. Rapid colorimetric detection of arsenic (III) by glutathione functionalized gold nanoparticles based on RGB extracting system. **Optics and Laser Technology**, [s. l.], v. 133, n. July 2020, p. 106522, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2020.106522>>

## 5. ARTIGO 3 –INTERAÇÃO DE SISTEMAS PCDA/BCD EM RESPOSTA À IVERMECTINA: ESTUDO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)

### RESUMO

As características estruturais e a conformação são elementos de fundamental importância para estudos em nanotecnologia. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) é uma das técnicas mais essenciais e úteis para identificação estrutural de moléculas. A técnica se baseia na interação dos núcleos em rotação sob um forte campo magnético. Esse campo faz com que determinados núcleos absorvam radiofrequências seletivas, e a energia absorvida é observada em um espectro de NMR. Este estudo se concentrou em analisar os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 de sistemas com postos por ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) e ivermectina (IVR) e suas combinações para avaliar a formação dos complexos estudados. O NMR foi realizado em amostras aquosas usando 10% de D<sub>2</sub>O e TSPD4 como padrão, no restante das amostras foi utilizado solvente DMSO-d<sub>6</sub> e TMS como padrão. O sinal da metila referenciado em zero ppm. Assim, foi possível observar neste primeiro momento a partir dos espectros de <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR, que houve formação de complexos supramoleculares com  $\beta$ cd e IVR, resultando em alterações nas densidades eletrônicas dos núcleos de hidrogênio e carbonos envolvidos nas interações e refletindo nos sinais captados nos espectros. Contudo, este estudo se concentrou na análise estrutural de um polímero bastante promissor no meio acadêmico e também do ponto de vista industrial e de saúde, para uma futura aplicação em detecção de IVR em matrizes complexas como o leite bovino.

*Palavras-chave: deslocamento químico; ácido 10,12-pentacosadiinóico; complexos supramoleculares;  $\beta$ -ciclodextrina.*

### 1. Introdução

Um dos elementos de maior importância para análise molecular, são as características estruturais e a conformação da molécula estudada. Neste sentido a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) é uma das técnicas mais essenciais e úteis para identificação estrutural de compostos (YAO et al., 2021).

Resumidamente, NMR refere-se à espectroscopia de absorção produzida por um núcleo atômico em um campo magnético externo após absorver ondas eletromagnéticas de um nível de spin para outro. A absorção representa a informação estrutural em termos dos núcleos

individuais e seu entorno e assim, pode ser detectado e analisado como deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) e acoplamento de spin (YAO et al., 2021).

A técnica de NMR pode ser aplicada ao estudo de vesículas de ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) de várias maneiras. A espectroscopia NMR de prótons ( $^1\text{H}$  NMR) pode ser usada para determinar a composição química da membrana da vesícula e para monitorar mudanças na estrutura da membrana durante a interação com outras moléculas, ou ainda, durante processos de fusão ou fragmentação das vesículas. Ao passo que, o NMR de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR) pode fornecer informações sobre a estrutura local dos lipídios na membrana da vesícula (KIM, HONG, LEE, 2021; MOREIRA et al., 2018).

Para se fazer uso de PCDA como uma aplicação de detecção, devem ser introduzidos receptores na superfície da vesícula, que permitam a interação ligante-receptor com substâncias alvos específicas. (KIM; HONG; LEE, 2021). Neste estudo, o receptor escolhido foi a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta\text{cd}$ ), por suas características únicas em formar complexos com os mais variados tipos de moléculas.

Atualmente muito se tem falado em segurança alimentar e os consumidores estão cada vez mais informados e atentos aos produtos que levam para suas casas. A ivermectina (IVR), um antiparasitário de amplo espectro, tem sido amplamente utilizado para tratamento de bovinos por ter potente atividade anti-helmíntica e inseticida (MOREIRA et al., 2018). Um problema associado ao uso da IVR é a permanência de seus resíduos nos tecidos dos animais e consequentemente no leite, representando assim, risco potencial à saúde pública e por consequência indesejáveis pelos consumidores (CHEIBUB; LYRA; NETTO, 2019).

O presente estudo se concentrou na investigação por NMR de sistemas compostos PCDA/ $\beta\text{cd}$ /IVR e suas conjugações. Portanto, o objetivo principal foi investigar a possibilidade do complexo PCDA/ $\beta\text{cd}$  ser utilizado como sensor colorimétrico para detecção de IVR em amostra sintética e futuramente em matrizes complexas como o leite bovino. E por fim, agregar conhecimento teórico sobre as mudanças estruturais sofridas por esses sistemas durante a interação.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material**

O ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA, 97% em massa), precursor do PDA, o poli(óxido de etileno)- poli(óxido de propileno)- poli(óxido de etileno), copolímero Tribloco L64 [(EO)<sub>13</sub>(PO)<sub>30</sub>(EO)<sub>13</sub>], com massa molar média ( $M_m$ ) de  $2900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , a

$\beta$ -ciclodextrina e a Ivermectina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Os filtros para seringa (PVDF 25mm 0,45 $\mu$ m) BioNaky foram adquiridos da Forlab Express.

## 2.2. Ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) funcionalizado com $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd)

Sistemas PCDA/ $\beta$ cd e foram preparados seguindo metodologia adaptada (DE SOUZA et al., 2016; REZENDE et al., 2017) O L64 foi solubilizado em água na concentração de 1% (m/m). Posteriormente, o PCDA (1 mmol L<sup>-1</sup>) e a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) (2 mmol L<sup>-1</sup>) foram dissolvidos nesta solução e sonicada por cerca de 6 a 10 minutos, e imediatamente filtrada em filtro PVDF. A suspensão então foi mantida durante 12 horas a 4°C, objetivando-se orientar os monômeros de PCDA para que a polimerização fosse promovida. A fotopolimerização foi realizada expondo as suspensões à radiação UV (254 nm) por 10 minutos.

## 2.3. Amostras analisadas

Um total de 7 amostras foram preparadas para a análise de NMR. A amostra 1 continha apenas o PCDA puro, e foi produzida conforme descrito no item 2.2, sem a etapa de funcionalização com a  $\beta$ cd. A amostra 2 e 3 foram preparadas  $\beta$ cd e IVR, respectivamente, em DMSO-*d*<sub>6</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, EUA) na concentração de 0,1 mmol L<sup>-1</sup>. A amostra 4 foi produzida conforme descrito no item 2.2. A amostra 5 tinha em sua composição  $\beta$ cd e IVR na proporção molar de 1:1. A amostra 6 se tratava da amostra de interesse, aquela na qual continha o sistema PCDA/ $\beta$ cd produzida como descrita no item 2.2, com o acréscimo de IVR em uma concentração de 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>. E por último, a amostra 7 foi produzida com a solução da amostra 1 acrescida de uma solução contendo IVR a uma concentração de 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>. O delineamento da composição das amostras usadas está descrito na Tabela 12.

Tabela 12 - Delineamento da composição das amostras analisadas no RMN.

Amostra	PCDA	$\beta$ cd	IVR	Estado	Padrão
1	x	-	-	Puro/solução	TSPD <sub>4</sub> e 10% D <sub>2</sub> O
2	-	x	-	Puro/pó	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> e TMS
3	-	-	x	Puro/Pó	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> e TMS
4	x	x	-	Mistura/Solução	TSPD <sub>4</sub> e 10% D <sub>2</sub> O
5	-	x	x	Mistura/Solução	TSPD <sub>4</sub> e 10% D <sub>2</sub> O
6	x	x	x	Mistura/Solução	TSPD <sub>4</sub> e 10% D <sub>2</sub> O
7	x	-	x	Mistura/Solução	TSPD <sub>4</sub> e 10% D <sub>2</sub> O

## 2.4. Resonância Magnética Nuclear - $^1\text{H}$ -NMR

A análise de Resonância Magnética Nuclear unidimensional  $^1\text{H}$  foi realizada em um equipamento Avance III HD (Bruker 600Hz). Para o  $^1\text{H}$ -NMR foram usadas as seguintes condições: tempo de relaxação (D1) de 500 ms, tempo de aquisição (AQ) de 3,9 s, Janela SWH de 14 ppm e pulso de 11,5  $\mu\text{s}$ .

