

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM APTÂMEROS DE DNA PARA  
DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS**

Alexandre Haruo Miyamoto Vieira  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020  
ALEXANDRE HARUO MIYAMOTO VIEIRA**

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM APTÂMEROS DE DNA PARA  
DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon

Coorientadores: Tiago Antônio de Oliveira Mendes  
Renata Pereira Lopes Moreira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V658o  
2020  
Vieira, Alexandre Haruo Miyamoto, 1992-  
Otimização de método baseado em aptâmeros de DNA para  
detecção de resíduos de antibióticos / Alexandre Haruo  
Miyamoto Vieira. – Viçosa, MG, 2020.  
58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.51-58.

1. Antibióticos. 2. Aptâmeros de nucleotídeos. 3. Produtos  
alimentícios. 4. Nanopartículas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 547.7

ALEXANDRE HARUO MIYAMOTO VIEIRA

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM APTÂMEROS DE DNA PARA  
DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Alexandre Haruo Miyamoto Vieira  
Autor

  
\_\_\_\_\_  
Andréa de Oliveira Barros Ribon  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família que sempre me ajudou e me apoiou em todas as minhas decisões.

À minha orientadora Dra. Andréa de Oliveira Barros Ribon e aos coorientadores Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes e Dra. Renata Pereira Lopes Moreira pela confiança, paciência e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. André Fernando de Oliveira, Dr. Álvaro Vianna N. de C. Teixeira e Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira pelo auxílio teórico e por ceder seus laboratórios e equipamentos quando foi necessário.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) e outros laboratórios que sempre estavam dispostos a me ajudar em tudo que precisiei.

À Universidade Federal de Viçosa e aos profissionais dos Departamento de Bioquímica (DBB) e Departamento de Química (DEQ).

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento desse projeto.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento ao longo dessa jornada.

## RESUMO

VIEIRA, Alexandre Haruo Miyamoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Otimização de método baseado em aptâmeros de DNA para detecção de resíduos de antibióticos.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Tiago Antônio de Oliveira Mendes e Renata Pereira Lopes Moreira.

A utilização de antimicrobianos nas cadeias produtoras de carne e leite pode deixar resíduos na matéria prima, comprometendo a qualidade do produto final e a saúde do consumidor. Os métodos analíticos acreditados para assegurar que os limites máximos de resíduos estejam dentro do requerido pela legislação são altamente sensíveis, mas dependem de equipamentos caros e mão de obra treinada. A tecnologia de aptâmeros é uma alternativa para o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a detecção de resíduos de antibióticos, metais e alérgenos em diferentes matrizes. Este trabalho teve por objetivos propor e otimizar um método colorimétrico e espectrofotométrico de detecção de ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e kanamicina em água e em matrizes alimentares por meio de aptâmeros já descritos na literatura. Nanopartículas de ouro foram sintetizadas pela redução por citrato em uma concentração de 10,33 nmol/L. Definiu-se a concentração de 50 mmol/L de NaCl para sua agregação, que foi confirmada por espectrofotometria e mudança de cor da solução de rosa para azul. Os aptâmeros AMP4, AMP17, CAM7, Ky2 e T20 foram adsorvidos à superfície das nanopartículas de ouro e determinou-se em 200 nmol/L a concentração necessária para protegê-las de agregação. A menor concentração de kanamicina testada e detectada pelos métodos colorimétrico e espectrofotométrico foi 0,125 µg/mL. Para os demais antibióticos, mudança da cor rosa para o azul foi visualizada no controle consistindo de nanopartículas, aptâmero e sal, diferentemente do esperado. As matrizes alimentares soro de leite, carne e ovo foram processadas de forma simples e rápida para utilização nos ensaios. Diluições de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  foram necessárias para evitar interferência da matriz no sistema, porém os testes foram inconclusivos devido à mudança de coloração nos tubos contendo nanopartículas, aptâmero e sal. Os resultados mostraram a necessidade de avaliar outros aptâmeros e melhorar o processamento das matrizes alimentares para a remoção de interferentes.

Palavras-chave: Antibióticos. Aptâmeros de nucleotídeos. Produtos alimentícios. Nanopartículas. Detecção.

## ABSTRACT

VIEIRA, Alexandre Haruo Miyamoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2020. **Optimization of a DNA aptamer-based method for antibiotic residue detection.** Advisor: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-advisors: Tiago Antônio de Oliveira Mendes and Renata Pereira Lopes Moreira.

The use of antimicrobials in meat and milk product chains can leave residues in their raw materials, compromising the quality of the end product and harming the consumer. The analytical methods accredited to ensure the maximum residue limits allowed within the legislation are highly sensitive but require expensive equipment and well-trained personnel. The aptamer technology is an alternative for the development of faster and more sensitive methods of antibiotics, metals, and allergens residue detection in different matrices. This work aimed to optimize colorimetric and spectrophotometric detections for ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, and kanamycin in water and in food matrices using aptamers already described in the literature. Gold nanoparticles were successfully synthesized by citrate reduction in a concentration of 10,33 nmol/L, and 50 mmol/L of NaCl was defined as the concentration for aggregation, which was confirmed by spectrophotometry and color change of the solution. The aptamers AMP4, AMP17, CAM7, Ky2, and T20 were adsorbed on the surface of the gold nanoparticles and 200 nmol/L was determined as the concentration to prevent aggregation. The lowest concentration of kanamycin tested by the colorimetric and spectrophotometric methods was 0,125 µg/mL. Unexpectedly, for the other antibiotics, a change from pink to blue was seen in the control consisting of nanoparticles, aptamer, and salt. Food matrices (milk serum, meat, and egg) were processed in a simple and fast way for use in the tests but dilutions from  $10^{-3}$  to  $10^{-6}$  were necessary to avoid interference in the system. However, the tests were inconclusive due to the color change in the tubes containing nanoparticles, aptamer, and salt. The results showed the need to evaluate other aptamers and improve the processing of food matrices to better remove interferents.

Keywords: Antibiotics. Nucleotide aptamers. Food products. Nanoparticles. Detection.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Problemática dos antibióticos .....	9
2.2. aptâmeros de ácidos nucleicos .....	14
2.3. Nanopartículas de ouro .....	15
3. OBJETIVOS .....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1. Reagentes .....	20
4.2. aptâmeros .....	20
4.3. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro .....	21
4.4. Adsorção dos aptâmeros às nanopartículas de ouro.....	22
4.5. Determinação da concentração de sal .....	22
4.6. Determinação da concentração de aptâmeros .....	22
4.7. Teste colorimétrico em matriz aquosa .....	23
4.8. Preparo das matrizes alimentares .....	23
4.9. Testes de diluição das matrizes alimentares.....	24
4.10. Testes colorimétricos de identificação de antibióticos nas matrizes alimentares .....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro .....	25
5.2. Determinação da melhor concentração de NaCl.....	25
5.3. Determinação da melhor concentração de aptâmero.....	26
5.4. Testes colorimétricos em água .....	28
5.5. Testes colorimétricos em matrizes alimentares.....	31
5.5.1. Soro de leite .....	38
5.5.2. Ovo.....	41
5.5.3. Extrato de carne.....	43
6. DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÕES .....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Antimicrobianos são usados na medicina veterinária não somente para o tratamento de doenças infecciosas, mas também como promotores de crescimento animal, prática responsável por mais da metade dos antimicrobianos comercializados no mundo. Entre os problemas associados a esse uso estão a contaminação de águas e solo e a constante ameaça à saúde humana, uma vez que a pressão contínua da utilização de antimicrobianos seleciona bactérias resistentes que podem ser transmitidas dos animais para os homens. Outro agravante é que o uso dos antimicrobianos na pecuária pode deixar resíduos em alimentos como carne, leite e ovo, especialmente se o prazo de carência para a comercialização não for observado ou se a dose administrada for maior do que a necessária.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) é uma iniciativa do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para promover a segurança dos produtos de origem animal no país. Dele fazem parte Instruções Normativas como a IN nº 20, de 26 de julho de 2018, que estabelece limites máximos de resíduos de antibióticos presentes em produtos de origem animal, como carne, leite, mel e ovos. No Brasil, os limites aplicados são os sugeridos pelo *Codex Alimentarius*, um programa da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) que determina as normas as serem seguidas para garantir a saúde dos consumidores.

O monitoramento da qualidade da matéria-prima é prática constante de frigoríficos e laticínios. A identificação de resíduos de antimicrobianos no leite que chega à indústria de laticínios geralmente é feita por meio de *kits* relativamente baratos, mas que oneram os laticínios quando se considera o grande número de lotes recebidos diariamente. Na carne, os resíduos são detectados por técnicas cromatográficas que demandam instrumentação cara e mão de obra especializada. Na maioria das vezes, as análises são terceirizadas, o que contribui ainda mais para tornar o processo dispendioso, principalmente para os estabelecimentos de pequeno porte.

aptâmeros são moléculas de ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita simples que se ligam com alta seletividade a diversas moléculas, como toxinas, antibióticos, metais e proteínas. Além de possuir propriedades

semelhantes a anticorpos, como altas especificidade e afinidade ao alvo, os aptâmeros apresentam algumas vantagens como termossensibilidade, menor custo, e a não dependência de um sistema *in vivo* para sua produção. Os aptâmeros podem ser funcionalizados para agirem como biossensores por adsorção a nanopartículas de ouro. Na presença de sal e do analito, a interação entre os aptâmeros e as nanopartículas é desfeita, o que promove a sua agregação e conseqüente mudança de cor do sistema de rosa para azul. Dependendo do aptâmero, os limites de detecção dos resíduos podem se aproximar, ou até serem menores, do que os exigidos pelo MAPA.

Vários aptâmeros de DNA foram descritos na literatura como específicos para determinados antibióticos e podem servir de base para o desenvolvimento de uma metodologia de detecção rápida de seus alvos em diferentes matrizes, como leite, carnes e até efluentes, sem a necessidade de mão de obra especializada e equipamentos caros. Desta forma, este trabalho teve por objetivo otimizar um método colorimétrico de detecção de resíduos de ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e kanamicina em água e aplicá-lo a matrizes alimentares como carne de frango, leite e ovo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Problemática dos antibióticos

A descoberta dos antibióticos foi um marco na medicina humana que permitiu o tratamento eficaz de várias doenças antes consideradas fatais. Apesar de Alexander Fleming ter dado início à chamada “era dos antibióticos”, o primeiro antibiótico foi descrito por Bartolomeo Gosio (Mohr, 2016). Em 1896, Gosio isolou o composto do fungo *Penicillium brevi-compactum* que contaminava o milho consumido por pessoas no sul da Europa e nos Estados Unidos e mostrou atividade antimicrobiana contra *Bacillus anthracis*. Howard Walter Florey e Ernst Boris Chain elucidaram a estrutura da penicilina G em 1939, e –desde então– Norman Heatley, tornou possível a produção em larga escala do antimicrobiano 10 anos após o trabalho de Fleming, publicado em 1929 (Mohr, 2016). Porém, dois anos após a descoberta da penicilina, foram publicados os primeiros relatos de bactérias resistentes, seguidos pela descrição da disseminação de resistência de hospitais para a comunidade (Abraham, 1940; Lowy, 2003).

Mais de 150 antibióticos foram descritos após a penicilina e, para a grande maioria, a descoberta foi seguida pelo isolamento de bactérias resistentes, como consequência, os tratamentos se tornaram ineficientes, o que contribuiu para a disseminação a nível mundial das superbactérias (Lobanovska, 2017). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a resistência bacteriana uma das três maiores ameaças à saúde pública mundial e alerta para o crescimento do número de óbitos a cada ano caso o problema não seja revertido.

Apesar da resistência antimicrobiana ser frequentemente associada a patógenos hospitalares (Balsalobre, 2014), observa-se um aumento dos relatos mostrando o isolamento de bactérias resistentes em ambientes como água, esgoto, solo e em alimentos (Esiobu, 2002), o que sugere que o uso extensivo de antibióticos na agropecuária também necessita de ser revista (Balsalobre, 2014). Sobur et al. (2019) confirmaram a presença de *Escherichia coli* resistente à colistina em granjas de Bangladesh, enquanto que Monte (2019) demonstrou a presença de genes de resistência a quinolonas em granjas de aves e suínos no Brasil. Kurjogi et al. (2019) detectaram resíduos de azitromicina e tetraciclinas em amostras de leite, demonstrando

preocupação quanto ao monitoramento de resíduos de antibióticos nesse alimento para reduzir os níveis de contaminação seguindo a cadeia alimentar. Sachi (2019) cita outros malefícios da presença de resíduos de antibióticos em leite, como reações alérgicas, desregulação da flora intestinal, interferência no próprio processamento do alimento e até efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Supõe-se que os mesmos malefícios sejam aplicados para resíduos contidos em outros alimentos.

O Brasil possui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) de Produtos de Origem Animal que visa a segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no país. Esse programa tem algumas bases legais, como a Instrução Normativa nº 20, de 26 de julho de 2018, publicada no Diário Oficial da União em 31 de julho de 2018, que estabelece os limites de referência a serem seguidos por frigoríficos e laticínios para drogas veterinárias autorizadas presentes em alimentos (Tabelas 1, 2 e 3). Segundo a IN20, amostras devem ser coletadas por fiscais e enviadas a laboratórios oficiais e credenciados pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária que é acreditada na Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 para realizar análises de resíduos e contaminantes em amostras de alimentos provenientes das cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, além de mel e ovos.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu documento de base para discussão regulatória sobre limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários de origem animal de outubro de 2018, vários países se preocupam com a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal, limitando bastante a concentração residual máxima ou até proibindo a presença do medicamento em produtos agropecuários. Apesar da regulação da utilização de antibióticos na medicina humana, vários antibióticos para uso veterinário são vendidos livremente tanto na internet quanto em lojas físicas, não necessitando de receita médico-veterinária para serem adquiridos, o que dificulta muito o controle sobre o uso e liberação de resíduos no ambiente.

A identificação de resíduos de antimicrobianos no leite que chega à indústria de laticínios é feita geralmente por meio de *kits* comercialmente disponíveis, na maioria importados, baseados em imunocromatografia. Existe uma reclamação por parte dos donos dos laticínios e dos técnicos que fazem as análises do alto custo da análise

considerando o volume da matéria prima recebida. Algumas vezes o resultado do teste é duvidoso e o técnico precisa de realizar um segundo teste, o que encarece ainda mais a análise. Os testes imunocromatográficos que existem atualmente no mercado são para alguns antibióticos apenas, como beta-lactâmicos, sulfas, tetraciclina e quinolonas. Caso o produtor use algum outro medicamento, ele não será detectado pelo laticínio. Outra limitação é que os laboratórios que participam da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) ainda não são acreditados para realizarem a pesquisa de antimicrobianos no leite.

O BetaStar® S Combo da Neogen é um exemplo de teste imunocromatográfico que aponta a presença de beta-lactâmicos ou tetraciclina no leite. Ele é aprovado pelo MAPA, e, segundo o *website* da empresa (<https://foodsafety.neogen.com/pt/betastar-s-combo>), fornece o resultado em 5 minutos. Nesse teste, anticorpos interagem ou não com o alvo, no caso um antibiótico ou classe de antibióticos, e um resultado colorimétrico é fornecido. Na presença do alvo, o receptor é arrastado pelo fluxo, o que faz com que uma faixa escura na fita de teste fique ausente. Na ausência do alvo, o fluxo não carrega o anticorpo e a faixa na qual ele se encontrava permanece colorida (Figura 1). A principal desvantagem do teste da Neogen é seu preço, com um *kit* para 25 testes custando cerca de R\$ 212,50.

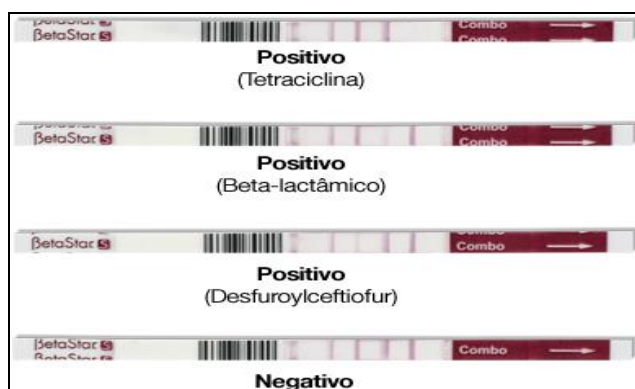


Figura 1: Possíveis resultados do teste BetaStar® S Combo. (Adaptado de: <https://foodsafety.neogen.com/pt/betastar-s-combo>).

Tabela 1 – Limites de referência estabelecidos pela instrução normativa nº 20 de 26 de julho de 2018 para alguns antimicrobianos presentes em carnes.