## 2.5. Resonância Magnética Nuclear - $^{13}\text{C}$ -NMR

A análise de Resonância Magnética Nuclear unidimensional  $^{13}\text{C}$ , foi realizada em um equipamento Avance III HD (Bruker 600Hz). Para o experimento  $^{13}\text{C}$ -NMR foram usadas as seguintes condições: Tempo de relaxação (D1) de 2 s, tempo de aquisição (AQ) de 0,9 s, SFQ1 de 150,9 Hz (frequência do carbono), janela de 240 ppm e pulso de 11,25  $\mu\text{s}$ .

Todos os experimentos de NMR foram realizados no Laboratório de Resonância Magnética Nuclear da Empresa Instrumentação Agropecuária de São Carlos-SP.

## 2.6. Software de análise

Todos os dados de NMR foram processados e analisados utilizando o software MestRenova (versão 15,0, 1-35756) ©2024 Mestrelab Research S.L.

## 3. Resultados e Discussão

A NMR 1D (NMR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) é comumente usada na caracterização de polissacarídeos. Na maioria das situações, as regiões anoméricas da configuração  $\alpha$  aparecem em 5,1–5,8 ppm (próton anomérico) e 98–103 ppm (carbono anomérico), enquanto a configuração  $\beta$  corresponde relativamente a 4,3–4,8 ppm e 103–106 ppm em regiões anoméricas. No entanto, esta regra não se aplica a alguns monossacarídeos contendo constantes de acoplamento de prótons semelhantes. (YAO et al., 2021).

A análise do sistema composto por ácido 10,12-pentacosadiinóico/ $\beta$ -ciclodextrina/Ivermectina (PCDA/ $\beta$ cd/IVR), dos complexos separados (PCDA/ $\beta$ cd;  $\beta$ cd/IVR e PCDA/IVR) e dos materiais puros (PCDA;  $\beta$ cd e IVR) foram estudados por Ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$ -NMR e  $^{13}\text{C}$ -NMR e serão discutidos nas seções 3.1 e 3.2 a seguir.

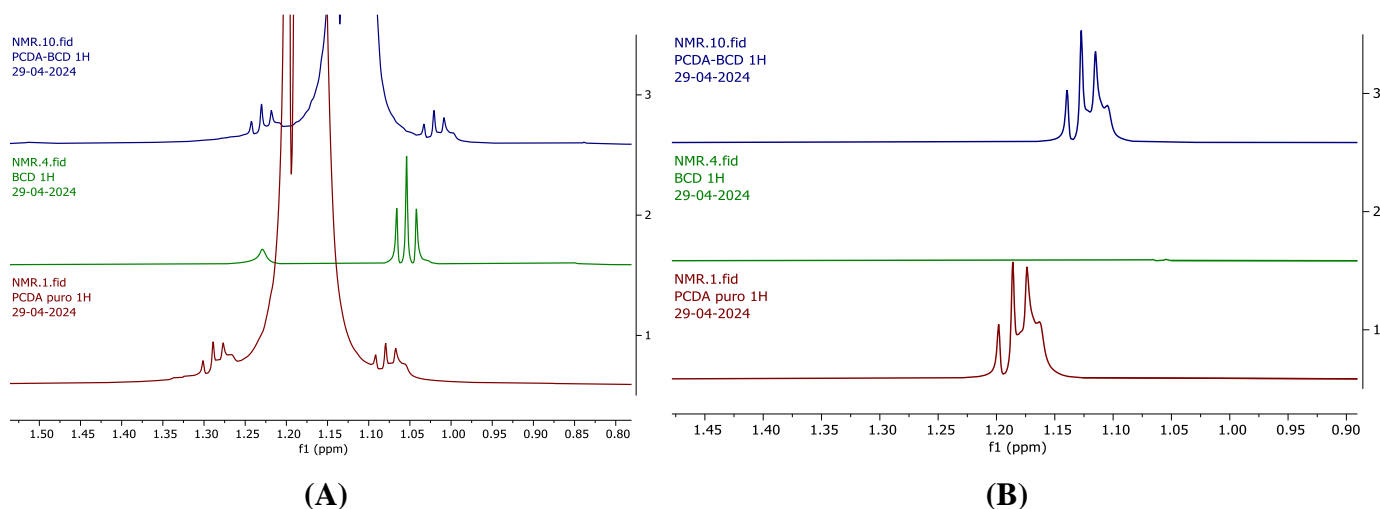
### 3.1. Resonância Magnética Nuclear – $^1\text{H}$ -NMR

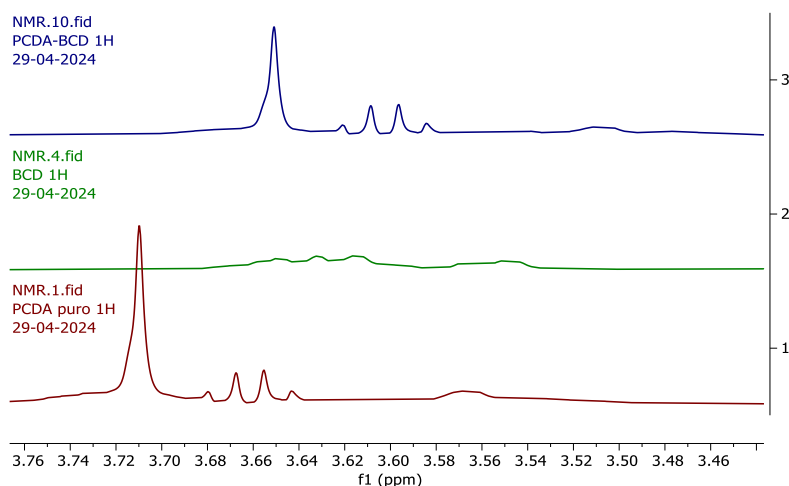
A espectroscopia de  $^1\text{H}$ -NMR, é um método adequado para a avaliação de interações não covalentes em nível molecular (CHO et al., 2014) e pode ser usada para determinar a composição química da membrana da vesícula e para monitorar mudanças na estrutura da

membrana durante a interação com outras moléculas, ou ainda, durante processos de fusão ou fragmentação das vesículas (KIM, HONG, LEE, 2021; MOREIRA et al., 2018).

No caso do sistema estudado, no sistema formado por ácido 10,12-pentacosadiinóico/ $\beta$ -ciclodextrina (PCDA/ $\beta$ cd), alguns picos foram deslocados para baixo. O tripleto na estrutura do PCDA puro que antes tinham sinais em 1,09; 1,07 e 1,06 ppm, foram deslocados para 1,03; 1,02 e 1,01 ppm no complexo PCDA/ $\beta$ cd (Figura 34-A). Dois outros deslocamentos principais puderam ser notados, os picos que ante no PCDA tinham sinais na faixa de 1,19-1,17 ppm, no conjugado aparece na faixa de 1,13-1,11 ppm (Figura 34-B). Por fim, um deslocamento na faixa de 3,67 à 3,64 ppm, referentes a 4 sinais no PCDA, deslocaram-se para a faixa de 3,62 à 3,58 ppm (PCDA/ $\beta$ cd), ao passo que um maior sinal também foi detectado à 3,70 ppm e deslocou-se para 3,65 ppm (Figura 34-C).