Antimicrobiano	Limite de referência (µg/kg)
Ampicilina	50
Amoxicilina	50 <sup>(1)</sup>
Cloranfenicol	0,30
Florfenicol	100 a 200 <sup>(2)</sup>
Kanamicina	2500
Penicilina G	50
Tetraciclina	Soma 1200 <sup>(3)</sup>

Adaptado de: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-dapncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018IN.pdf/@@download/file/PlanoAmostragemPNCRC2018IN>.

<sup>(1)</sup> Permitida apenas em carne suína, sendo proibida sua presença em outras carnes.

<sup>(2)</sup> 100 µg/kg para equinos e aves, e 200 µg/kg para bovinos e suínos.

<sup>(3)</sup> Soma referente a clortetraciclina, tetraciclina e oxitetraciclina.

Tabela 2 – Limites de referência estabelecidos pela normativa nº 20 de 26 de julho de 2018 para alguns antimicrobianos presentes no leite.

Antimicrobiano	Limite de referência (µg/L)
Ampicilina	4
Amoxicilina	4
Cloranfenicol	0,30
Florfenicol	10
Kanamicina	Não estabelecido
Penicilina G	4
Tetraciclina	Soma 100 <sup>(1)</sup>

Adaptado de: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018IN.pdf/@@download/file/PlanoAmostragemPNCRC2018IN>.

<sup>(1)</sup> Soma referente a clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina.

Tabela 3 – Limites de referência estabelecidos pela normativa nº 20 de 26 de julho de 2018 para alguns antimicrobianos presentes em ovos.

Antimicrobiano	Limite de referência (µg/kg)
Ampicilina	10
Amoxicilina	10
Cloranfenicol	0,30
Florfenicol	10
Kanamicina	Não estabelecido
Penicilina G	Não estabelecido
Tetraciclina	Soma 400 <sup>(1)</sup>

Adaptado de: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018IN.pdf/@@download/file/PlanoAmostragemPNCRC2018IN>.

<sup>(1)</sup> Soma referente a clortetraciclina, tetraciclina e oxitetraciclina.

A detecção de resíduos de antimicrobianos pode ser feita por um método semiquantitativo que depende do crescimento bacteriano. Um exemplo é o Delvotest, da DSM. Nesse teste, uma quantidade de amostra de leite é adicionada com o auxílio de uma pipeta em um tubo de teste com meio de cultura onde estão presentes esporos bacterianos. O tubo é, então, incubado a 64 °C por 3 horas (h). A coloração do meio de cultura fica roxa, se o resultado for para a presença de antibióticos, e amarela, se for negativo. Fagundes (2003) apresenta uma tabela em seu trabalho com os limites de sensibilidade do Delvotest, que vão de 6 µg/kg para a ampicilina, até 7500 µg/kg para cloranfenicol. Como desvantagens citam-se a demora nos resultados (mais de 3 h até o resultado) e o não fornecimento da concentração precisa do alvo.

Há metodologias bem estabelecidas para a detecção da presença de resíduos de antibióticos em produtos cárneos. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS-MS) é uma análise quantitativa que fornece informações sobre a concentração de resíduos na amostra de alimento. A principal vantagem dessa técnica é a sua confiabilidade e resolução, uma vez que é possível a detecção de quantidades muito pequenas do analito. Entre as desvantagens estão o preparo minucioso da amostra a ser utilizada, que depende de etapas como estocagem,

pesagem, homogeneização, extração, concentração, etc (Bitas et al., 2018), o custo tanto do equipamento quanto operacional, além do tempo necessário para o resultado final. Empresas que prestam serviços nessa área pedem geralmente 18 dias para análise que beta-lactâmicos, que pode ultrapassar a R\$740,00/amostra.

## **2.2. aptâmeros de ácidos nucleicos**

aptâmeros de ácidos nucleicos são oligonucleotídeos de cerca de 20 a 60 bases nitrogenadas, de RNA ou DNA de fita simples, que podem ter vários tipos de conformação dependendo de suas bases nitrogenadas (Zhou, 2016). Também são conhecidos por “anticorpos químicos” pois, dependendo da sua conformação, podem se ligar com afinidade e especificidade semelhantes a anticorpos proteicos.

A tecnologia de aptâmeros foi descrita inicialmente pelos grupos de Tuerk e Gold (1990) e Ellington e Szostak (1990). Enquanto o primeiro grupo estudava ligantes de RNA, dentro de uma biblioteca de oligonucleotídeos de oito bases aleatórias, com alta afinidade para a T4 DNA Polimerase (Tuerk e Gold, 1990), o segundo grupo estudava se, dentre uma biblioteca com  $10^{13}$  oligonucleotídeos de RNA, haveria alguns que poderiam se ligar com afinidade a corantes orgânicos (Ellington e Szostak, 1990). Os trabalhos de ambos os grupos ajudaram a moldar a tecnologia de aptâmeros, com o grupo de Ellington e Szostak dando nome a essa nova molécula e o grupo de Tuerk e Gold descrevendo a metodologia de obtenção dos ligantes de alta afinidade.

Além de possuírem características importantes como afinidade e seletividade, os aptâmeros possuem algumas vantagens quando comparados aos anticorpos proteicos, entre elas, maior estabilidade em altas temperaturas, menor tamanho, permitindo que seus alvos sejam moléculas muito pequenas e baixo custo, pois podem ser sintetizados quimicamente (Song et al., 2012). Outra grande vantagem é que os aptâmeros não necessitam de cadeia refrigerada ou de um ser vivo para sua seleção (Zhou, 2016).

O método de obtenção de aptâmeros é conhecido como “Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment” (SELEX) e foi descrito primeiramente por Tuerk e Gold. Ele consiste em três etapas principais: seleção, partição e amplificação (Zhuo, 2017). A seleção é o passo de incubação da biblioteca de oligonucleotídeos (oligos) com a molécula-alvo para a ligação dos oligos de maior afinidade. A partição é a

separação dos oligos não ligados ao alvo e posterior eluição dos ligantes, e a amplificação é a etapa de geração de uma nova biblioteca de oligos a partir de produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR) dos ligantes eluídos. Os produtos da etapa de amplificação são usados novamente em uma etapa de seleção, gerando um ciclo que é repetido várias vezes.

aptâmeros podem ser usados como carreadores de drogas e um medicamento que utiliza aptâmeros como principal componente já existe comercialmente. Min (2011) utilizou aptâmeros de DNA para direcionar o antineoplásico doxorrubicina a duas variações de células tumorais de próstata, PSMA (+) e PSMA (-), obtendo ótimos resultados *in vitro*. O MAGUGEN é um medicamento para o tratamento da degeneração macular que possui como componente principal aptâmeros que se ligam ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (bula MACUGEN, Pfizer), fator este que aumenta a pressão intraocular, degenerando a mácula ocular e provocando cegueira permanente.

### **2.3. Nanopartículas de ouro**

Nanopartículas são, segundo Khan (2017), materiais particulados que possuem tamanhos menores que 100 nm e que podem ser feitas pelo homem ou existir na natureza na forma de compostos orgânicos e inorgânicos (Heiligttag, 2013). Artesãos do século 4 já usavam nanopartículas metálicas na decoração de cerâmicas para produção de cores belas e vibrantes, como no Copo de Licurgo, um objeto feito no Império Romano, de coloração verde quando iluminado pelo lado de fora e vermelho quando iluminado por dentro. O Copo de Licurgo possui esse efeito graças à presença de nanopartículas de ouro em sua composição que refletem a luz de forma diferente dependendo de como essa incide sobre o material (Heiligttag, 2013).

Nanopartículas adquirem colorações diferentes dependendo do seu tamanho (Figura 2), aspecto que pode ser explorado para fins biotecnológicos. A mudança de cor em relação ao tamanho deve-se a ressonância plasmônica de superfície (RPLS). Nanopartículas são menores que o comprimento de onda da luz e podem ser descritas como núcleos iônicos, por possuírem elétrons em livre movimento no seu interior. O campo elétrico da luz incidente gera uma força sobre os elétrons, fazendo com que eles

migram para a parte mais externa da partícula. A volta dos elétrons para a posição inicial gera um campo elétrico oposto ao da luz incidente. Os elétrons, então, irão entrar em ressonância com a luz incidida, com uma amplitude de oscilação que irá depender das características da nanopartícula (forma e tamanho) (Moraes, 2019). Segundo o autor, a oscilação dos elétrons implica em um aumento da energia cinética e, por consequência, a extinção parcial da luz incidente, o que fornece a cor do comprimento de onda não extinguido.

Uma solução de nanopartículas de ouro com partículas menores que 100 nm geralmente possui coloração avermelhada (Mody, 2010). Como a coloração depende do tamanho das partículas, a agregação faz com que haja um deslocamento da região do espectro onde o comprimento de onda da luz não é extinguido pelo fenômeno de ressonância plasmônica, o que modifica a cor da solução para violeta (Figura 3).

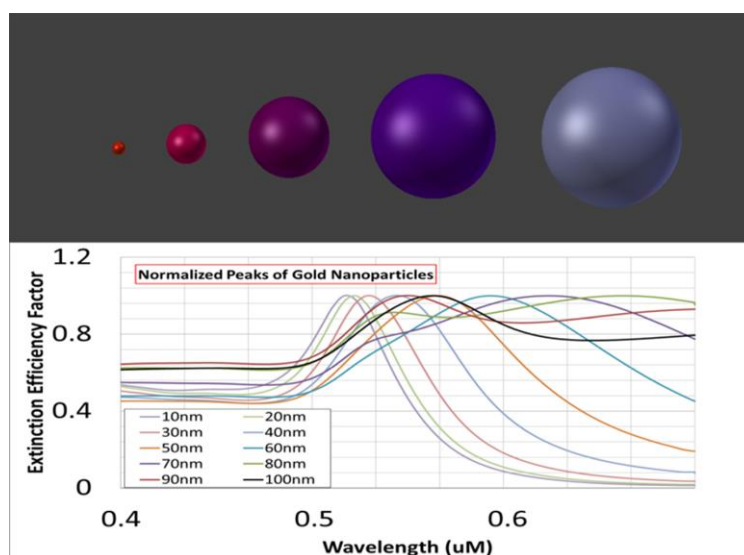


Figura 2: Relação entre o tamanho das nanopartículas de ouro e absorção em seus respectivos comprimentos de onda. Os tamanhos das nanopartículas mostrados na figura não foram descritos pelo autor, sendo a imagem apenas ilustrativa. (Adaptado de <http://hdl.handle.net/2142/75909>)

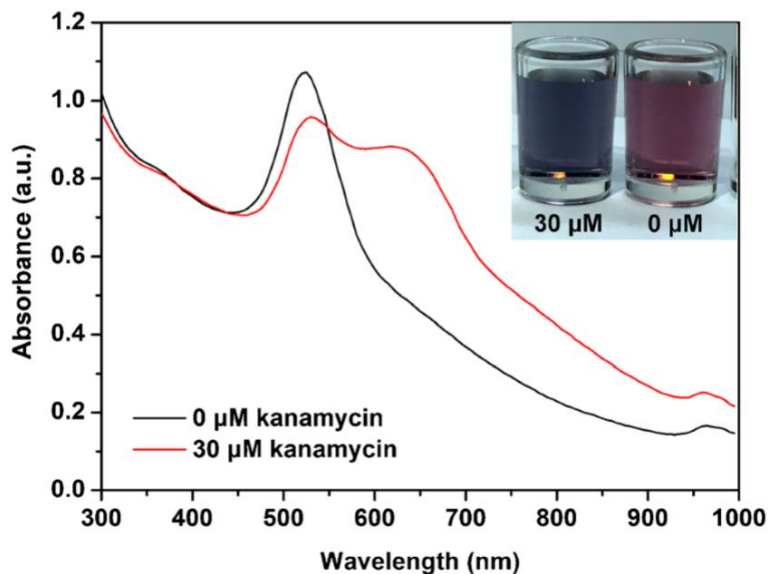


Figura 3: Deslocamento do comprimento de onda causado pela agregação das nanopartículas presentes em solução (Adaptado de Xu, 2019).

As nanopartículas de ouro possuem uma variedade de aplicações biotecnológicas que vão desde biosensores, teranóstico na forma de detecção de termólise de células cancerosas e até na bioimagem e monitoramento celular (Dykman, 2011). Nessas aplicações, as nanopartículas geralmente possuem tamanho entre 10 e 500 nm (Mody, 2010). aptâmeros podem ser adsorvidos à superfície de nanopartículas de ouro para a criação de sensores para a detecção de diversos analitos. Song et al., (2012) imobilizaram ampicilina em esferas magnéticas e selecionaram por meio de SELEX aptâmeros de DNA com afinidade pelo antibiótico ( $K_d = 9,4 \text{ nmol/L}$  a  $13,4 \text{ nmol/L}$ ). Os autores propuseram uma metodologia de teste combinada baseada em colorimetria e fluorescência (Figura 4), com limites de detecção, de  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  e  $2 \text{ } \mu\text{g/L}$ , respectivamente. O método foi aplicado para a detecção de ampicilina em leite demonstrando boa especificidade e sensibilidade, sendo os limites de detecção citados acima aplicados tanto para amostras em água quanto em leite.

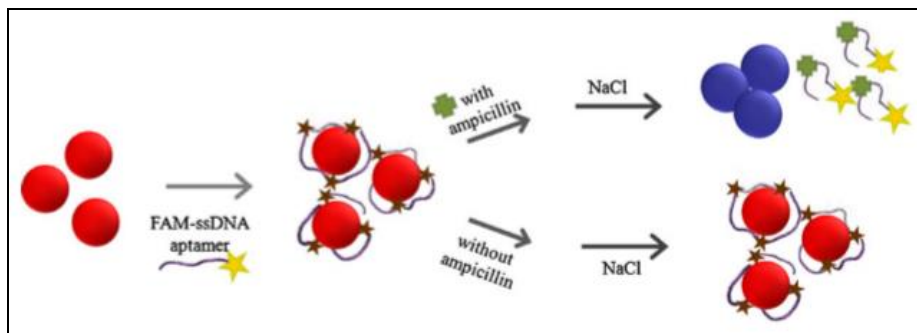


Figura 4: Detecção colorimétrica e fluorimétrica por meio do uso de nanopartículas de ouro e aptâmeros de DNA (Adaptado de Song et al., 2012).

Smith et al., (2014) demonstraram o uso de aptâmeros de DNA e nanopartículas de ouro para a detecção colorimétrica de cocaína em solução aquosa. Os autores não informam o limite de detecção para o alvo em questão, mas apontam que o teste foi otimizado para uma detecção sensível e precisa do alvo em água. A detecção faz uso de um aplicativo para *smartphone* que auxilia na visualização da mudança de cor e foi otimizada para uso em campo.

Zhou et al. (2018) desenvolveram um teste colorimétrico baseado em aptâmeros de DNA e nanopartículas de ouro para a detecção de ofloxacina. Os autores testaram o método em água e urina artificial (BIOMART.CN), que teve limite de detecção de 3,4 nmol/L, independente da amostra. O teste foi também testado para ampicilina, tetraciclina e kanamicina, mas mostrou-se específico apenas a ofloxacina.

Kim et al. (2010) também descreveram uma metodologia colorimétrica para a detecção de oxitetraciclina utilizando o mesmo sistema aptâmero e nanopartícula de ouro. Os autores comprovaram a especificidade uma vez que o método não foi capaz de detectar outros antibióticos como doxiciclina e tetraciclina, e um limite de detecção de 25 nmol/L. Niu et al., (2014) montaram um sistema de detecção multiplex com os aptâmeros e nanopartículas de ouro, nas quais adsorveu aptâmero para kanamicina, sulfametoxina e adenosina para a detecção. Os testes foram feitos em água e tiveram limites de detecção nas faixas de 100 ng/mL para kanamicina, e 500 ng/mL para sulfametoxina e adenosina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Propor e otimizar um método colorimétrico e espectrofotométrico de detecção de antibióticos usando aptâmeros adsorvidos a nanopartículas de ouro.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Sintetizar nanopartículas de ouro pelo método químico;
- Caracterizar as nanopartículas sintetizadas por espectrofotometria;
- Determinar a melhor concentração de sal e de aptâmeros a serem usadas no teste com matriz aquosa;
- Detectar a presença dos antibióticos ampicilina, kanamicina, cloranfenicol e tetraciclina em matriz aquosa por colorimetria e espectrofotometria;
- Otimizar uma metodologia de detecção para leite, carne e ovos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

Os reagentes usados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes utilizados neste estudo.