Figura 34 – Espectros  $^1\text{H-NMR}$ : (A) Comparação dos espectros de PCDA (vermelho),  $\beta$ cd (verde) e do complexo PCDA/ $\beta$ cd (azul) mostrando o deslocamento do tripleto (1,09; 1,07 e 1,06 ppm no PCDA) para 1,03; 1,02 e 1,01 ppm no complexo PCDA/ $\beta$ cd; (B) Comparação do deslocamento em 1,19-1,17 ppm para 1,13-1,11 ppm no complexo e (C) Deslocamento na faixa de 3,67 à 3,64 e 3,70 ppm, referentes a 4 sinais no PCDA para 3,62 à 3,58 e 3,65 ppm (PCDA/ $\beta$ cd).





(C)

Fonte: Do Autor (2024).

O complexo PCDA/ $\beta$ cd apresenta alteração de desvio químico inferior 0,1 ppm, em alguns casos, inferior a 0,05 ppm. Estes resultados sugerem que a  $\beta$ cd perturba a organização da estrutura vesicular automontada pela complexação de ambas as moléculas.

De acordo com Cho et al., (2014), em lipossomas de PCDA densamente compactados, a distância intercadeias das supramoléculas de PCDA é de aproximadamente 0,5 nm; A luz UV inicia um processo de polimerização radical, resultando em lipossomas PDA profundamente coloridos. Os átomos de carbono reagentes devem estar a menos de 0,5 nm de distância um do outro, ou não é provável que ocorra polimerização. Consequentemente, se a  $\beta$ cd perturba a estrutura ordenada do lipossoma DA por solubilização devido à complexação com DA, o processo de polimerização naquele ponto pode ser inibido.

O surgimento de novos picos não foram notados, o que nos leva a presumir que a extensão da perturbação causada apesar de presente, provavelmente não será suficiente para ocasionar um aumento da dinâmica da membrana e alterações na conformação do PCDA a ponto de resultar na mudança cromática do sistema.

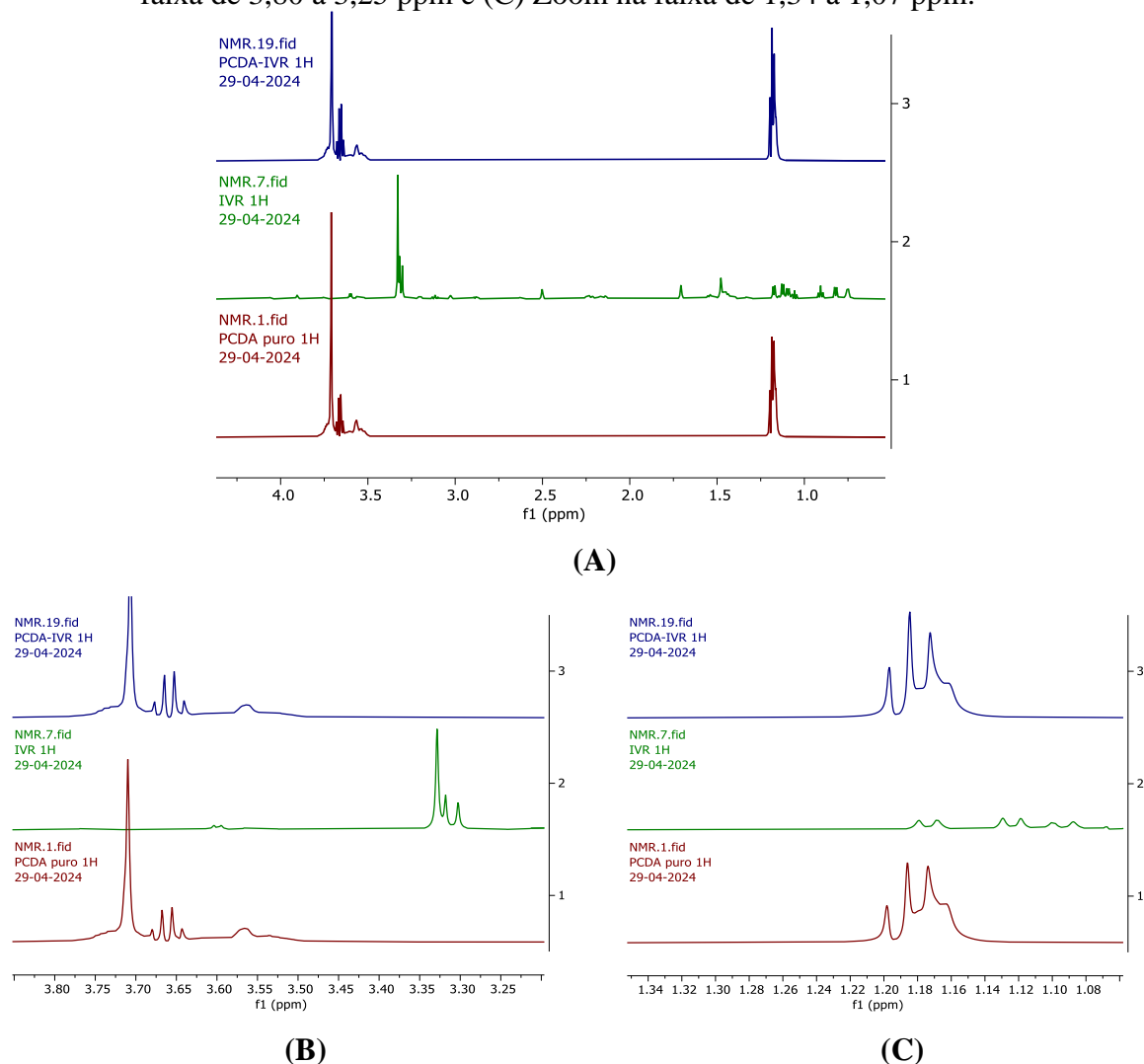
A formação de complexos supramoleculares com ciclodextrinas gera alterações na densidade eletrônica dos núcleos de hidrogênio envolvidos nas interações, o que se reflete nos espectros de NMR como alterações de deslocamentos químico ou extensão dos picos (BITTENCOURT et al., 2019).

Na Figura 35, pode-se observar que nenhum desvio aparente foi notado para a amostra que continha PCDA/Ivermectina (IVR), portanto nos fornecendo suporte para constatar que a

IVR sozinha não provoca nenhuma alteração na estrutura molecular do PCDA, ou seja, as espécies apenas coexistem dentro do sistema.

Portanto, a necessidade de usar um intermediário no processo. Esse intermediário, a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd), como já discutido, interage com a bicamada lipídica do sem provocar perturbação suficiente ao sistema que possa causar mudança cromática. Provavelmente a superfície interna apolar forma complexos de inclusão estabilizados por interações não covalentes com uma parte do PCDA e da Ivermectina (MOREIRA et al., 2018).

Figura 35 - Espectros  $^1\text{H-NMR}$  de comparação dos espectros de PCDA (vermelho), IVR (verde) e da amostra contendo PCDA/IVR (azul); (A)  $^1\text{H-NMR}$  completo; (B) Zoom na faixa de 3,80 à 3,25 ppm e (C) Zoom na faixa de 1,34 à 1,07 ppm.

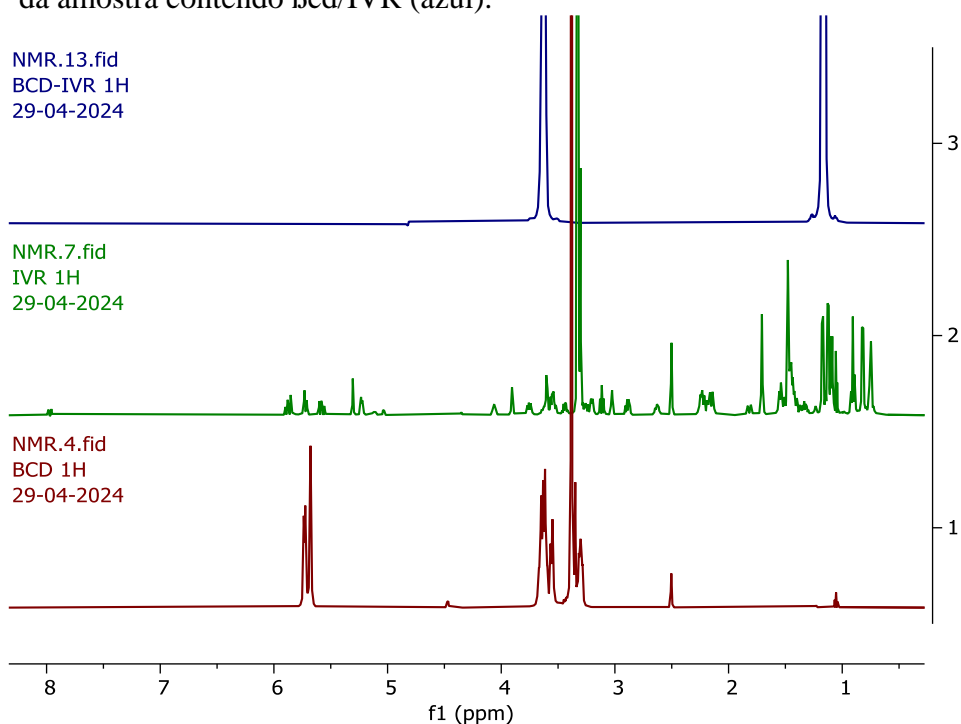


Fonte: Do Autor (2024).

Por esta razão, o  $^1\text{H-NMR}$  foi utilizado também como tentativa de obtenção de evidências sobre os modos de interação da IVR com a cavidade hidrofóbica da  $\beta$ cd (Figura 36).

Devido à complexidade estrutural da IVR, a atribuição dos sinais de  $^1\text{H-NMR}$  das moléculas livres foi realizada utilizando dados da literatura, conforme sugerido por Moreira et al., (2018).

Figura 36 - Espectros  $^1\text{H-NMR}$  de comparação dos espectros da  $\beta\text{cd}$  (vermelho), IVR (verde) e da amostra contendo  $\beta\text{cd/IVR}$  (azul).

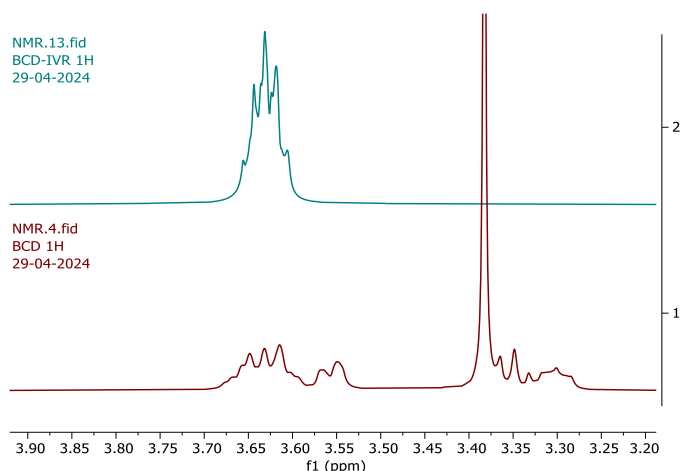


Fonte: Do Autor (2024).

A análise dos picos mostra diversas mudanças nos deslocamentos químicos de  $\beta\text{cd}$  complexada com IVR como resultado de novas interações intermoleculares (Figura 37). Segundo Bittencourt et al., (2019) e Moreira et al., (2018), as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da  $\beta\text{cd}$  no sistema  $\beta\text{cd/IVR}$  sugerem o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares em uma montagem supramolecular.

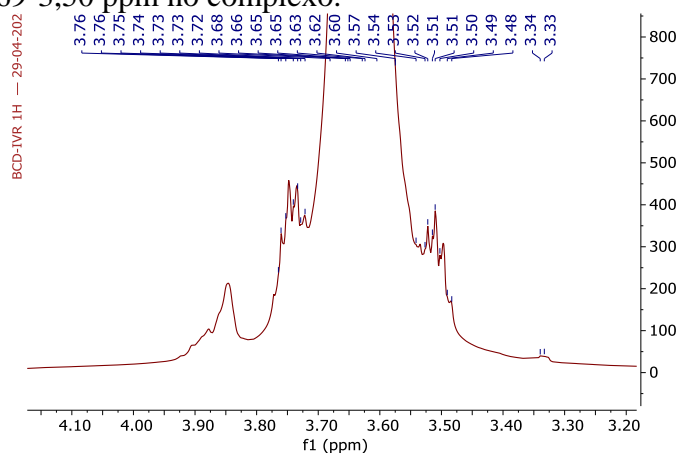
Alguns deslocamentos químicos puderam ser notados em relação aos multipletos referentes a CH e  $\text{CH}_2$  em uma faixa de 3,90 à 3,30 ppm (Figura 38). Devido à sobreposição de sinais com a IVR, alguns deslocamentos importantes não puderam ser identificados. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura (CHO et al., 2014; CHOLLI; SANDMAN; MAAS, 1999; MOREIRA et al., 2018).

Figura 37 - Espectros  $^1\text{H-NMR}$  de comparação dos espectros da  $\beta\text{cd}$  (vermelho) e do complexo  $\beta\text{cd/IVR}$  (verde tiffany) mostrando os principais deslocamentos na faixa de 3,25 à 3,70 ppm.



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 38 - Espectros  $^1\text{H-NMR}$  do complexo  $\beta\text{cd/IVR}$  mostrando deslocamentos químicos em relação aos multipletos referentes a  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_2$  em uma faixa de 3,90 à 3,30 ppm; valores de referência: deslocamentos químicos de 3,36-3,29 ppm no  $^1\text{H-NMR}$  da  $\beta\text{cd}$  para 3,69-3,50 ppm no complexo.

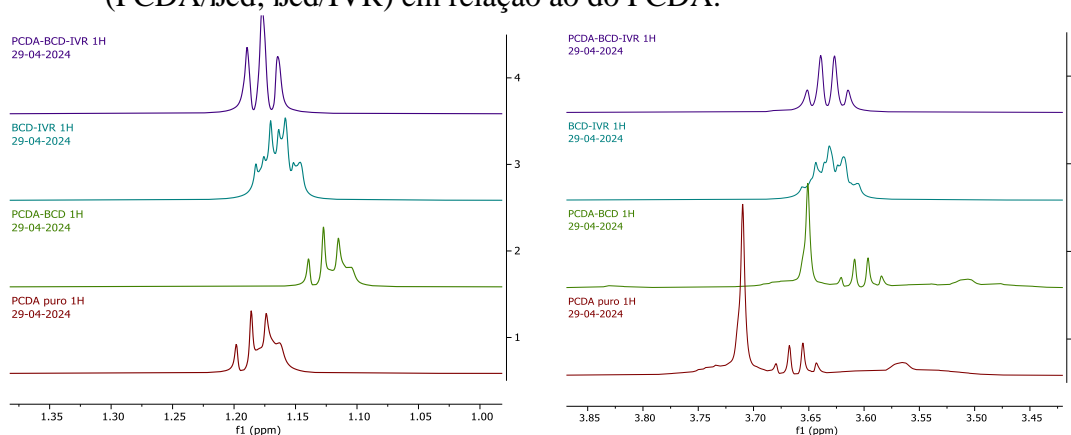


Fonte: Do Autor (2024).

A análise do  $^1\text{H-NMR}$  do sistema  $\text{PCDA}/\beta\text{cd}/\text{IVR}$  por fim, mostra diferenças significativas nos deslocamentos químicos e na estrutura molecular dos sistemas estudados ( $\text{PCDA}/\beta\text{cd}$ ;  $\beta\text{cd}/\text{IVR}$ ) em relação ao  $^1\text{H-NMR}$  do  $\text{PCDA}$  puro (Figura 39).