Reagente	Marca	Código	Lote
HAuCl <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich	520918-1G	MKG7664
Citrato de sódio P.A.	Synth	C1033.01.AG	144312
Cloreto de sódio	Êxodo Científica	CS09711RA	1910305542
Ampicilina	Sigma-Aldrich	A0166-5G	088M4818V
Cloranfenicol cristalino	Sigma-Aldrich	C0378-25G	050M1592V
Tetraciclina	Sigma-Aldrich	87128-25G	097M4852V
Sultafo de kanamicina	Sigma-Aldrich	K1377-25G	011M0209V
Hidróxido de sódio P.A-ACS (micropérolas)	Impex	-	020-IQBC
Ácido clorídrico P.A.	VETEC	V000154-1L	DCBC5311V

### 4.2. aptâmeros

Os aptâmeros utilizados neste estudo foram descritos em trabalhos anteriores (Tabela 5) e foram sintetizados por meio de síntese química realizada pela empresa FastBio na escala de 25 mmol/L. Os aptâmeros liofilizados foram ressuspensos com H<sub>2</sub>O *nuclease-free* para a concentração estoque de 100 µmol/L e foram estocados a -20 °C. Uma concentração de 10 µmol/L foi utilizada nos experimentos.

Tabela 5 - Aptâmeros utilizados neste estudo e suas respectivas características.

aptâmero	Sequência <sup>1</sup>	Fonte	Alvo
AMP4	CAC GGC ATG GTG GGC GTC GTG	Song et al. (2012)	Ampicilina
AMP17	GCG GGC GGT TGT ATA GCG G	Song et al. (2012)	Ampicilina
CAM7	ACT TCA GTG AGT TGT CCC ACG GTC GGC GAG TCG GTG GTA G	Mehta et al. (2011)	Cloranfenicol
Ky2	TGG GGG TTG AGG CTA AGC CGA	Song et al. (2011)	Kanamicina
T20	CCC CCG GCA GGC CAC GGC TTG GGT TGG TCC CAC TGC GCG T	Niazi (2008)	Tetraciclina

<sup>1</sup> – Sequência apresentada no sentido 5' – 3'

### 4.3. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

O equivalente a 10 mg de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> foi adicionado a 50 mL de água purificada (Gehaka Master System MS2000) e a solução foi aquecida por aproximadamente 15 min sob agitação com o auxílio de um agitador magnético (Biofoco modelo BF2 AGMA), até seu ponto de ebulição. Em seguida, no mesmo equipamento, foram adicionados 2,5 mL de uma solução de citrato de sódio 1%, mantido sob aquecimento e agitação por 10 min. Ao ser observada mudança de coloração de amarelo para azul, e depois vermelho, o aquecimento foi suspenso e a solução foi mantida sob contínua agitação por mais 15 min. O ouro coloidal produzido foi resfriado a temperatura ambiente e estocado em frasco âmbar esterilizado a 4 °C para posterior utilização.

As nanopartículas foram analisadas por espectrofotometria (Biospectro SP-220) a 520 nm/L, pico de absorção das nanopartículas dispersas (Song et al., 2012). A concentração foi estimada em 10,33 nmol/L pela equação  $A = \epsilon \cdot l \cdot C$  (Smith, 2016), onde A é a absorvância da solução de nanopartículas a 520 nm;  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção, sendo  $2,4 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  segundo Smith (2016); l é comprimento da cubeta utilizada, nesse caso é de 1 cm; e C é a concentração da solução de nanopartículas.

#### **4.4. Adsorção dos aptâmeros às nanopartículas de ouro**

Para adsorção dos aptâmeros às nanopartículas, 40  $\mu\text{L}$  da solução de nanopartículas previamente sintetizada foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente com 4  $\mu\text{L}$  de solução 10  $\mu\text{mol/L}$  de aptâmero e 16  $\mu\text{L}$  de água purificada, em um protocolo modificado de Song et al., (2011).

#### **4.5. Determinação da concentração de sal**

Para a determinação da concentração de sal necessária para a agregação das nanopartículas, 40  $\mu\text{L}$  da solução de nanopartículas previamente sintetizadas foram adicionadas a 150  $\mu\text{L}$  de água purificada e, após uma breve homogeneização, 10  $\mu\text{L}$  de NaCl nas concentrações 200 mmol/L, 600 mmol/L, 1 mol/L, 1,4 mol/L, 2 mol/L, 2,4 mol/L, 3 mol/L e 4 mol/L foram adicionadas para as concentrações finais de 10 mmol/L, 30 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L, 120 mmol/L, 150 mmol/L e 200 mmol/L. Um controle sem sal também foi feito a fim de comparar a mudança na coloração ocorrida pela adição de sal. Além da mudança visível de cor, os comprimentos de onda 520 nm e 620 nm foram aferidos em espectrofotômetro (Molecular Devices SpectraMax M5), sendo 620 nm o comprimento de onda no qual as nanopartículas estão agregadas e 520 nm o comprimento de onda no qual as nanopartículas estão dispersas (Song, 2012). A razão 620/520 nm foi calculada para saber a relação entre as nanopartículas agregadas e não-agregadas.

#### **4.6. Determinação da concentração de aptâmeros**

A solução de nanopartículas previamente sintetizada foi adicionada a diferentes concentrações (100 nmol/L, 200 nmol/L, 500 nmol/L e 1000 nmol/L) de aptâmeros para avaliar a melhor concentração a proteger as nanopartículas da agregação. Para isso, foram adicionadas a um tubo de ensaio 40  $\mu\text{L}$  das nanopartículas e 2  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  ou 20  $\mu\text{L}$  de aptâmeros na concentração de 10  $\mu\text{mol/L}$ . O volume foi completado com água para 60  $\mu\text{L}$ . Finalizados 30 min de incubação a temperatura ambiente, 150  $\mu\text{L}$  de água purificada foram adicionados aos tubos. Após uma breve homogeneização, 10  $\mu\text{L}$  de NaCl (1 mol/L) foram adicionados e a mudança de cor observada.

#### **4.7. Teste colorimétrico em matriz aquosa**

Para avaliar a detecção de antibióticos por colorimetria, 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque de nanopartículas foram adicionados a 16  $\mu\text{L}$  de água purificada e 4  $\mu\text{L}$  de aptâmero (10  $\mu\text{mol/L}$ ), seguido de incubação por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de água purificada, 100  $\mu\text{L}$  de solução contendo os antibióticos ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina ou kanamicina, em concentrações variando de 50  $\mu\text{g/mL}$  a 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Após 15 min, 10  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl (1 mol/L) foram adicionados ao tubo. As amostras foram analisadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 520 nm e 620 nm. As amostras também foram fotografadas para registro da mudança de cor do sistema.

#### **4.8. Preparo das matrizes alimentares**

Além dos testes realizados em água, foram avaliados leite, carne de peito de frango e ovos. As matrizes alimentares foram processadas como descrito a seguir. Para a precipitação de proteínas do leite, 30 mL de leite integral da marca Piracanjuba foram aquecidos em forno de micro-ondas e HCl P.A. foi adicionado gota a gota até aglutinação visível das proteínas presentes na solução. O leite foi filtrado em filtro de papel comercial (marca Melitta) e o soro foi recolhido para uso. O pH foi corrigido para 7,0 com adição de NaOH 2 mol/L. Em seguida, o soro foi centrifugado em centrífuga Biosystems MCD-2000, a 10000 rpm por 30 min a temperatura ambiente para precipitar as proteínas insolúveis. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nos testes.

O filé de peito de frango da marca PifPaf foi comprado fresco e particionado em pedaços menores, com massa total de 41,988 g, macerados com o auxílio de um cadinho e pistilo até formar uma pasta homogênea que depois foi ressuspensa em 30 mL água purificada. Após uma pequena homogeneização, a amostra foi filtrada em filtro Melitta e o filtrado foi recolhido e centrifugado a 10000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nos testes.

O ovo branco da granja Viroleira foi quebrado em um béquer e homogeneizado com o auxílio de uma espátula. A massa foi aferida (53,401 g) e fracionada em volumes de 2 mL que foram adicionados a microtubos (massas de 2,206 g e 2,042 g). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 min e o sobrenadante foi recolhido para os testes.

#### **4.9. Testes de diluição das matrizes alimentares**

A interferência da matriz alimentar na agregação das nanopartículas foi avaliada. Para isso, 40  $\mu\text{L}$  da solução de nanopartículas previamente sintetizadas foram adicionadas a 50  $\mu\text{L}$  de água purificada e 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram coletados na etapa final de processamento de cada matriz. Após homogeneização, 10  $\mu\text{L}$  de várias de NaCl nas concentrações 200 mmol/L, 600 mmol/L, 1 mol/L, 1,4 mol/L, 2 mol/L, 2,4 mol/L, 3 mol/L e 4 mol/L foram adicionadas para as concentrações finais de 10 mmol/L, 30 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L, 120 mmol/L, 150 mmol/L e 200 mmol/L. As amostras foram analisadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 520 nm e 620 nm. As amostras também foram fotografadas para registro da mudança de cor do sistema. Quando não foi percebido a mudança na coloração, o sobrenadante foi diluído 10 vezes em água purificada e um novo teste foi realizado, até que se encontrasse uma diluição suficiente para permitir a visualização da mudança de coloração na solução.

#### **4.10. Testes colorimétricos de identificação de antibióticos nas matrizes alimentares**

Uma vez definida a diluição da matriz alimentar a ser usada nos testes, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol ou kanamicina foi adicionado em concentrações entre 50  $\mu\text{g/mL}$  e 0,125  $\mu\text{g/mL}$ , dependendo do antibiótico. O teste consistiu de 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque de nanopartículas, 16  $\mu\text{L}$  de água purificada e 4  $\mu\text{L}$  de aptâmero (10  $\mu\text{mol/L}$ ) que foram incubados por 30 min. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de água purificada, 100  $\mu\text{L}$  da matriz diluída ( $10^{-3}$  para soro de leite e carne, e  $10^{-6}$  para ovo) contendo o antibiótico em uma concentração definida. Após 15 min, 10  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl (1 mol/L) foram adicionados. As amostras foram analisadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 520 nm e 620 nm. As amostras também foram fotografadas para registro da mudança de cor do sistema.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro

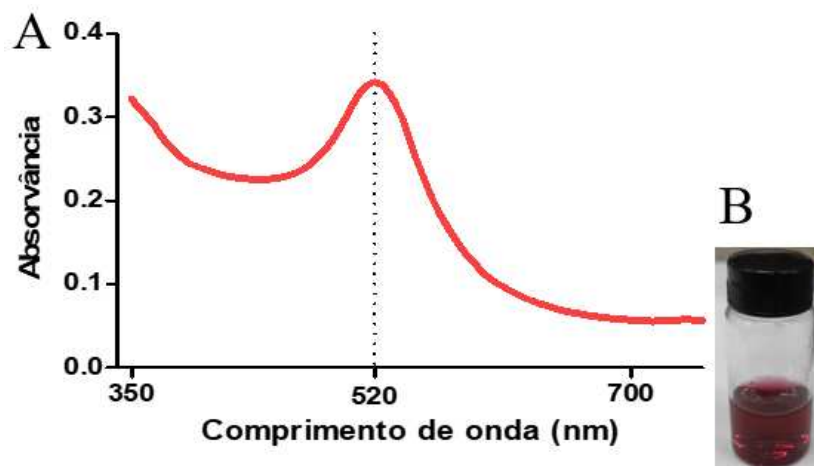


Figura 5: Análise das nanopartículas sintetizadas por espectrofotometria entre os comprimentos de onda 350 a 750 nm (A). Solução das nanopartículas de ouro após a síntese (B).

### 5.2. Determinação da melhor concentração de NaCl

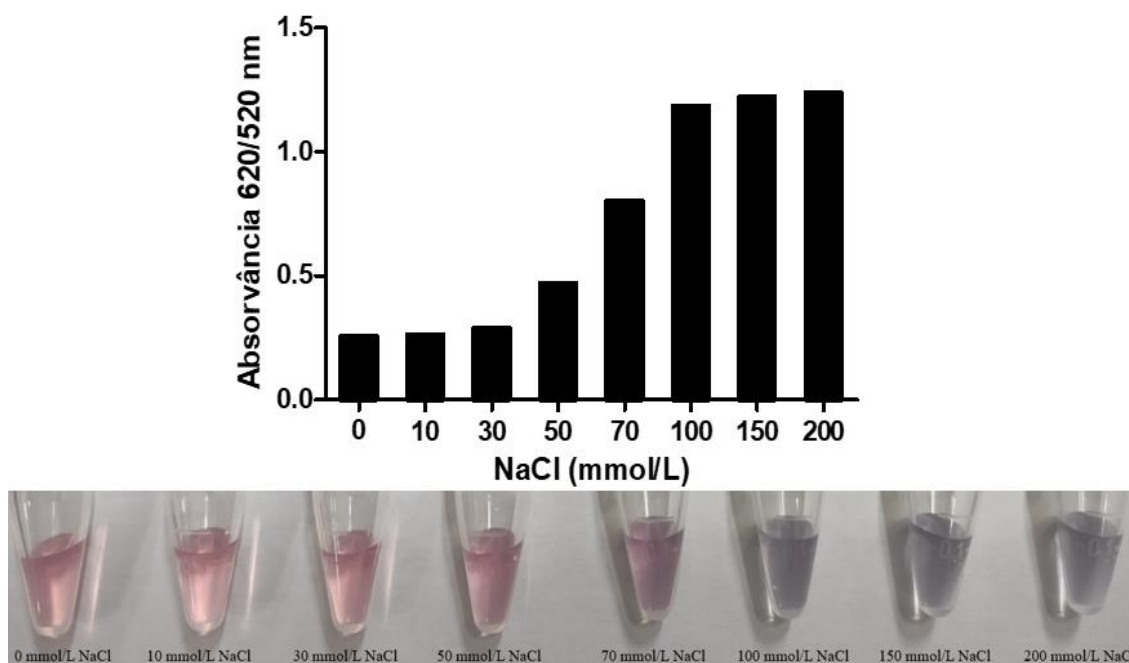


Figura 6: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

### 5.3. Determinação da melhor concentração de aptâmero

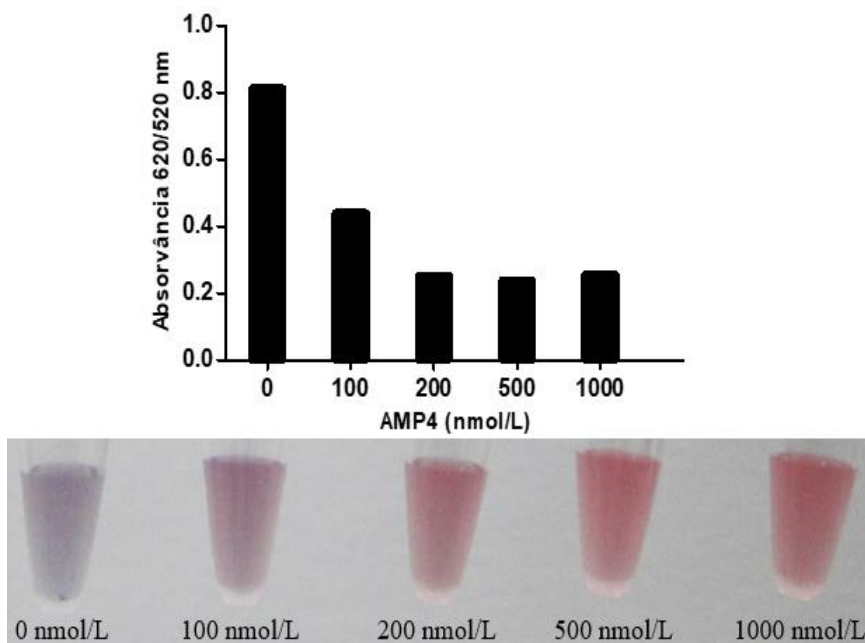


Figura 7: Influência da concentração de aptâmero na agregação das nanopartículas de ouro. Diferentes concentrações do aptâmero AMP4 foram adicionadas e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

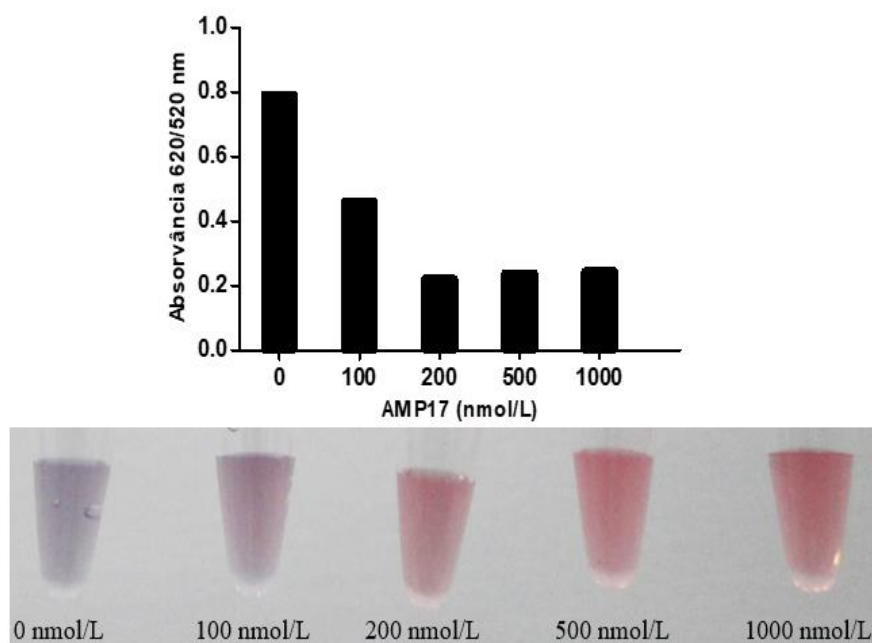


Figura 8: Influência da concentração de aptâmero na agregação das nanopartículas de ouro. Diferentes concentrações do aptâmero AMP17 foram adicionadas e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