A formação de complexos supramoleculares com ciclodextrina gera alterações na densidade eletrônica dos núcleos de hidrogênio envolvidos nas interações, o que se reflete nos espectros de NMR como alterações de deslocamentos químicos ou extensão dos picos (BITTENCOURT et al., 2019).

Figura 39 -  $^1\text{H-NMR}$  do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR comparado ao dos complexos estudados (PCDA/ $\beta$ cd;  $\beta$ cd/IVR) em relação ao do PCDA.



Fonte: Do Autor (2024).

A partir da Figura 39, podemos observar que um quadrupeto no  $^1\text{H-NMR}$  do PCDA puro se torna um triplete no  $^1\text{H-NMR}$  do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR. Quando observamos um sinal de NMR, ele pode ser classificado com base na multiplicidade das linhas. Um quadrupeto é um sinal que possui quatro linhas igualmente espaçadas (em alguns casos, como neste estudo, essas linhas apesar de não serem igualmente espaçadas sabemos que se trata de um quadrupeto com base nas estruturas químicas estudadas e devido a faixa em que os sinais ocorreram. Isso ocorre quando um núcleo está acoplado a três núcleos vizinhos equivalentes. Em contrapartida, um triplete tem três linhas igualmente espaçadas e ocorre quando um núcleo está acoplado a dois núcleos vizinhos equivalentes (BERTINI; LUCHINAT; PARIGI, 2002; YAO et al., 2021)

Desta forma, um quadrupeto se tornando um triplete no  $^1\text{H-NMR}$  ocorre quando há uma alteração na conectividade dos núcleos vizinhos, afetando o padrão de acoplamento observado no espectro (BERTINI; LUCHINAT; PARIGI, 2002).

Sinais apresentados de grupos, como  $\text{CH}_3\text{COO-}$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_3$ , podem ser revelados no espectro  $^1\text{H}$ . Os deslocamentos químicos dos prótons, especialmente dos prótons adjacentes, sofrem uma ligeira alteração se contiverem grupos funcionais, como grupo O-acetil (+0,3–0,5 ppm), grupo O-alquil (-0,2–0,3 ppm), grupo fosfato (+ 0,3–0,5 ppm) e grupo O-sulfato (+0,4–0,8 ppm) (YAO et al., 2021).

Segundo Goyal; Sharma & Kumar, (2024) os múltiplos picos entre 1,23 à 1,82 ppp estão relacionados ao grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) da cadeia de hidrocarbonetos do PCDA. Valores semelhantes foram encontrados em neste estudo, sendo a faixa de múltiplos picos na faixa de 1,16 à 1,82. Os picos em 2,17 e 2,24 ppm os autores fazem a correspondência ao grupo metileno

adjacente ao grupo alcino ( $-C\equiv$ ) e ao grupo carboxílico, respectivamente. Esses dados também se assemelham aos obtidos neste estudo (2,16 e 2,23 ppm, respectivamente).

Ao comparar o espectro do PCDA ao do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR podemos observar pequenos deslocamentos em todos os picos já mencionados. Entretanto o pico em 2,16 ppm se deslocou e o pico em 2,23 ppm antes simples, se tornou duplo. Diferenças nos valores de deslocamento químico podem ser atribuídas aos maiores efeitos de desproteção resultantes do aumento da influência eletronegativa de átomos de oxigênio adicionais após a funcionalização e exposição a IVR.

A análise de  $^1H$ -NMR deste sistema ainda tem muitos pontos a serem explorados além dos deslocamentos químicos aparentes, como a integração dos picos e a multiplicidade dos mesmos com base na estrutura química dos compostos estudados. Porém, é possível concluir que há mudança nos deslocamentos químicos no sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR e alteração na conectividade dos núcleos vizinhos, o que sugere que após o contato com a Ivermectina, a estrutura molecular do sistema se reorganizou e formou novas ligações.

### 3.2. Ressonância Magnética Nuclear $^{13}C$ -NMR

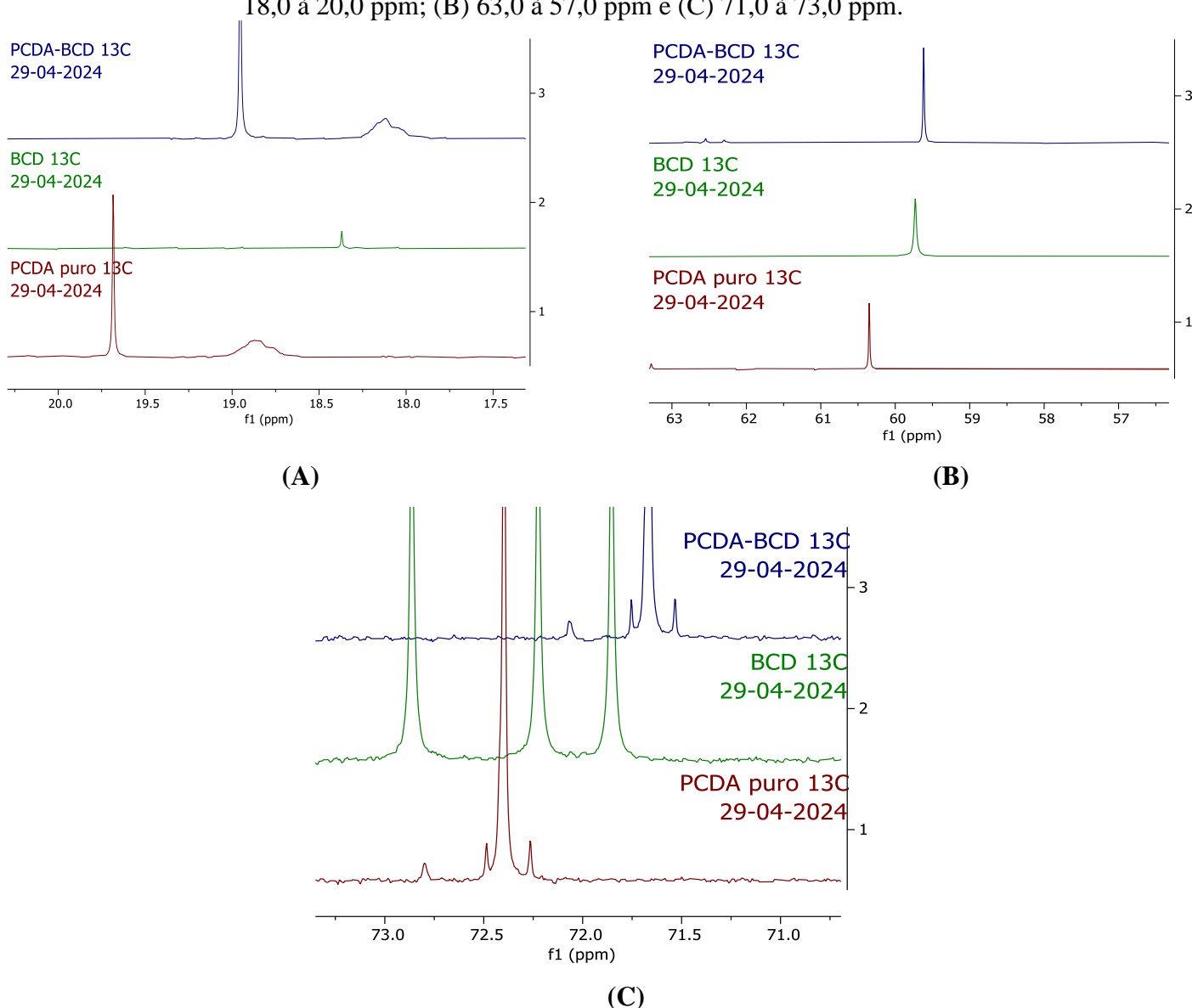
Em geral, os deslocamentos químicos de  $^{13}C$  dos carbonos acetilênicos são sensíveis ao comprimento da cadeia conjugada e as deformações mecânicas nesses carbonos, ou seja, cadeias conjugadas mais longas e acetilenos mais densos são deslocados para baixo. Além disso, o NMR de carbono-13 ( $^{13}C$ -NMR) pode fornecer informações sobre a estrutura local dos lipídios na membrana da vesícula (KIM, HONG, LEE, 2021; MOREIRA et al., 2018).

A análise do complexo PCDA/ $\beta$ cd foi avaliada foram observadas diferenças de desvios químicos ao longo de diversos sinais nos espectros de  $^{13}C$ -NMR do complexo, em comparação com os dos componentes livres. Isso indica que o sinal do PCDA é afetada pela complexação.

Os deslocamentos químicos dos polissacarídeos são mais amplos para espectros de  $^{13}C$ -NMR, variando de 0 a 180 ppm. Os deslocamentos químicos de C2–C6 variam de 57 ppm a 87 ppm. Semelhante à  $^1H$ -NMR, a substituição de grupos funcionais influencia o deslocamento químico do carbono adjacente, como grupo O-acetil (+ <3 ppm), grupo O-alkil (+7–10 ppm para anômero  $\alpha$  e + 0,9 – -4,6 ppm para  $\beta$ -anômero), grupo fosfato (+2–3 ppm) e grupo O-sulfato (+6–10 ppm) (LUDWIG; VIANT, 2010; YAO et al., 2021).

A Figura 40 mostra esses deslocamentos observados em 19,68 ppm no PCDA para 18,95 no PCDA/ $\beta$ cd (Figura 40 -A); de 60,36 para 59,62 ppm (Figura 40-B); de um tripleto com pico central em 72,40 para 71,67 ppp e um outro sinal em 72,80 para 72,06 ppm (Figura 40-C).

Figura 40 - Espectros  $C^{13}$ NRM do complexo PCDA/ $\beta$ cd e suas espécies puras na faixa de: (A) 18,0 à 20,0 ppm; (B) 63,0 à 57,0 ppm e (C) 71,0 à 73,0 ppm.

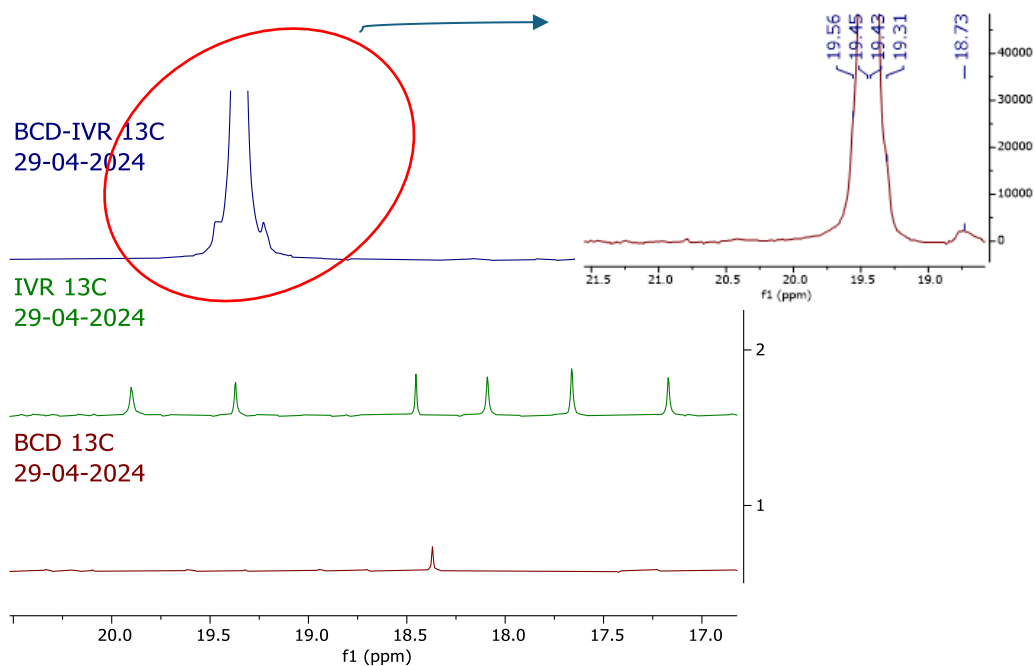


Fonte: Do Autor (2024).

Para o complexo  $\beta$ cd/IVR, o que se observa é um evento pouco típico, onde há vários sinais relacionados a compostos alifáticos em que nenhum deles aparece, ao invés disso, um sinal aparece com picos localizados em 19,56; 19,45; 19,43 e 19,31 ppm (Figura 41).

Os carbonos alifáticos na cadeia principal do PCDA apresentam deslocamentos químicos entre 25 e 35 ppm, típicos de ligações C-H e C-C simples. Os átomos nas posições 10 e 12, próximos às ligações duplas, apresentam deslocamentos químicos mais baixos, na faixa de 120 a 130 ppm, devido à maior desblindagem eletrônica.

Figura 41 - Espectros  $C^{13}$ NRM do complexo  $\beta$ cd/IVR e das espécies puras de  $\beta$ cd e IVR.

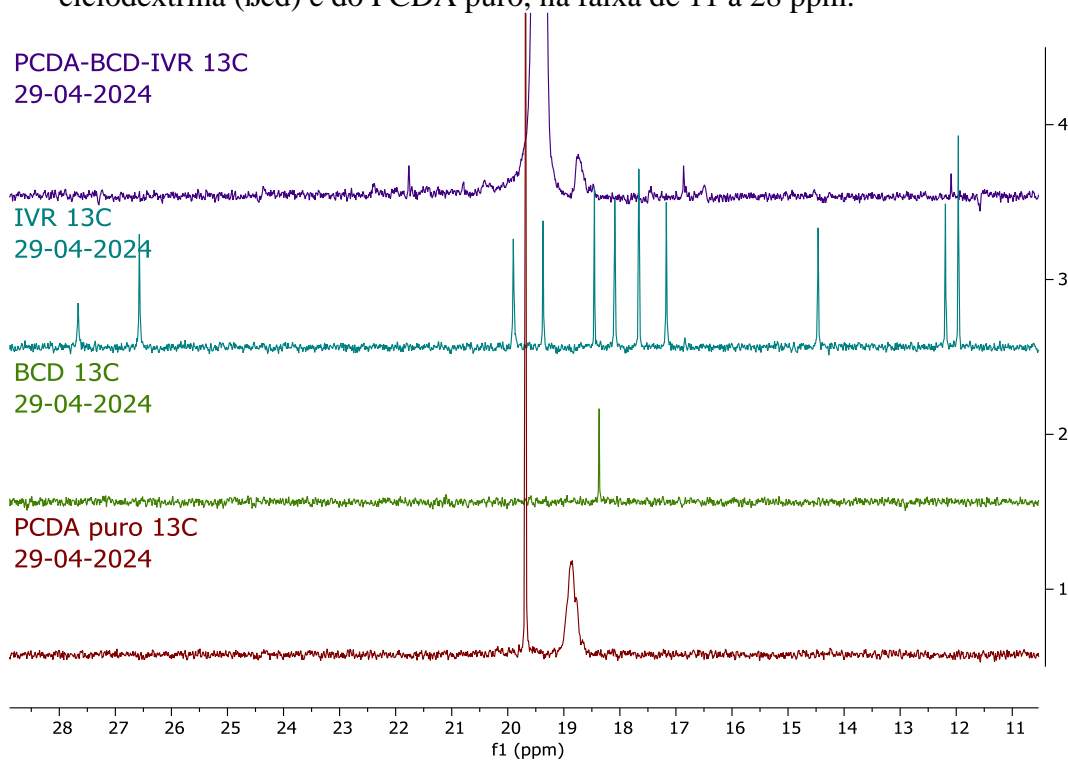


Fonte: Do Autor (2024).