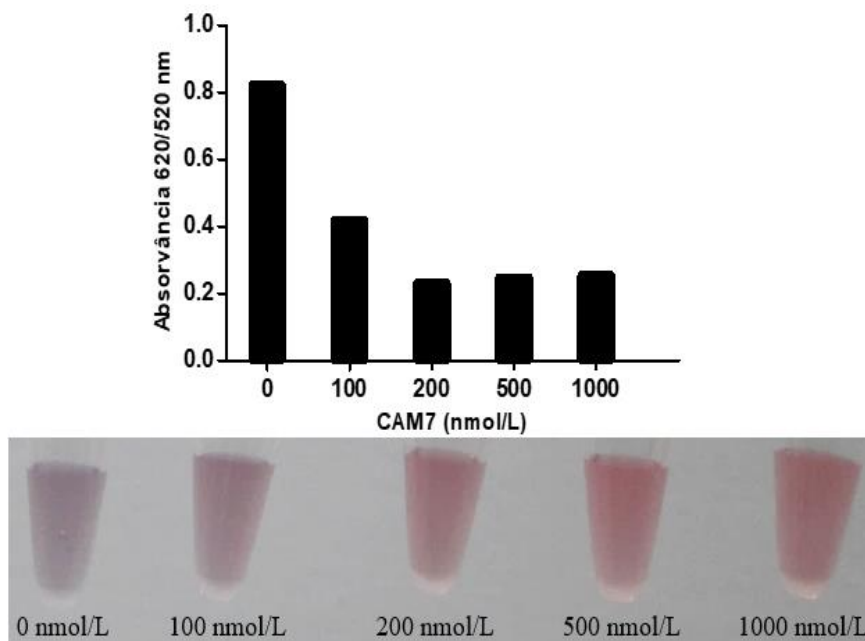


Figura 9: Influência da concentração de aptâmero na agregação das nanopartículas de ouro. Diferentes concentrações do aptâmero CAM7 foram adicionadas e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

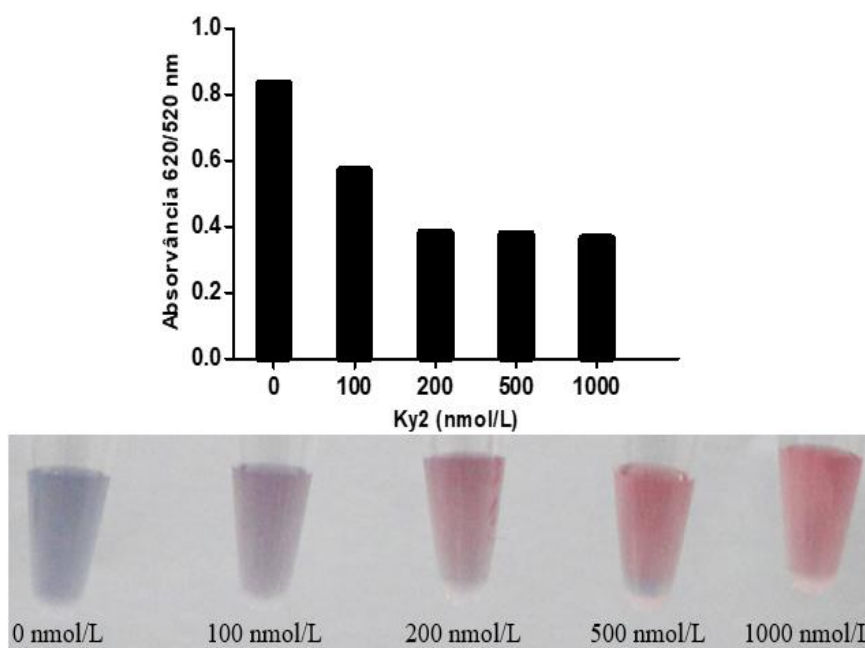


Figura 10: Influência da concentração de aptâmero na agregação das nanopartículas de ouro. Diferentes concentrações do aptâmero Ky2 foram adicionadas e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

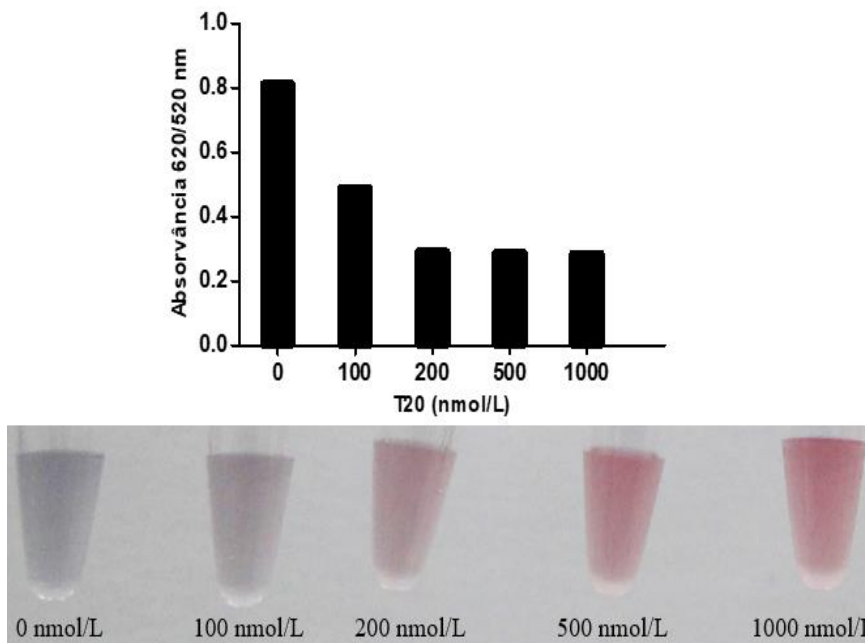


Figura 11: Influência da concentração de aptâmero na agregação das nanopartículas de ouro. Diferentes concentrações do aptâmero T20 foram adicionadas e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

#### 5.4. Testes colorimétricos em água

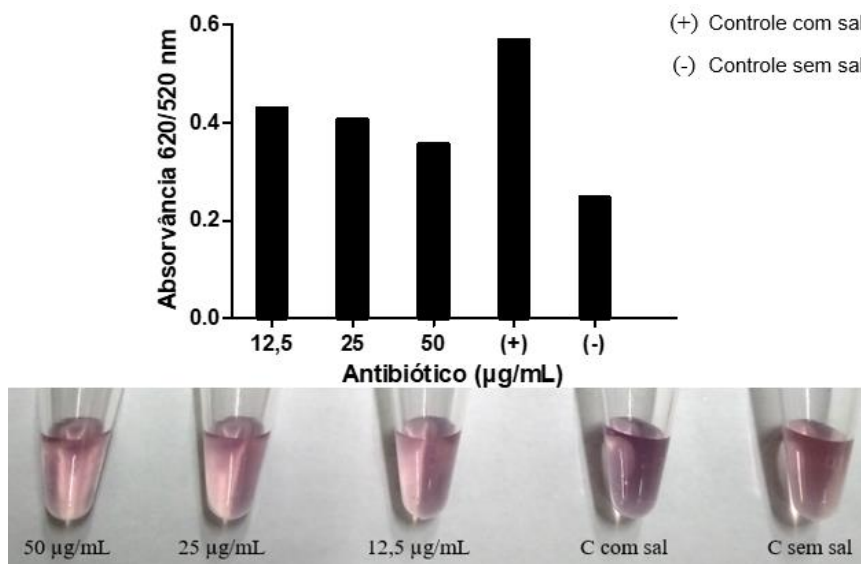


Figura 12: Teste para detecção de ampicilina em água usando o aptâmero AMP4. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP4 e 50 mmol/L de NaCl. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP4, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

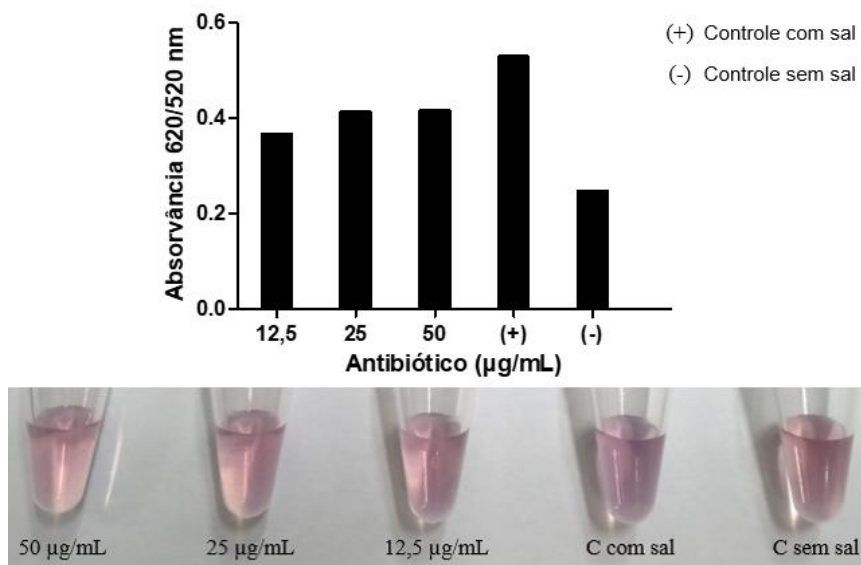


Figura 13: Teste para detecção de ampicilina em água usando o aptâmero AMP17. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP17 e 50 mmol/L de NaCl. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP17, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

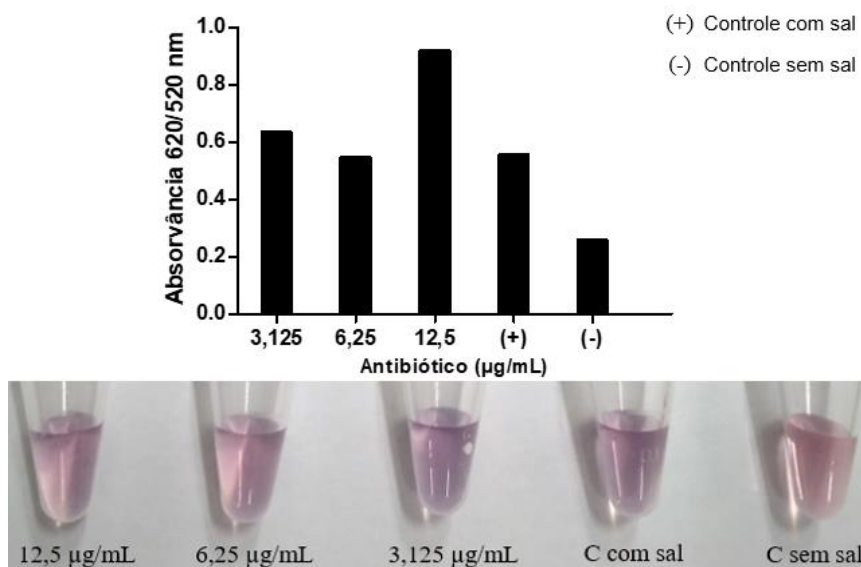


Figura 14: Teste para detecção de cloranfenicol em água usando o aptâmero CAM7. Diferentes concentrações de cloranfenicol foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de CAM7 e 50 mmol/L de NaCl. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, CAM7, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

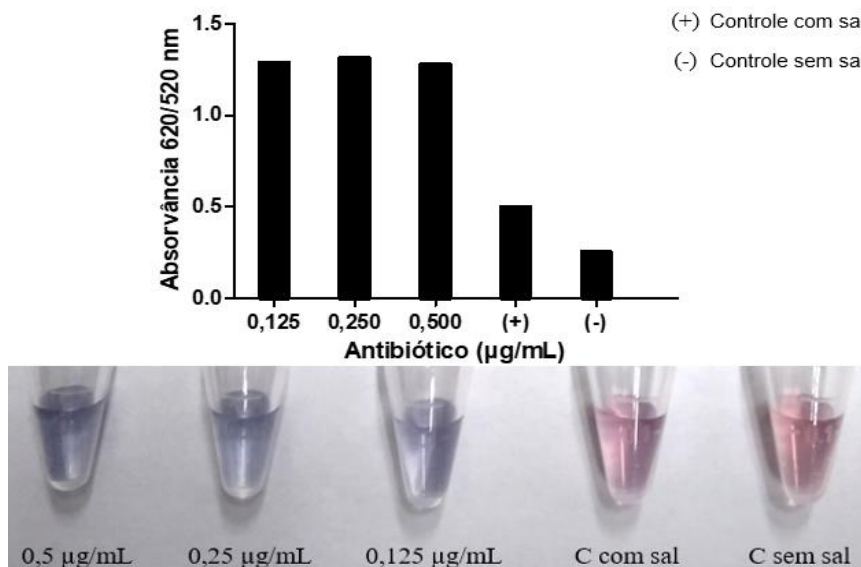


Figura 15: Teste para detecção de kanamicina em água usando o aptâmero Ky2. Diferentes concentrações de canamicina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de Ky2 e 50 mmol/L de NaCl. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, Ky2, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

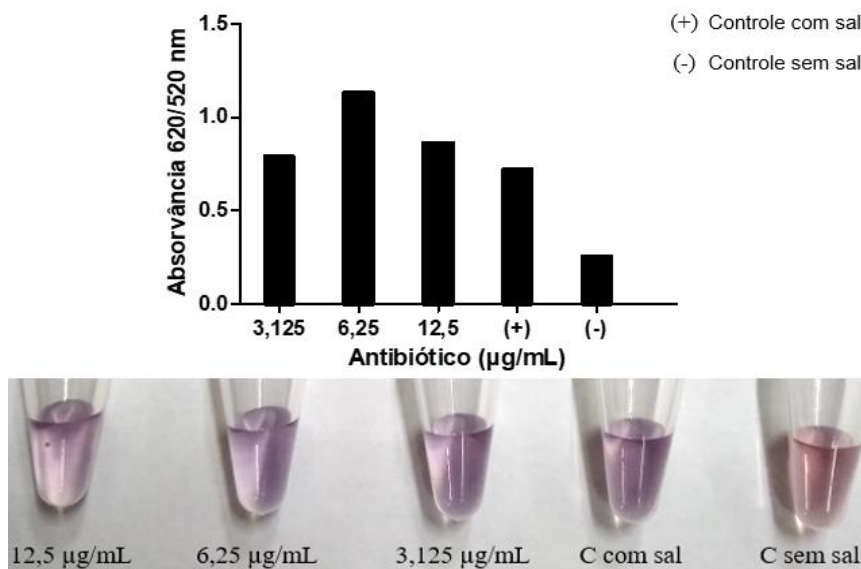


Figura 16: Teste para detecção de tetraciclina em água usando o aptâmero T20. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de T20, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

### 5.5. Testes colorimétricos em matrizes alimentares

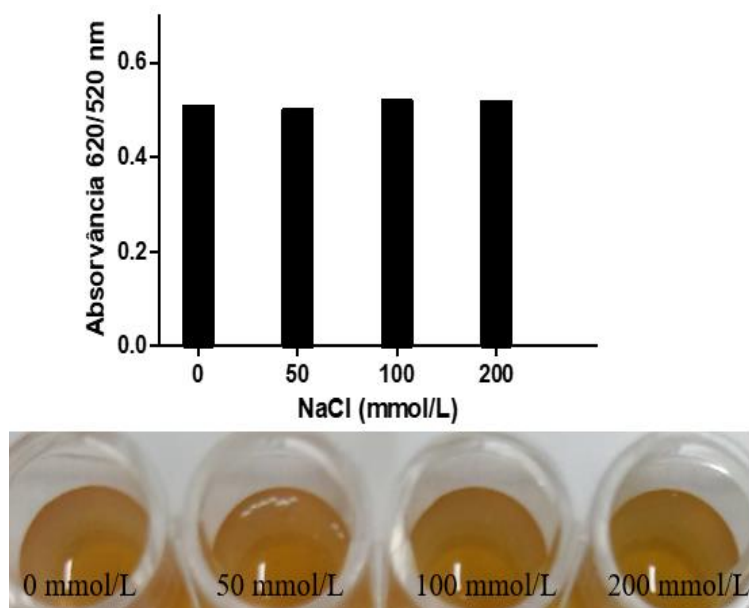


Figura 17: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

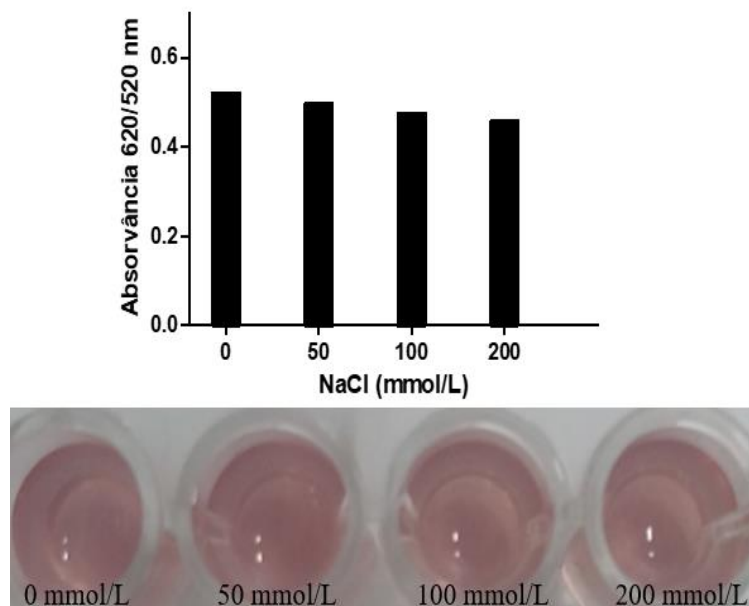


Figura 18: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo diluída 10X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

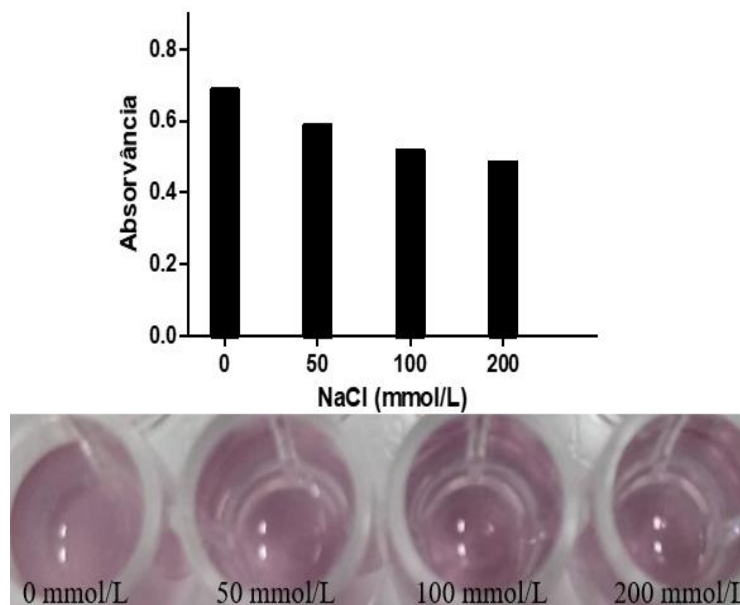


Figura 19: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo diluída 100X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

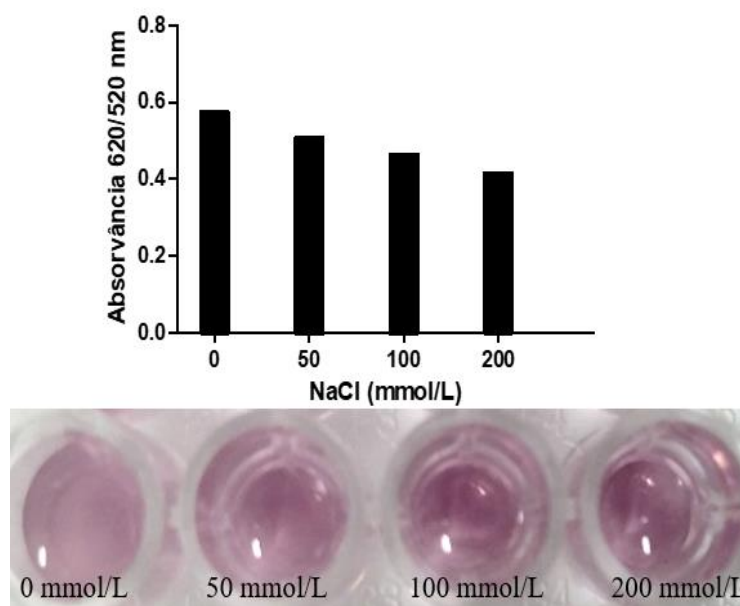


Figura 20: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo diluída 1.000X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

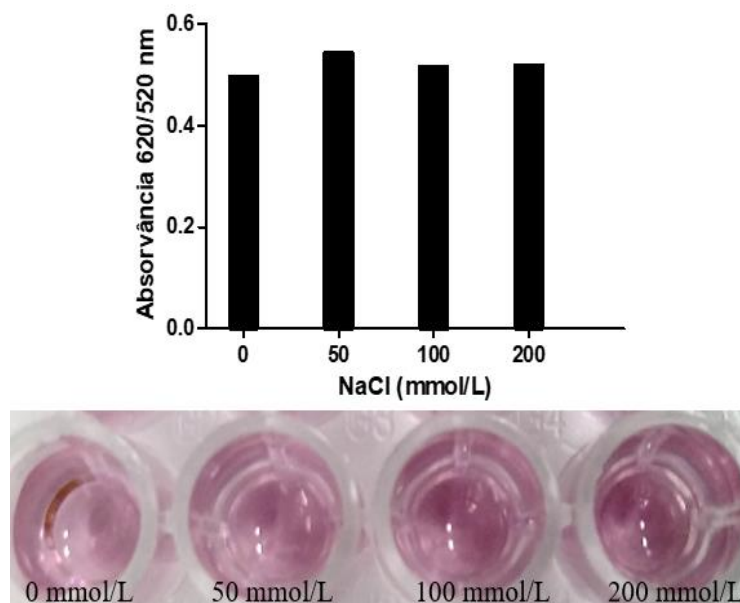


Figura 21: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo diluída 10.000X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

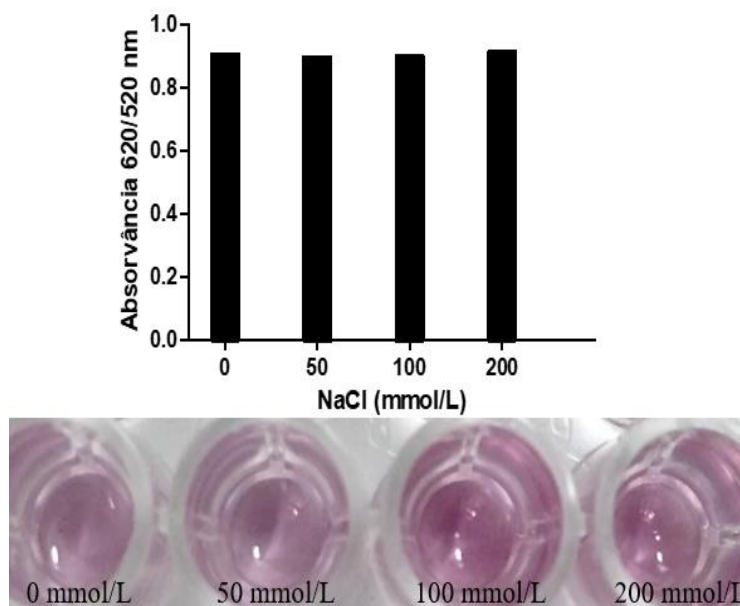


Figura 22: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo diluída 100.000X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

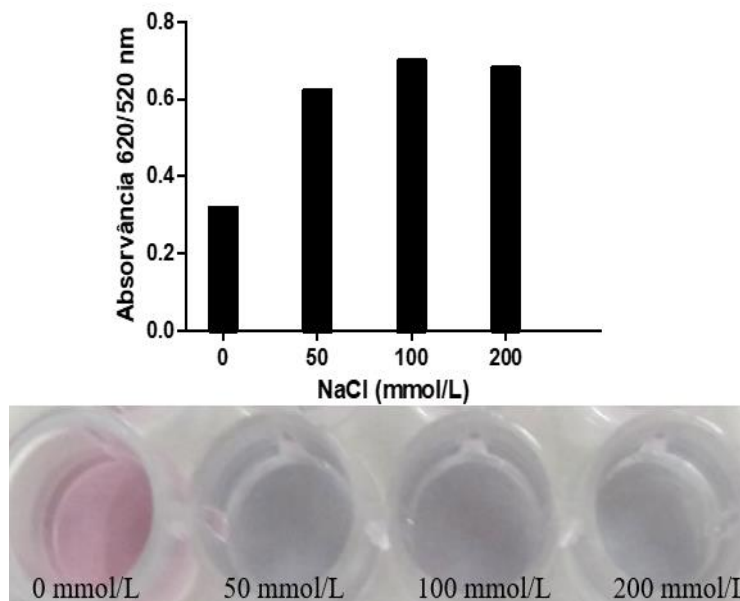


Figura 23: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz ovo. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de ovo diluída 1.000.000X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

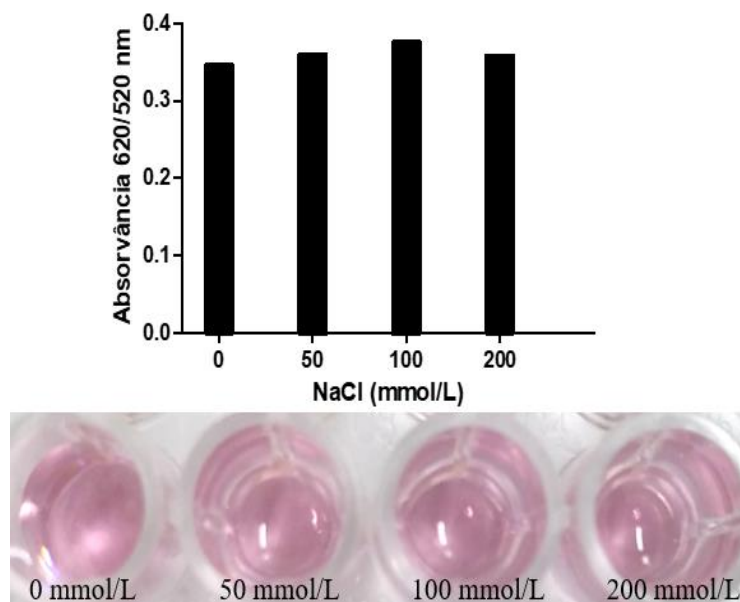


Figura 24: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz leite. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de soro de leite e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

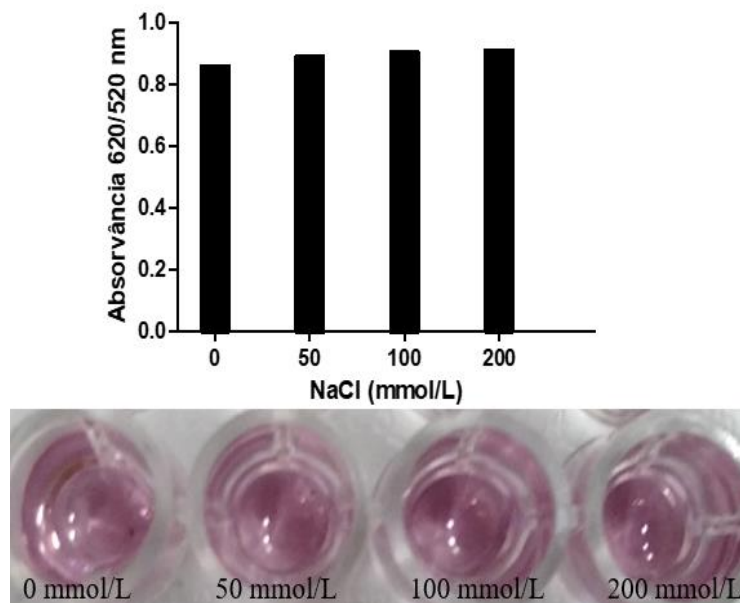


Figura 25: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz leite. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de soro de leite diluída 10X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

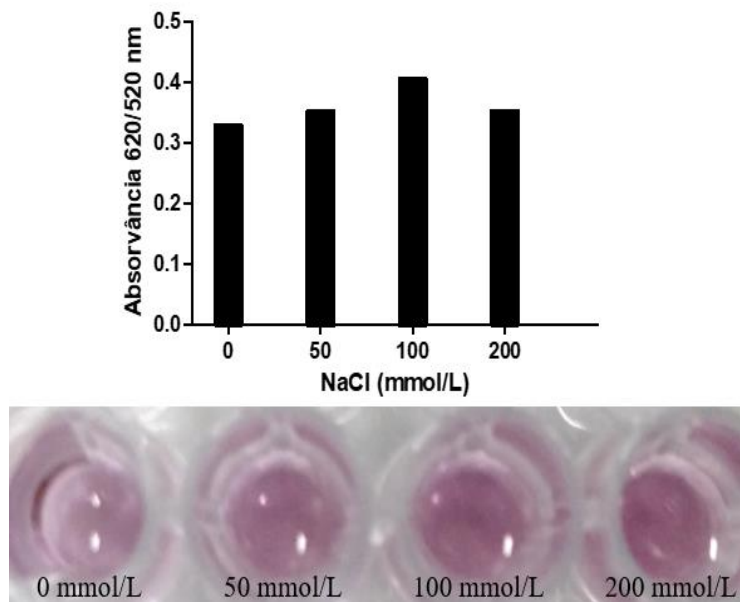


Figura 26: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz leite. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de soro de leite diluída 100X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

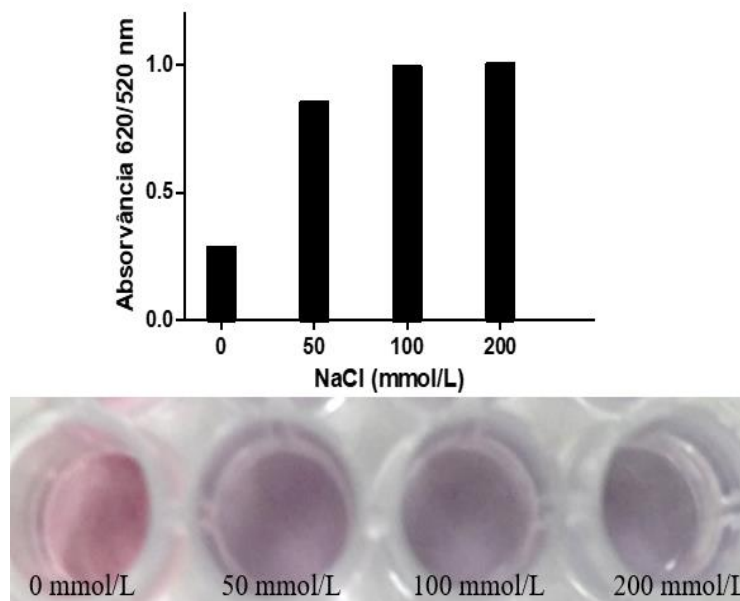


Figura 27: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz leite. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de soro de leite diluída 1.000X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

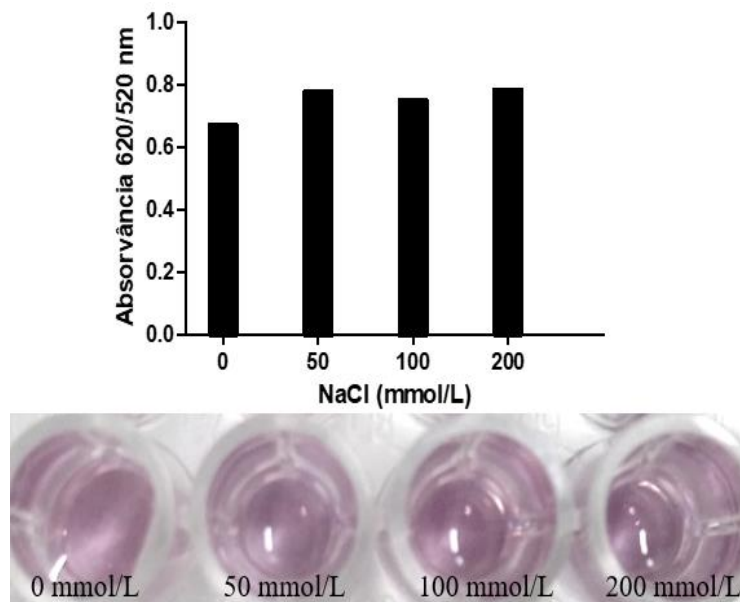


Figura 28: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz carne. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de carne e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