Ao compararmos os espectros  $C^{13}$ NRM do PCDA e do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR, observa-se que devido a funcionalização e exposição à IVR, é compreensível que alguns picos adicionais possam surgir devido ao aumento do número de carbonos no PCDA funcionalizado, e um novo pico apareceu para o sistema em 83,67 e 105,2 ppm. Também é observado o surgimento de um pico largo em 70,28 ppm sobrepondo sinais visualizados no espectro do PCDA (Figura 42-44). Esses resultados confirmam ainda mais a síntese, funcionalização e interação com a IVR.

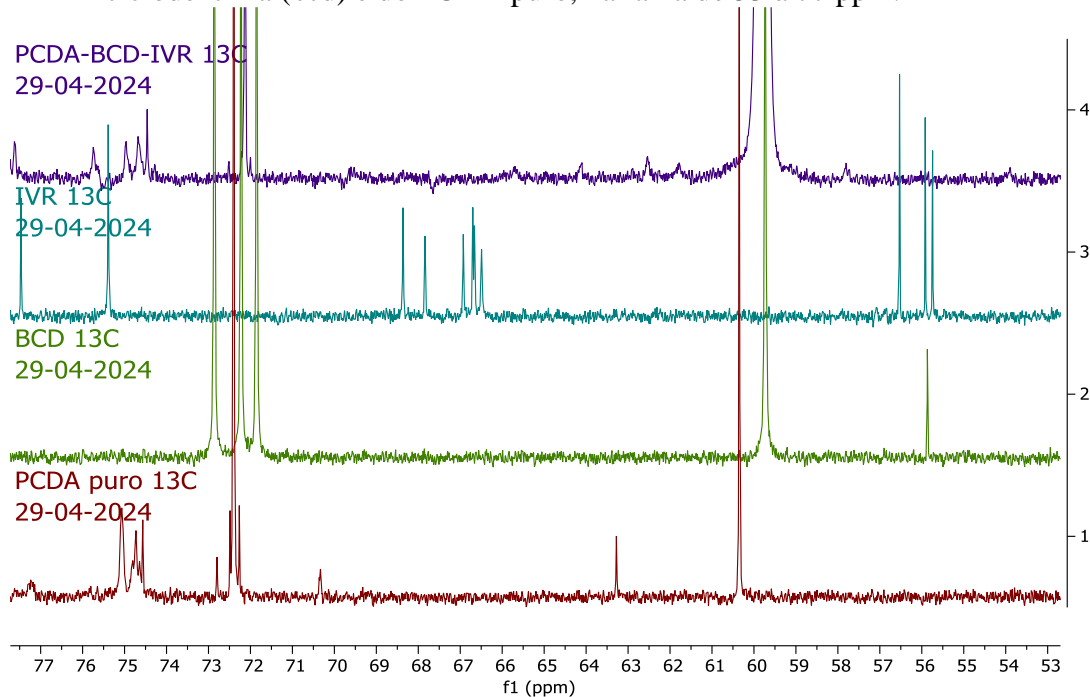
Por fim, os deslocamentos químicos observados nos espectros NMR de  $^{13}C$  dos carbonos acetilênicos são sensíveis ao comprimento da cadeia conjugada e as deformações mecânicas nesses carbonos, ou seja, cadeias conjugadas mais longas e acetilenos mais densos são deslocados para baixo (KIM, HONG, LEE, 2021; MOREIRA et al., 2018).

Figura 42 - Espectros  $C^{13}$ NRM do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR, da Ivermectina (IVR), da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) e do PCDA puro, na faixa de 11 à 28 ppm.



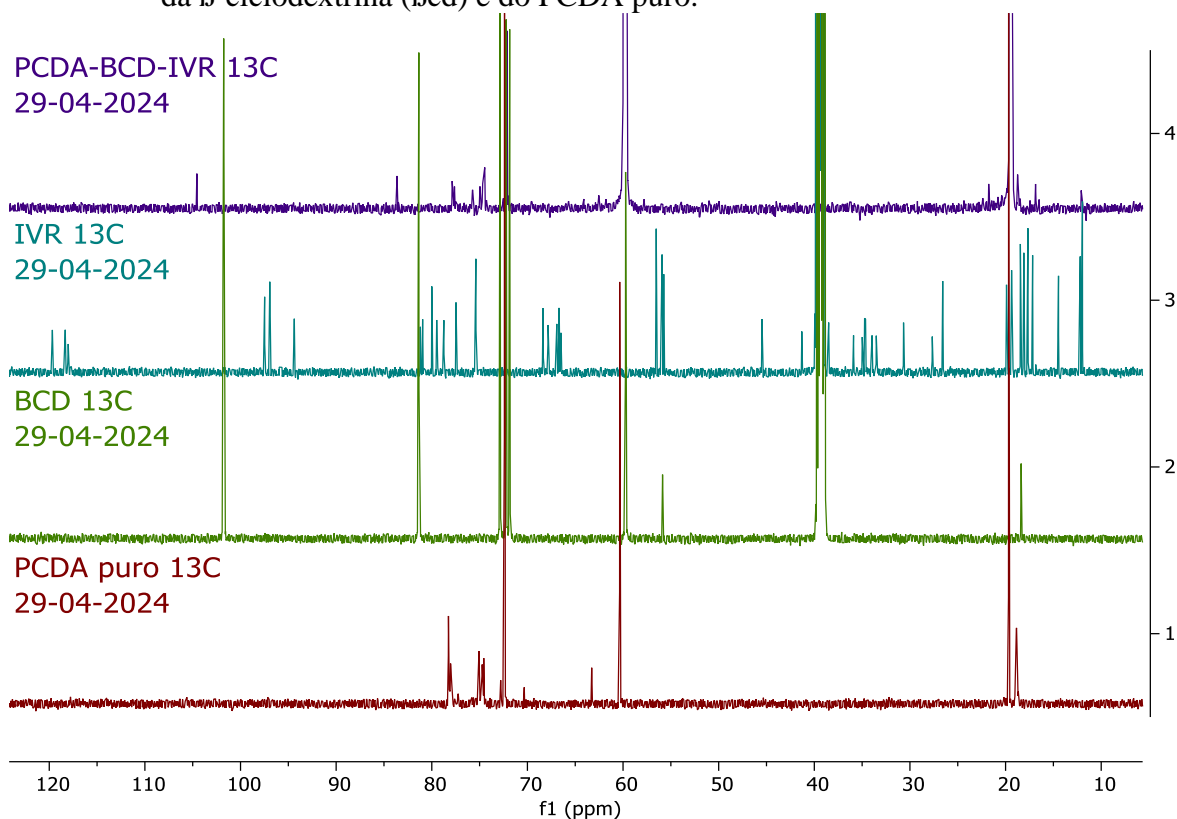
Fonte: Do Autor (2024).

Figura 43 - Espectros  $C^{13}$ NRM do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR, da Ivermectina (IVR), da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) e do PCDA puro, na faixa de 53 à 77 ppm.



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 44 – Espectros  $C^{13}$ NRM completo, do sistema PCDA/ $\beta$ cd/IVR, da Ivermectina (IVR), da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ cd) e do PCDA puro.



Fonte: Do Autor (2024).

#### 4. Conclusões

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) se mostra essencial para identificação estrutural de moléculas. Foi possível observar neste primeiro momento a partir dos espectros de  $^1\text{H}$ -NMR e  $^{13}\text{C}$ -NMR, que houve formação de complexos entre PCDA e  $\beta$ cd,  $\beta$ cd e IVR, resultando em alterações nas densidades eletrônicas dos núcleos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  envolvidos nas interações e refletindo nos sinais captados nos espectros.