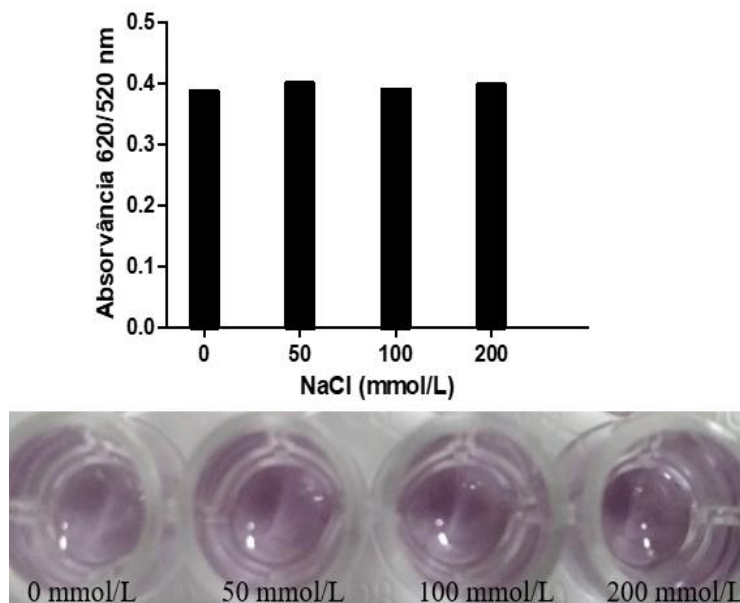


Figura 29: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz carne. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de carne diluída 10X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

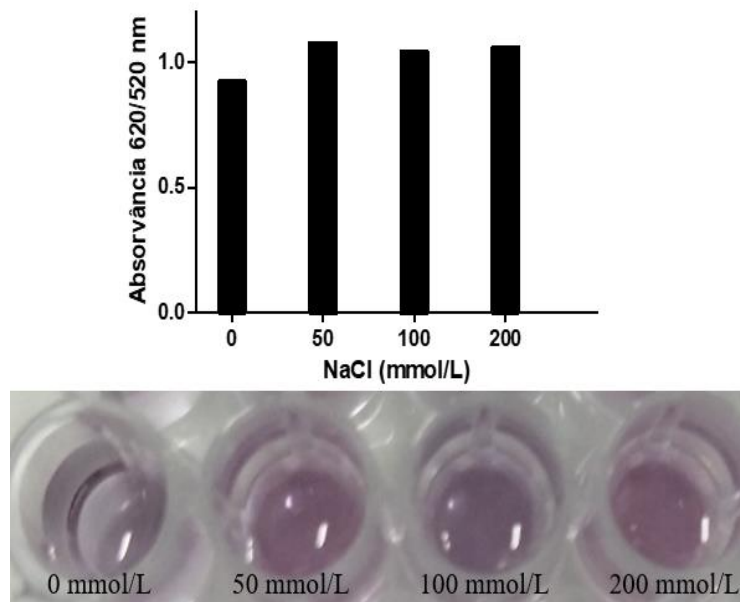


Figura 30: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz carne. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de carne diluída 100X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

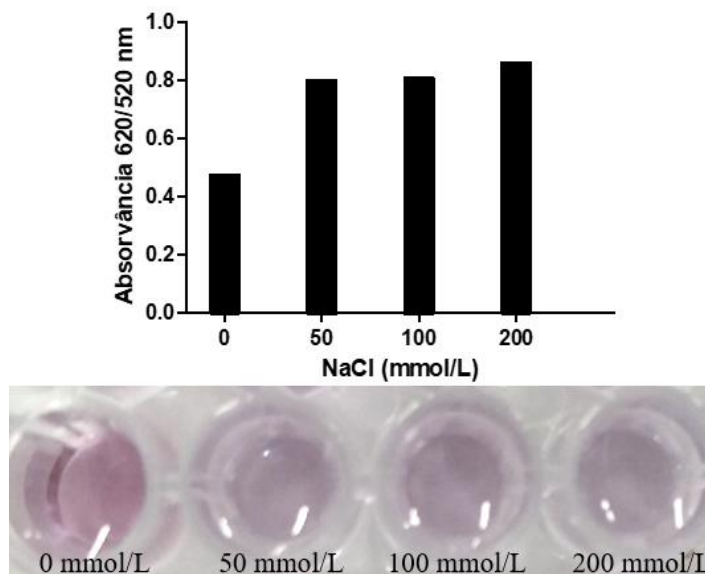


Figura 31: Influência do NaCl na agregação das nanopartículas de ouro sem aptâmero na matriz carne. Diferentes concentrações do sal foram adicionadas a uma amostra de carne diluída 1.000X e a mudança de cor foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

### 5.5.1. Soro de leite

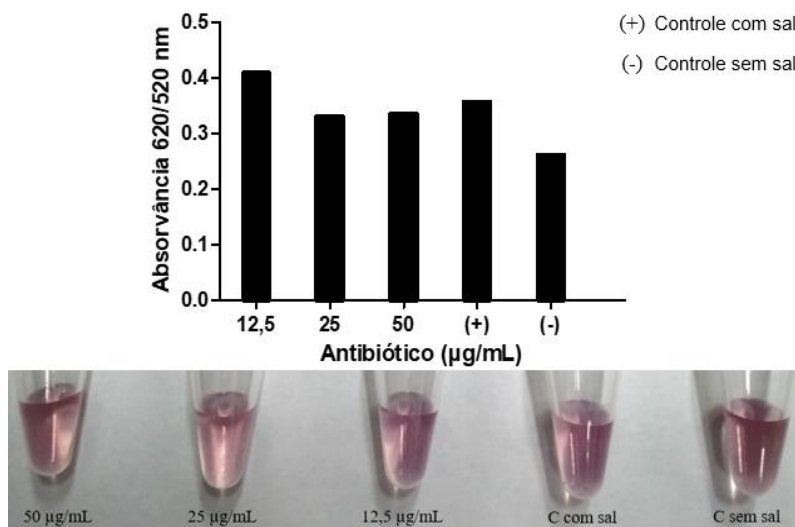


Figura 32: Teste para detecção de ampicilina em soro de leite usando o aptâmero AMP4. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP4, 50 mmol/L de NaCl e soro de leite diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP4, soro de leite, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

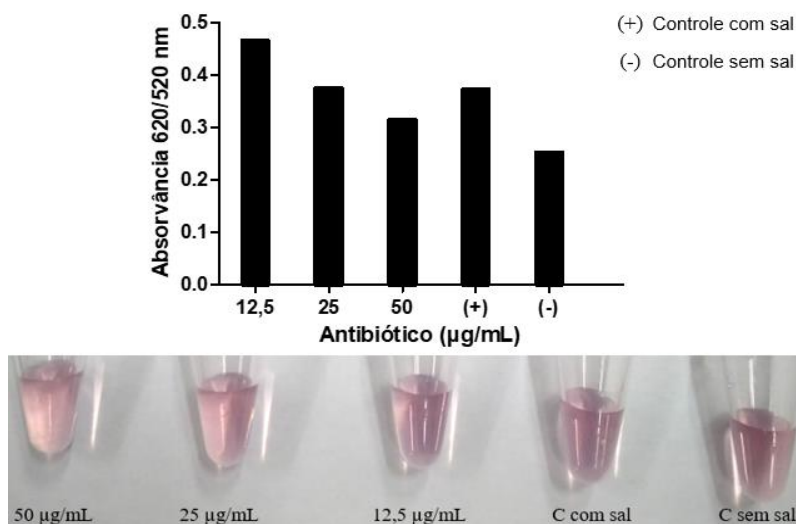


Figura 33: Teste para detecção de ampicilina em soro de leite usando o aptâmero AMP17. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP17, 50 mmol/L de NaCl e soro de leite diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP17, soro de leite, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

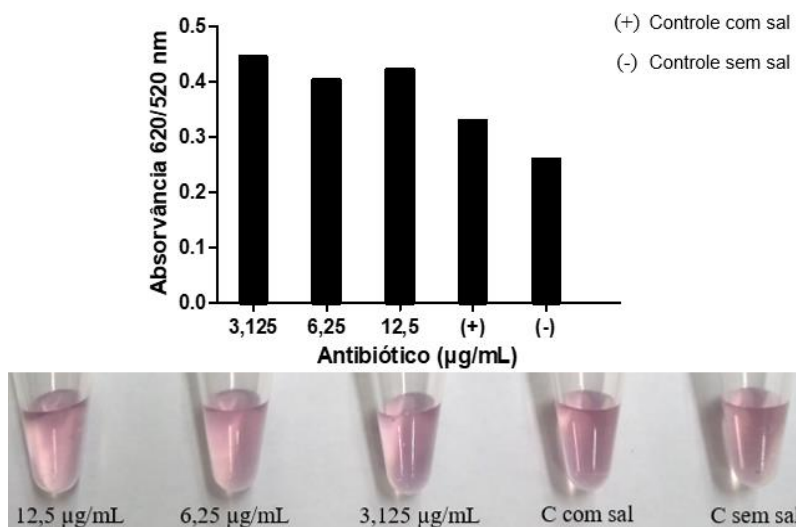


Figura 34: Teste para detecção de cloranfenicol em soro de leite usando o aptâmero CAM7. Diferentes concentrações de cloranfenicol foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de CAM7, 50 mmol/L de NaCl e soro de leite diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, CAM7, soro de leite, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

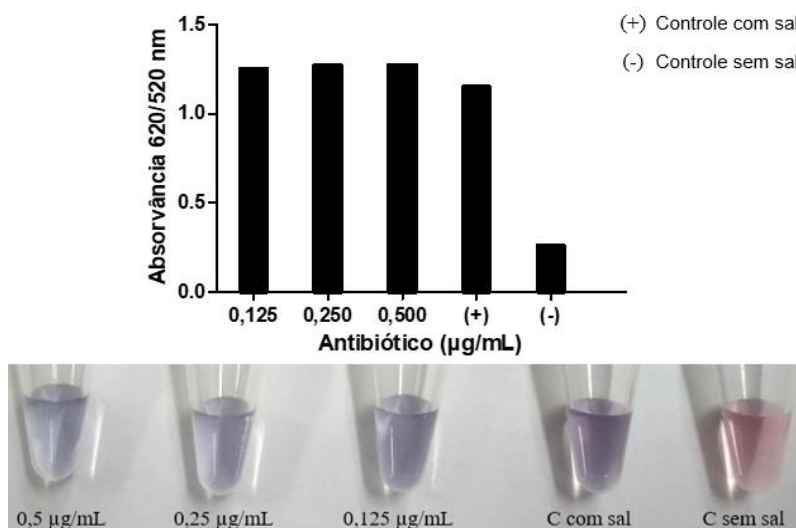


Figura 35: Teste para detecção de kanamicina em soro de leite usando o aptâmero Ky2. Diferentes concentrações de kanamicina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de Ky2, 50 mmol/L de NaCl e soro de leite diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, Ky2, soro de leite, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

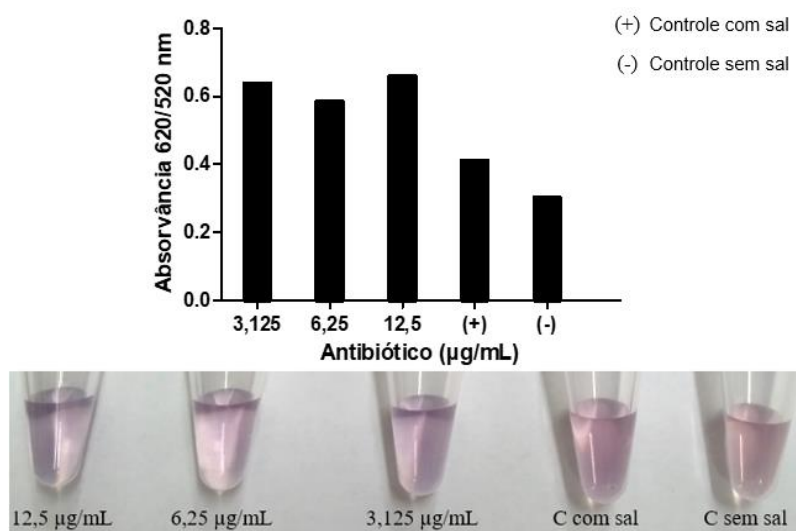


Figura 36: Teste para detecção de tetraciclina em soro de leite usando o aptâmero T20. Diferentes concentrações de tetraciclina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de T20, 50 mmol/L de NaCl e soro de leite diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, T20, soro de leite, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

### 5.5.2. Ovo

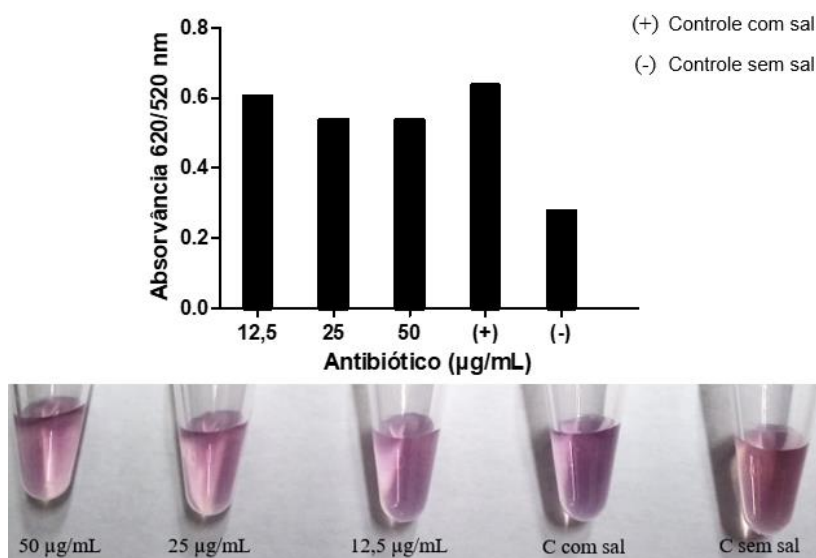


Figura 37: Teste para detecção de ampicilina em ovo usando o aptâmero AMP4. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP4, 50 mmol/L de NaCl e ovo diluído 1.000.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP4, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

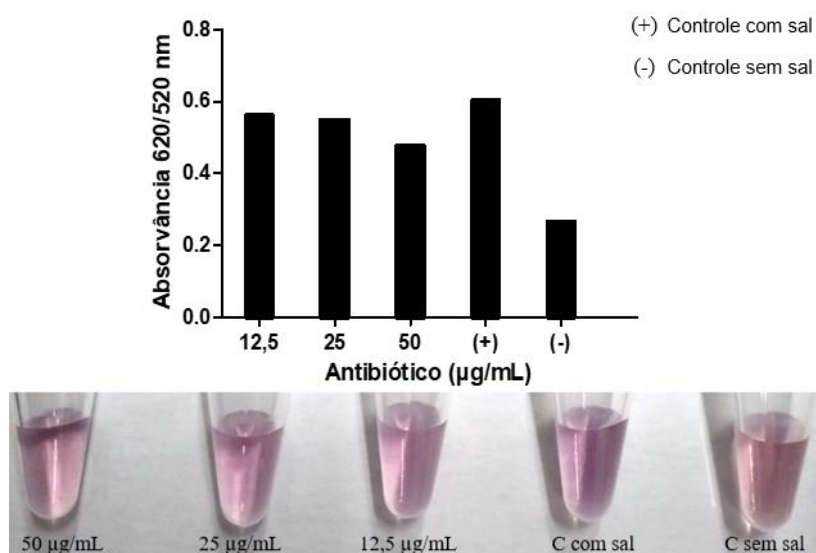


Figura 38: Teste para detecção de ampicilina em ovo usando o aptâmero AMP17. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP17, 50 mmol/L de NaCl e ovo diluído 1.000.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP17, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

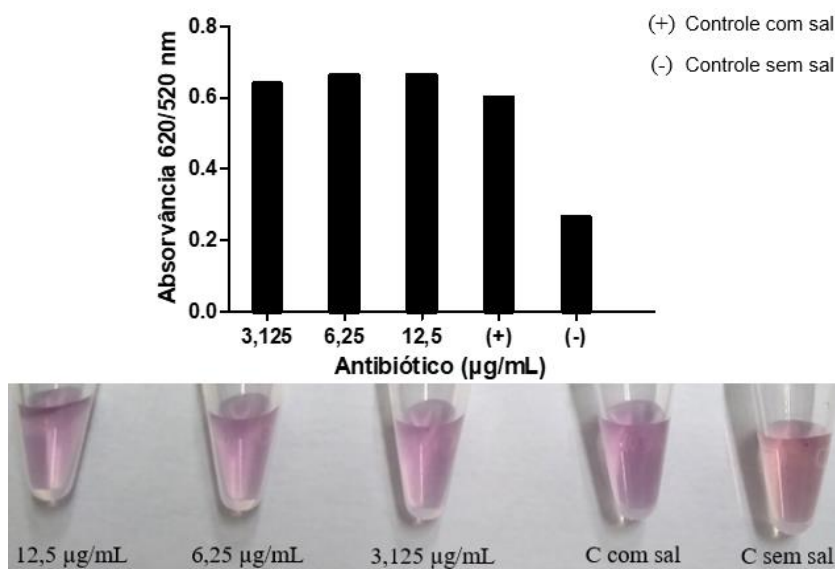


Figura 39: Teste para detecção de cloranfenicol em ovo usando o aptâmero CAM7. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de CAM7, 50 mmol/L de NaCl e ovo diluído 1.000.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, CAM7, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

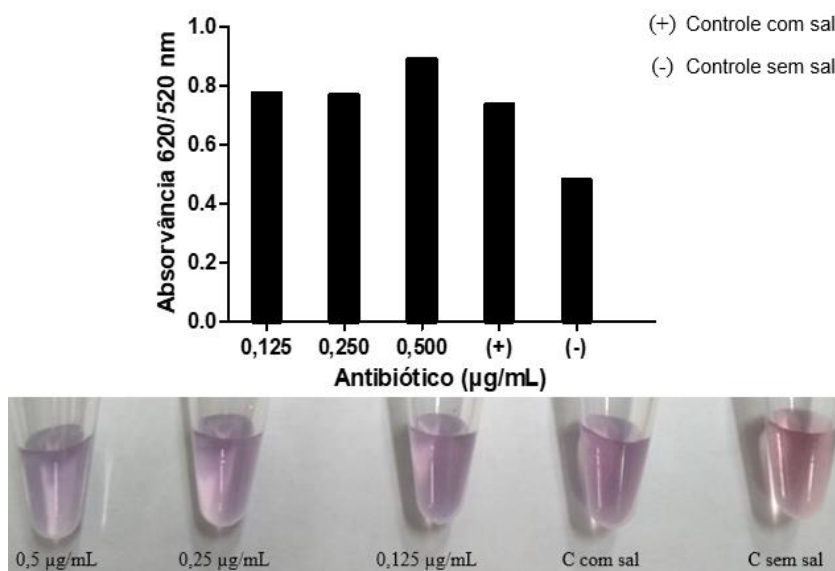


Figura 40: Teste para detecção de kanamicina em ovo usando o aptâmero Ky2. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de Ky2, 50 mmol/L de NaCl e ovo diluído 1.000.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, Ky2, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

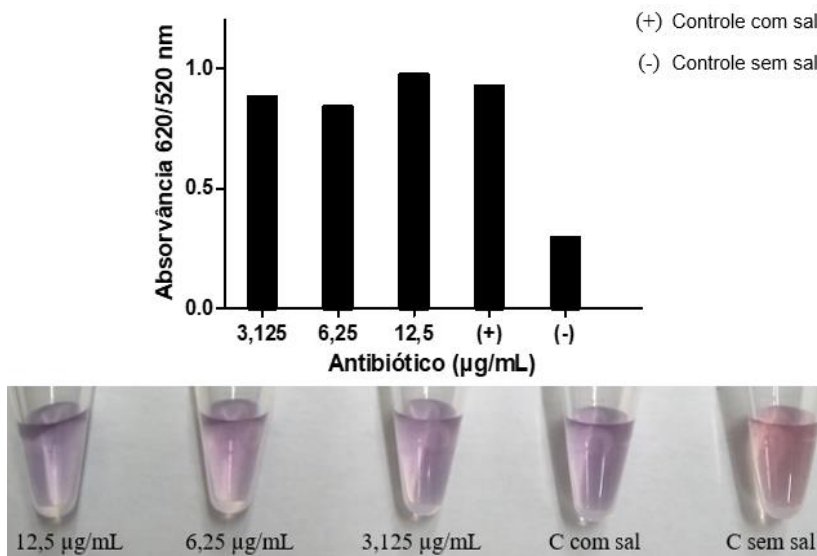


Figura 41: Teste para detecção de tetraciclina em ovo usando o aptâmero T20. Diferentes concentrações de tetraciclina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de T20, 50 mmol/L de NaCl e ovo diluído 1.000.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, T20, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

### 5.5.3. Extrato de carne

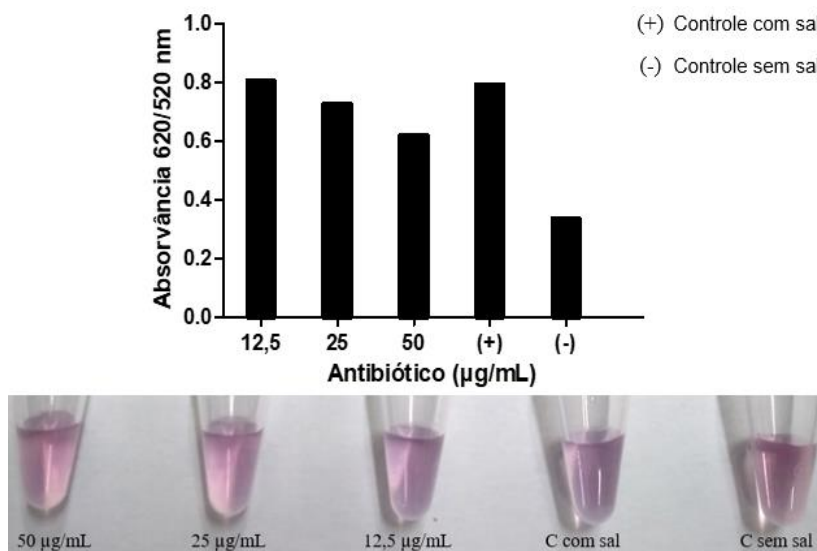


Figura 42: Teste para detecção de ampicilina em carne usando o aptâmero AMP4. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP4, 50 mmol/L de NaCl e extrato de carne diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP4, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

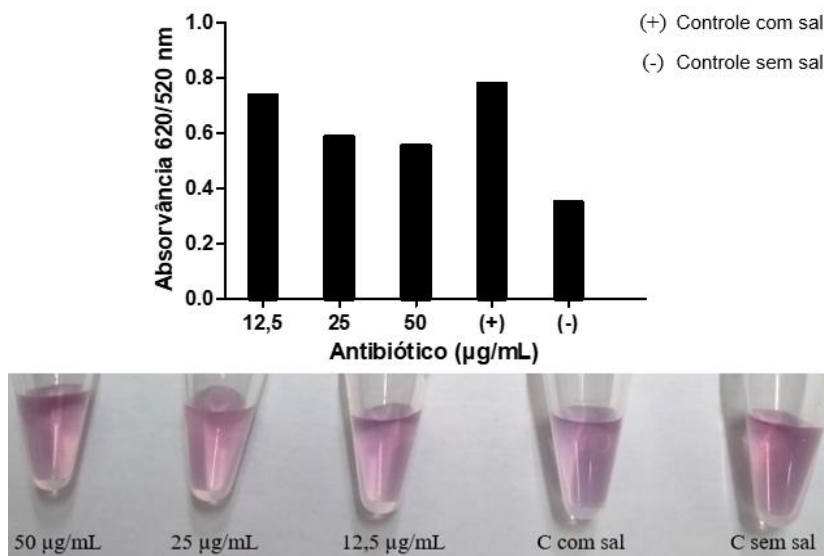


Figura 43: Teste para detecção de ampicilina em carne usando o aptâmero AMP17. Diferentes concentrações de ampicilina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de AMP17, 50 mmol/L de NaCl e extrato de carne diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, AMP17, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

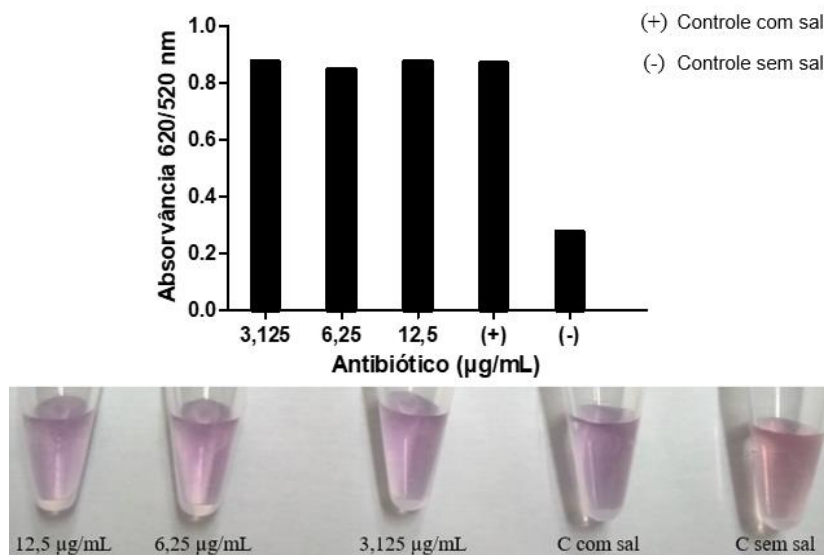


Figura 44: Teste para detecção de cloranfenicol em carne usando o aptâmero CAM17. Diferentes concentrações de cloranfenicol foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de CAM17, 50 mmol/L de NaCl e extrato de carne diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, CAM17, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

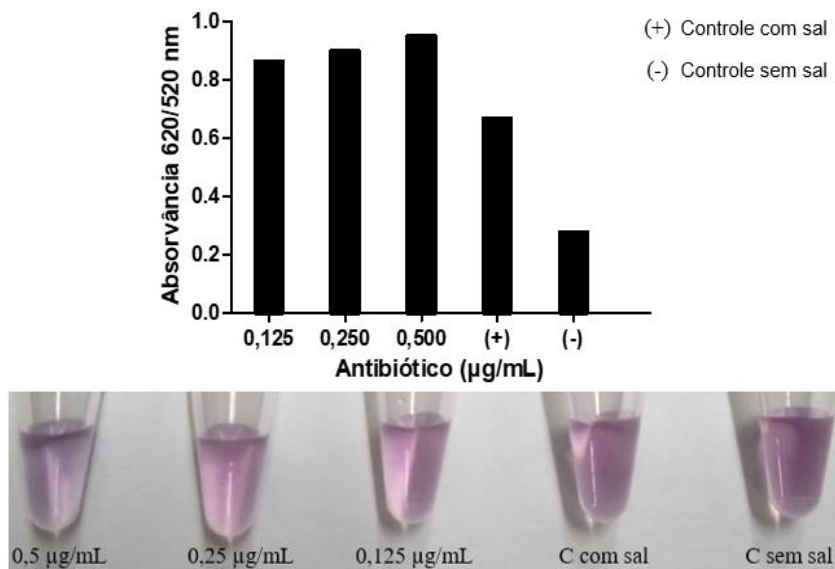


Figura 45: Teste para detecção de kanamicina em carne usando o aptâmero Ky2. Diferentes concentrações de kanamicina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de Ky2, 50 mmol/L de NaCl e extrato de carne diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, Ky2, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

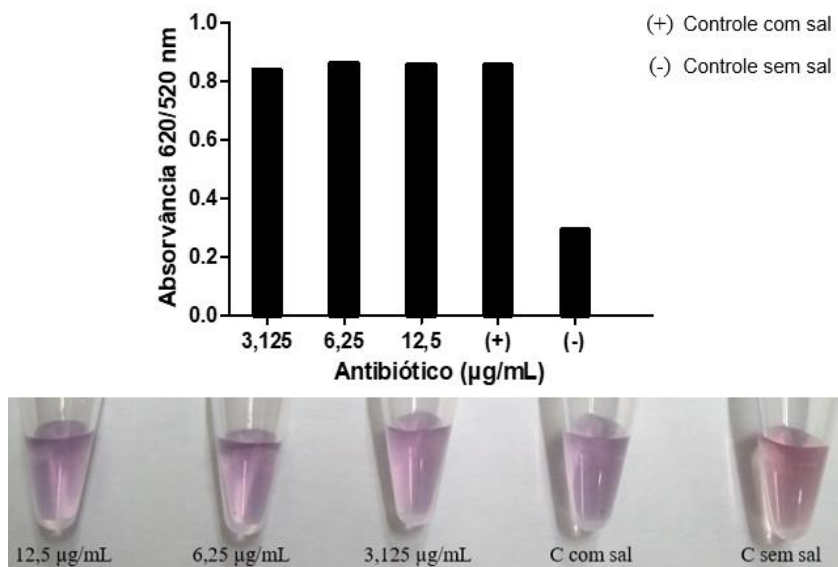


Figura 46: Teste para detecção de tetraciclina em carne usando o aptâmero T20. Diferentes concentrações de tetraciclina foram adicionadas a 2 nmol/L de nanopartículas de ouro, 200 nmol/L de T20, 50 mmol/L de NaCl e extrato de carne diluído 1.000X. Os controles consistiram de nanopartículas de ouro, T20, matriz, 0 ou 50 mmol/L de NaCl. A agregação foi analisada visualmente e por espectrofotometria.

## 6. DISCUSSÃO

As nanopartículas sintetizadas estavam de acordo com os resultados da literatura, com o pico de absorção em 520 nm e coloração avermelhada (Figura 5). Para os testes posteriores, elas foram usadas para uma concentração final de 2 nmol/L. Na ausência de aptâmero, 50 mmol/L de NaCl foi a menor concentração na qual o sistema começou a mudar a coloração de vermelho para azul (Figura 6), e por isso, essa concentração foi utilizada nos testes seguintes. Isso condiz com o utilizado por Song et al. (2011), mas é menor do que o utilizado pelo mesmo grupo em Song et al. (2012). Como os trabalhos dos aptâmeros CAM7 e T20 não fizeram uso de nanopartículas, não foi possível fazer uma comparação.

A concentração de aptâmero necessária para proteger as nanopartículas de ouro de agregarem na presença de 50 mmol/L de NaCl foi de 200 nmol/L, independente do aptâmero testado (Figuras 7 a 11). Essas condições diferem das descritas nos trabalhos de onde foram retirados os aptâmeros. Song et al., (2012) utilizaram a proporção de 100 nmol/L de aptâmero AMP17 para 5 nmol/L de nanopartículas de ouro, mas não fizeram o teste com o AMP4. Song et al., (2011) utilizaram 50 nmol/L de aptâmero Ky2 para 4 nmol/L de nanopartículas de ouro.

Uma vez definidas as concentrações de nanopartículas de ouro, NaCl e aptâmeros, procedeu-se aos testes para a detecção dos antibióticos em água. Os testes realizados com os aptâmeros AMP4 e AMP17 mostraram que a detecção em água para as concentrações de até 12,5 µg/mL de ampicilina não funcionou, pois o controle sem antibiótico e com sal apresentaram uma leve mudança de cor (Figuras 12 e 13). Song et al., (2012) usaram apenas o aptâmero AMP17 em seu trabalho, apesar de selecionar e citar o AMP4. As nanopartículas foram diferentes em tamanho, formato e concentração, o que pode ser uma das causas da diferença nos resultados obtidos pelo grupo. Além disso, a proporção aptâmero/nanopartícula foi diferente e o tempo de incubação com o alvo foi de 1 h, ao invés dos 15 min usados neste trabalho.

Os espectros obtidos com o teste realizado com o aptâmero CAM7 mostraram um deslocamento da amostra contendo 3,125 µg/mL de cloranfenicol, como é esperado quando há a agregação das nanopartículas, sugerindo que o teste funcionou (Figura 14). Porém, no tubo controle sem antibiótico e com sal também houve uma mudança de cor,

podendo causar um resultado falso-positivo, embora a cor não tenha sido alterada no momento de definição da concentração do CAM7 a ser usada (Figura 9). O trabalho de onde foi retirado o aptâmero CAM7 não o utilizou para uma metodologia colorimétrica juntamente com nanopartículas de ouro, portanto não há como fazer uma comparação com os resultados Mehta et al. (2010).

Bons resultados foram conseguidos com o aptâmero Ky2, que se mostrou capaz de detectar até 0,125 µg/mL de kanamicina (Figura 15). Não houve dúvidas na interpretação visual e espectrofotométrica do teste. Apesar de as nanopartículas serem diferentes em tamanho, formato e concentração, além da proporção aptâmero/nanopartícula estar diferente e o tempo de incubação ser reduzido, os resultados foram muito semelhantes aos de Song et al., (2011), mostrando que o protocolo adaptado está adequado para a detecção em água.