No caso de sistemas conjugados, o  $^{13}\text{C}$ -NMR é particularmente útil para identificar ligações duplas e triplas, além de determinar o extensão da conjugação. As mudanças nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono em comparação com compostos alifáticos simples são indicadores da conjugação e da hibridização dos átomos de carbono.

Os deslocamentos químicos dos prótons H dos grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) adjacentes ao grupo carbonílico ( $\text{C}=\text{O}$ ) apresentam valores mais baixos em comparação com os demais prótons H da cadeia alquílica. Isso se deve à desblindagem magnética induzida pelo grupo carbonílico. Os deslocamentos químicos dos prótons H dos grupos glicosídicos ( $\text{CH}_2$ ) dentro da cavidade da ciclodextrina apresentam valores distintos em comparação com os prótons H

dos grupos glicosídicos na superfície externa da molécula. Isso reflete a diferença no ambiente químico dos prótons dentro e fora da cavidade.

A análise detalhada dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento heteronuclear ainda precisam ser estudadas uma vez que fornecem informações mais detalhadas sobre a estrutura molecular, a geometria e a interação entre os átomos, permitindo a identificação de características estruturais importantes e a distinção entre compostos semelhantes.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de doutorado (processo 140040/2021-8), à Universidade Federal de São João Del Rei juntamente ao Grupo de Pesquisa de Nanotecnologia em Bioprocessos (NANOTEC) e à Embrapa Instrumentação de São Carlos – SP pelo apoio técnico-científico envolvendo a análise de NMR. E por fim, os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fornecimento dos equipamentos.

### **Referências Bibliográficas**

BERTINI, I.; LUCHINAT, C.; PARIGI, G. Magnetic susceptibility in paramagnetic NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 249–273, 2002.

BITTENCOURT, V. C. E. et al. Hydrophobic nanoprecipitates formed by benzoylphenylureas and  $\beta$ -cyclodextrin inclusion compounds: synthesis, characterization and toxicity against aedes aegypti larvae. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 1–12, 2019.

CHEIBUB, A. M. de S. S.; LYRA, E. S. B. De; NETTO, A. D. P. Development and validation of a method for simultaneous determination of trace levels of five macrocyclic lactones in cheese by HPLC-fluorescence after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. March 2018, p. 148–156, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.027>>

CHO, E. et al. Liposome solubilization induced by complexation with dimeric  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 80, n. 3–4, p. 427–435, 2014.

CHOLLI, A. L.; SANDMAN, D. J.; MAAS, W. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift nonequivalences in a polydiacetylene crystal. **Macromolecules**, [s. l.], v. 32, n. 13, p. 4444–4446, 1999.

DE SOUZA, L. C. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as a sensor for micellar casein: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 841–847, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.071>>

GOYAL, S.; SHARMA, D.; KUMAR, K. Synthesis of low-temperature irreversible thermochromic indicator based on functional polydiacetylene for food storage applications. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 59, n. 17, p. 7561–7573, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10853-024-09637-x>>

KIM, C.; HONG, C.; LEE, K. Structures and strategies for enhanced sensitivity of polydiacetylene(PDA) based biosensor platforms. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 181, n. October 2020, p. 113120, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113120>>

KIM, J. M. et al. Unique effects of cyclodextrins on the formation and colorimetric transition of polydiacetylene vesicles. **Macromolecular Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 206, n. 22, p. 2299–2306, 2005.

LUDWIG, C.; VIANT, M. R. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: Review of a key methodology in the metabolomics toolbox. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 22–32, 2010.

MOREIRA, A. M. et al. Hydrophobic Nanoprecipitates of  $\beta$ -Cyclodextrin/Avermectins Inclusion Compounds Reveal Insecticide Activity against *Aedes aegypti* Larvae and Low Toxicity against Fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 28, p. 7275–7285, 2018.

REZENDE, J. de P. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for the detection of native and free bovine serum albumin. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 70, p. 535–543, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.009>>

YAO, H. Y. Y. et al. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective. **Food Research International**, [s. l.], v. 143, n. February, p. 110290, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110290>>

**TERCEIRA PARTE**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compreender o mecanismo de mudança óptica do PCDA é essencial para realizar projetos de sensores com habilidades de detecção mais sensíveis e estáveis baseados neste material. Embora muitos estudos tenham sido conduzidos para descobrir o mecanismo das propriedades ópticas únicas do PCDA, o mecanismo exato não foi totalmente compreendido e como já mencionado neste estudo, ainda tem sido controverso. E a principal razão para isso é o fato de que muitos fatores podem fazer com que a estrutura de PCDA mude de conformação e como consequência, de coloração. O estado perturbado das ligações conjugadas é considerada a causa mais comumente aceita para justificar as características ópticas únicas deste material.

O aprimoramento e a validação do método são etapas importantíssimas quando se fala de sensores e é fundamental que outras abordagens de análises química como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sejam utilizadas para fins de validar o método, uma vez que é a técnica padrão adotada pelos órgãos reguladores com a finalidade de detecção de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino.

Neste sentido, estes estudos continuarão visando aplicação em matrizes complexas como o leite, foco inicial deste estudo. Processos adicionais serão requeridos para remover produtos químicos reativos residuais e receptores ilimitados. À exemplo, a maioria das vesículas de PCDA não modificadas são suspensas de forma estável em água destilada, mas a precipitação pode ocorrer em ambientes contendo sal. Visto que não apenas sal, mas também proteínas, como albumina, podem precipitar as vesículas de PCDA. Esse fenômeno deve ser considerado para uso em biossensores baseados em vesículas de PCDA, principalmente para amostras baseadas em tampão biológico.

Para evitar a sedimentação ou agregação das vesículas durante o processo de reação para introdução de receptores na vesícula de PCDA, as vesículas contendo os receptores podem ser preparadas misturando moléculas de receptor de diacetileno ligadas ao nível de monômeros com diacetileno monomérico antes da formação da vesícula, como realizado neste estudo. Neste caso, uma vez que a função do receptor deve ser mantida mesmo em uma temperatura relativamente alta durante a formação da vesícula, um aptâmero relativamente estável é preferível a um anticorpo que sofre desnaturação irreversível em alta temperatura. Por este motivo, optou-se neste estudo fazer uso da  $\beta$ -ciclodextrina como receptor.

O sistema como um todo ainda possui muitos gaps a serem solucionados, principalmente quando falamos de vesículas ocorrendo em solução aquosa. Para tentar solucionar alguns desses

gaps, uma opção razoável seria a imobilização desses sistemas em substrato 2D, como por exemplo papel. Vesículas fixadas ao substrato estará livre de problemas de agregação ou sedimentação e é vantajosa para quantificação de acordo com a intensidade do sinal.

É importante mencionar, que o diferencial da presente pesquisa é o fato de se buscar maneira alternativa as já existentes, para detecção de resíduos de ivermectina, visando uma futura aplicação em leite. A projeção de se utilizar um sensor colorimétrico imobilizado em papel, que através de um sistema RGB, possa ser utilizado diretamente a partir de imagens obtidas a partir do próprio smartphone.

Isso se faz necessário, uma vez que a investigação de métodos mais acessíveis para detectar resíduos de ivermectina é crucial por diversas razões. Entre elas podemos destacar a questão da saúde pública, uma vez que detectar resíduos dessa substância em alimentos é essencial para garantir a segurança do consumidor. Métodos mais baratos poderiam permitir testagens mais frequentes e abrangentes, reduzindo consideravelmente riscos à saúde. Já que os métodos de detecção tradicionais são caros e exigem equipamentos sofisticados.

Por fim, investir em alternativas mais econômicas permitiria testagens em larga escala, beneficiando não somente os consumidores, mas também a economia global. E, apesar de ainda haver muito a ser feito, acredita-se que este trabalho possa contribuir significativamente para os avanços nas pesquisas relacionadas ao uso de sistemas compostos por vesículas de PCDA/receptores, para detecção de inúmeras moléculas.