Embora a análise espectrofotométrica tenha mostrado a agregação das nanopartículas com 3,125 µg/mL de tetraciclina, o resultado também foi positivo quando as nanopartículas foram incubadas apenas com o aptâmero T20 e sal, ao contrário do observado na Figura 11. Niazi et al., (2008) não utilizaram o aptâmero T20 em um teste colorimétrico com nanopartículas de ouro, o que impede a comparação dos resultados.

Antes de realizar os testes colorimétricos, as matrizes alimentares tiveram que ser processadas e sua influência na agregação das nanopartículas sem o aptâmero foi avaliada em várias concentrações NaCl. As matrizes foram preparadas conforme item 4.8 e os resultados estão representados abaixo (Figuras 17 a 31). O ovo necessitou de uma diluição de um milhão de vezes, enquanto que o soro de leite e o extrato de carne necessitaram de diluições de mil vezes cada. A diluição da amostra não é interessante uma vez que o antibiótico, caso presente na matriz, também será diluído. Deve-se tentar outras formas de processamento da matriz para retirada de interferentes como proteínas e gordura que de preferência, não sejam muito demoradas e de difícil execução.

Os testes com os aptâmeros AMP4 e AMP17 mostraram que a detecção de ampicilina não foi possível mesmo após diluição de mil vezes do soro de leite (Figuras 32 e 33). Moraes (2019) demonstrou que proteínas interagem fortemente com as nanopartículas por meio dos grupos presentes no aminoácido cisteína, o que as protege da agregação. Por isso, existe a necessidade de processar a amostra para retirada dos

interferentes. Neste trabalho, optou-se pela utilização de ácido, uma forma rápida e simples para retirar as proteínas do leite da amostra. Song et al., (2012) processaram o leite de forma diferente. Depois de retirada a gordura, o leite foi diluído, adicionado de acetato de etila, centrifugado e o sobrenadante recuperado. Seguiu-se nova adição de acetato de etila e centrifugação. O acetato de etila foi removido por evaporação por nitrogênio. Essa diferença, aliadas a diferenças na concentração dos reagentes usado no teste, podem ter interferido no resultado final. No caso do CAM7, embora tenha sido visualizado leve alteração no espectro das amostras com cloranfenicol, não se observou diferença visual entre elas (Figura 34).

Os testes realizados com o aptâmero Ky2 mostraram a detecção para as concentrações de até 0,125 µg/mL de kanamicina. Porém, o controle sem antibiótico e com sal também apresentou uma mudança de cor. Nas Figuras 10 e 15, observa-se que os testes funcionaram como esperado, embora eles tenham sido realizados em água. É possível que a quantidade de sal presente no leite, além da colocada no teste, tenha sido alta levando a agregação das nanopartículas. O mesmo foi observado com o T20 (Figura 36).

Quando a matriz alimentar foi ovo, observou-se agregação das nanopartículas e deslocamento do espectro de absorção em todas as amostras contendo antibiótico (Figuras 37 a 41). Porém, ao contrário do esperado, o controle positivo que consistiu da matriz, aptâmeros, nanopartículas e sal também apresentou uma mudança de cor. A matriz na ausência de sal não foi capaz de agregar as nanopartículas (controle negativo). Isso sugere a presença de algum componente da matriz que interfere no teste quando o sal está presente. Ma et al., (2018) utilizaram a metodologia colorimétrica com aptâmeros e nanopartículas de ouro para a detecção de tobramicina em ovo. Houve também diferença no processamento da matriz que fez uso de ácido tricloroacético para precipitação de proteínas totais do ovo, além de ultrasonicação e filtração em membrana de 0,22 µm. Nenhum dos aptâmeros usados neste trabalho foi testado em ovo pelos autores que os descreveram.

Os testes realizados com a matriz carne apresentaram resultados semelhantes à matriz ovo. Novamente, houve mudança de cor do sistema na presença do antibiótico como esperado, porém o mesmo foi observado no controle sem antibiótico e com sal (Figuras 42 a 46). Neste trabalho, optou-se por utilizar uma forma de processamento das matrizes alimentares que fosse mais simples, sem muitas etapas, a fim de não tornar o

processo demorado e custoso. Mas considerando os resultados encontrados, há necessidade de se rever esse procedimento e adotar etapas que ajudem a retirar interferentes. Os aptâmeros testados neste trabalho foram retirados da literatura e usados apenas em teste com água e leite e por isso não há como comparar os resultados obtidos com a matriz carne. Liu et al., (2015) utilizaram extrato de carne para uma detecção feita com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aptâmeros. Nesse trabalho, a matriz foi preparada em solução de extração contendo ácido tricloroacético, *tween* 20, metanol e mercaptoetanol, homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi recolhido e usado no teste após diluição de cinco vezes. Salienta-se que o processamento foi mais complexo que o utilizado neste trabalho.

A tecnologia de aptâmeros vem sendo vista como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de *kits* rápidos de detecção de contaminantes em diferentes amostras. Bons resultados têm sido conseguidos na área de biotecnologia ambiental visando o monitoramento de poluição ambiental. A segurança alimentar é uma outra área que pode se valer dessa tecnologia, mas a complexidade da matriz e a identificação de aptâmeros com alta afinidade a patógenos ou antibióticos, tornam o desafio ainda maior. Atualmente, no mercado existe um *kit* para a detecção de ocratoxina A em trigo, cerveja e vinho (OTA-sense), desenvolvido pela NeoVenturesBiotech. Segundo a empresa, o *kit* tem a sensibilidade equivalente a HPLC e custo semelhante à técnica de ELISA. Resumidamente, o método consiste de uma coluna com aptâmeros imobilizados por onde passa a amostra pré-processada. Após a eluição, o eluato é analisado por fluorimetria. Embora ainda a tecnologia de aptâmeros esteja na sua infância, o OTA-sense exemplifica bem o seu potencial.

## 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, diferentes condições foram testadas para otimizar um método colorimétrico para a detecção de ampicilina, cloranfenicol, kanamicina e tetraciclina por meio de aptâmeros associados a nanopartículas de ouro. A concentração de NaCl foi determinada em 50 mmol/L e a de aptâmeros em 200 nmol/L. Embora os aptâmeros tenham sido retirados da literatura, apenas o Ky2 funcionou como esperado, detectando 0,125 µg/mL de kanamicina em água. Os testes propostos para os outros aptâmeros em matrizes alimentares foram inconclusivos uma vez que mudança de coloração foi vista no tubo contendo aptâmero e sal. Sugere-se otimizar a forma de processar as matrizes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, E. P., Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146, 837–837. doi:10.1038/146837a0.

Alaqad, K., Saleh, T. A. (2016). Gold and silver nanoparticles: synthesis methods, characterization routes and applications towards drugs. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6. doi:10.4172/2161-0525.1000384.

Balsalobre, L. C., Dropa, M., Matté, M. H. (2014). An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1–6. doi:10.1590/s1517-83822014005000033.

Bayraç, A. T., Donmol/Lez, S. I. (2018). Selection of DNA aptamers to *Streptococcus pneumoniae* and fabrication of graphene oxide based fluorescent assay. *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/j.ab.2018.06.024.

Bitas, D., Kabir, A., Locatelli, M., Samanidou, V. (2018). Food sample preparation for the determination of sulfonamides by high-performance liquid chromatography: state-of-the-art. *separations*, 5, 31. doi:10.3390/separations5020031.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Documento de base para discussão regulatória. Brasília, outubro de 2018. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet\\_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5](http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5). Acesso em: 15 de novembro de 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 26 de julho de 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da->

pncrc/PlanoAmostragemPNCRC2018IN.pdf/@@download/file/PlanoAmostragemPNCRC2018IN.pdf. Acesso em: 19 de fevereiro de 2020.

Broom, L. J. (2017). The sub-inhibitory theory for antibiotic growth promoters. *Poultry Science*, 96, 3104–3108. doi:10.3382/ps/pex114.

Chen, M., Yu, Y., Jiang, F., Zhou, J., Li, Y., Liang, C., Dang, L., Lu, A., Zhang, G. (2016). Development of cell-selex technology and its application in cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2079. doi:10.3390/ijms17122079.

Demeu, F. A., Lopes, M. A., Costa, G. M. da, Rocha, C. M. B. M. da, Santos, G. dos. (2016). Effect of daily milk production on the economic impact of mastitis in cattle herds. *Boletim de Indústria Animal*, 73, 53–61. doi:10.17523/bia.v73n1p53.

Dykman, L. A., Khlebtsov, N. G. (2011). Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae*, 3, 2.

Ellington, A. D., Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818–822. doi:10.1038/346818a0.

Esiobu, N., Armenta, L., Ike, J. (2002). Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research*, 12, 133–144. doi:10.1080/09603120220129292.

Fagundes, H. (2003). Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin-new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, 23, 849–853. doi:10.3201/eid2305.161556.

Gould, K. (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 572–575. doi:10.1093/jac/dkv484.

Gu, H., Duan, N., Wu, S., Hao, L., Xia, Y., Ma, X., Wang, Z. (2016). Graphene oxide-assisted non-immobilized SELEX of oxalic acid aptamer and the analytical application of aptasensor. *Scientific Reports*, 6. doi:10.1038/srep21665.

Heiligtag, F. J., Niederberger, M. (2013). The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today*, 16, 262–271. doi:10.1016/j.mattod.2013.07.004.

Hernandez, L., Machado, I., Schafer, T., Hernandez, F. (2015). Aptamers overview: selection, features and applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 1066–1081. doi:10.2174/1568026615666150413153717

Hiltunen, T., Virta, M., Laine, A. L. (2016). Antibiotic resistance in the wild: an evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372, 20160039. doi:10.1098/rstb.2016.0039.

Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2017). Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.

Kim, Y. S., Kim, J. H., Kim, I. A., Lee, S. J., Jung, J., Gu, M. B. (2010). A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1644–1649. doi:10.1016/j.bios.2010.08.046.

Kurjogi, M., Issa Mohammod/Lad, Y. H., Alghamdi, S., Abdelrahman, M., Satapute, P., Jogaiah, S. (2019). Detection and determination of stability of the antibiotic residues in cow's milk. *PLoS ONE*, 14, e0223475. doi:10.1371/journal.pone.0223475.

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, 12, 4–22. doi:10.1177/003335491212700103.

Li, H., Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14036-9.

Liu, C., Lu, C., Tang, Z., Chen, X., Wang, G., Sun, F. (2015). Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles for simultaneous fluorometric determination of oxytetracycline and kanamycin. *Microchimica Acta*, 182, 2567–2575. doi:10.1007/s00604-015-1628-z.

Lobanovska, M., Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90, 135–145.

Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1265–1273. doi:10.1172/jci18535.

MACUGEN (Pegaptanibe sódico): solução para injeção intravítrea. Farmacêutica responsável: Raquel Oppermann – CRF-SP nº 36144. Guarulhos, Pfizer. Bula de remédio.

Mafuné, F., Kohno, J., Takeda, Y., Kondow, T. (2002). Full physical preparation of size-selected gold nanoparticles in solution: laser ablation and laser-induced size control. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106, 7575–7577. doi:10.1021/jp020577y.

Martin, M. J., Thottathil, S. E., Newman, T. B. (2015). Antibiotics overuse in animal agriculture: a call to action for health care providers. *American Journal of Public Health*, 105, 2409–2410. doi:10.2105/ajph.2015.302870.

Mehlhorn, A., Rahimi, P., & Joseph, Y. (2018). Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: a review. *Biosensors*, 8, 54. doi:10.3390/bios8020054.

Melo Jr., M. A., Santos, L. S. S., Gonçalves, M. do C., Nogueira, A. F. (2012). Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, 35, 1872–1878. doi:10.1590/s0100-40422012000900030.

Mehta, J., Van Dorst, B., Rouah-Martin, E., Herrebout, W., Scippo, M.-L., Blust, R., Robbens, J. (2011). In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol. *Journal of Biotechnology*, 155, 361–369. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.043.

Min, K., Jo, H., Song, K., Cho, M., Chun, Y. S., Jon, S., Ban, C. (2011). Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (–) prostate cancers. *Biomaterials*, 32, 2124–2132. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.035.

Mody, V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2, 282. doi:10.4103/0975-7406.72127.

Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. How to overcome the antibiotic crisis, 237–272. doi:10.1007/82\_2016\_499.

Monte, D. F., Lincopan, N., Berman, H., Cerdeira, L., Keelara, S., Thakur, S., Landgraf, M. (2019). Genomic features of high-priority *Salmonella enterica* serovars circulating in the food production chain, Brazil, 2000–2016. *Scientific Reports*, 9. doi:10.1038/s41598-019-45838-0.

Moraes, L. D. (2019). Método para determinação de fluoroquinolonas em águas usando nanopartículas de prata. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

Munita, J. M., Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition, 481–511. doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.

Negahdary, M., Behjati-Ardakani, M., Sattarahmady, N., Heli, H. (2018). An aptamer-based biosensor for troponin I detection in diagnosis of myocardial infarction. *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 8, 167–178.

Niazi, J. H., Lee, S. J., Gu, M. B. (2008). Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 7245–7253. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.033.

Niu, S., Lv, Z., Liu, J., Bai, W., Yang, S., Chen, A. (2014). Colorimetric aptasensor using unmodified gold nanoparticles for homogeneous multiplex detection. *PLoS One*, 9, e109263. doi:10.1371/journal.pone.0109263.

Sadeghi, A. S., Mohsenzadeh, M., Abnous, K., Taghdisi, S. M., Ramezani, M. (2018). Development and characterization of DNA aptamers against florfenicol: Fabrication of a sensitive fluorescent aptasensor for specific detection of florfenicol in milk. *Talanta*, 182, 193–201. doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.083.

Singh, P., Pandit, S., Mokkalpati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., Mijakovic, I. (2018). Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1979. doi:10.3390/ijms19071979

Smith, J. E., Chávez, J. L., Hagen, J. A., Kelley-Loughnane, N. (2016). Design and development of aptamer–gold nanoparticle based colorimetric assays for in-the-field applications. *Journal of Visualized Experiments*. doi:10.3791/54063.

Smith, J. E., Griffin, D. K., Leny, J. K., Hagen, J. A., Chávez, J. L., Kelley-Loughnane, N. (2014). Colorimetric detection with aptamer-gold nanoparticle conjugates coupled to

an android-based color analysis application for use in the field. *Talanta*, 121, 247–255. doi: 10.1016/j.talanta.2013.12.062.

Sobur, M. A., Ievy, S., Haque, Z. F., Nahar, A., Zaman, S. B., & Rahman, M. T. (2019). Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* in poultry, house flies, and pond water in Mymensingh, Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6, 50–53. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f311>.

Song, K.-M., Cho, M., Jo, H., Min, K., Jeon, S. H., Kim, T., Ban, C. (2011). Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. *Analytical Biochemistry*, 415, 175–181. doi:10.1016/j.ab.2011.04.007.

Song, K. M., Jeong, E., Jeon, W., Cho, M., Ban, C. (2012). Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence–colorimetric methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 2153–2161. doi:10.1007/s00216-011-5662-3.

Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B. (2005). FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 83–91. doi:10.1007/s00216-005-3388-9.

Thompson-Crispi, K., Atalla, H., Miglior, F., Mallard, B. A. (2014). Bovine Mastitis: Frontiers in Immunogenetics. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00493

Tuerk, C., Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.

Van Boeckel, T. P., Glennon, E. E., Chen, D., Gilbert, M., Robinson, T. P., Grenfell, B. T., Laxminarayan, R. (2017). Reducing antimicrobial use in food animals. *Science*, 357(6358), 1350–1352. doi:10.1126/science.aao1495.

Xu, C., Ying, Y., Ping, J. (2019). Colorimetric aggregation assay for kanamycin using gold nanoparticles modified with hairpin DNA probes and hybridization chain reaction-assisted amplification. *Microchimica Acta*, 186. doi:10.1007/s00604-019-3574-7.

Wang, Y., Black, K. C. L., Luehmann, H., Li, W., Zhang, Y., Cai, X., Xia, Y. (2013). Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment. *ACS Nano*, 7, 2068–2077. doi:10.1021/nn304332s.

Wu, Y., Huang, P., Wu, F. (2019). A label-free colorimetric aptasensor based on controllable aggregation of AuNPs for the detection of multiplex antibiotics. *Food Chemistry*, 125377. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125377

Zhou, J., Rossi, J. (2016). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 181–202. doi:10.1038/nrd.2016.199.

Zhou, X., Wang, L., Shen, G., Zhang, D., Xie, J., Mamut, A., Zhou, S. (2018). Colorimetric determination of ofloxacin using unmodified aptamers and the aggregation of gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 185. doi:10.1007/s00604-018-2895-2.

Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., Zhang, B. (2017). Recent advances in selex technology and aptamer applications in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2142. doi:10.3390/ijms18102142.