

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica



GILCELIA JANAINA LINO DA SILVA BARBIERI

**Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para
detecção de aflatoxina B1 em alimentos**

Recife

2017

GILCELIA JANAINA LINO DA SILVA BARBIERI

**Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para
detecção de aflatoxina B1 em alimentos**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do título de
Doutor em Inovação Terapêutica.**

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de
Oliveira

Recife
2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Barbieri, Gilcelia Janaina Lino da Silva
Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de aflatoxina B1 em alimentos / Gilcelia Janaina Lino da Silva Barbieri. – Recife: O Autor, 2017.

148 f.: il., fig, tab.

Orientador: Cesar Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências e apêndice

1. Nanotecnologia 2. Aflatoxina 3. Toxicologia I. Andrade, Cesar Augusto Souza de (orient.) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-291

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARBIERI, Gilcelia Janaina Lino da Silva

Título: Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de aflatoxina B1 em alimentos

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 21/03/2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. César Augusto Souza de Andrade

Instituição:

Assinatura:_____

Prof(a). Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Instituição:

Assinatura:_____

Prof(a). Dra. Idjane Santana de Oliveira

Instituição:

Assinatura:_____

Prof(a). Dr. Issac Aarón Morales Frías

Instituição:

Assinatura:_____

Prof(a). Dr. Dr. Kleber Bezerra Alves

Instituição:

Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha
família por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que eu conclua mais essa jornada na minha vida, por me proteger e sempre iluminar os meus caminhos;
- A meu filho Bernardo, meu motivo de viver e de nunca desistir.
- A minha mãe por sempre me apoiar, e me dar força quando necessário, por seu amor, carinho, dedicação e sacrifícios;
- A minha irmã, Gilvanete, por seu amor, carinho, companheirismo;
- Ao meu esposo Frederico, por seu carinho, amor, dedicação. Por sempre me apoiar e permitir que eu nunca desista;
- A minha sogra, meu sogro e minha cunhada por todo carinho, amor, por sempre acreditarem e torcerem por mim;
- A minha amiga Estefani, por toda a amizade, me ajudar nos experimentos e sempre me apoiar;
- A todos os meus familiares que sempre torceram por mim;
- Aos meus orientadores Maria Danielly e César Augusto, agradeço todos os ensinamentos, a dedicação, confiança e amizade;
- A CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

As monocamadas auto organizadas constituem uma forma simples, reprodutível e estável para a imobilização de anticorpos, por isso tem sido bastante utilizada na construção de imunossensores. Dessa forma, representa um ambiente propício para o desenvolvimento de biodispositivos com alta sensibilidade e reprodutibilidade. Neste trabalho foram descritos dois imunossensores baseados em camadas auto organizadas e anticorpos monoclonais (Mab) para detecção de aflatoxina B1 (AFB1) em alimentos. A primeira plataforma foi composta por monocamadas automontadas de cisteína-Mab (cys-Mab) e a segunda plataforma por filmes nanoestruturados de ácido mercaptobenzóico-nanopartículas de ferro funcionalizadas com o grupo amino-Mab (MBA-Fe₃O₄-NH₂-Mab). As técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e de voltametria cíclica (VC) foram utilizadas para avaliar o processo de montagem da plataforma sensora através das modificações na resistência transferência de carga (R_{ct}) e correntes de pico anódica/catódica, respectivamente. Os resultados demonstram uma redução na transferência de carga causado pelo isolamento elétrico dos bioconjugados formados pela interação do anticorpo com a AFB1, que bloqueia a transferência de elétrons da solução de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. O sistema sensor constituído por cys-Mab apresentou resposta linear na concentração de AFB1 entre 0,5 a 3×10^4 ng.mL⁻¹. Enquanto, o segundo sensor apresentou resposta na faixa de concentrações de $2,5 \times 10^2$ a 3×10^4 ng.mL⁻¹. Dessa forma, os dados demonstraram maior sensibilidade do sensor de cys-Mab para detecção da AFB1. Em adição, a técnica de microscopia de força atômica (AFM) permitiu a análise da topografia da superfície dos imunossensores. Portanto, os novos imunossensores propostos representam um instrumento simple com excelente sensibilidade que pode ser utilizado como ferramenta no monitoramento de AFB1 em alimentos.

Palavras-chave: Imunossensor. Aflatoxina B1. Nanotecnologia. Voltamatria Cíclica. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

ABSTRACT

Self-organized monolayers are a simple, reproducible and stable platform to immobilize antibodies, thus has been widely used in the development of immunosensors. Therefore, represents an adequate environment to the development of biodevices with high sensitivity and reproducibility. In this Thesis, two new immunosensors based on self-organized monolayers and monoclonal antibody (Mab) for detection of aflatoxin B1 (AFB1) in food were described. The first one was composed by cysteine-Mab (cys-Mab) and the second platform consisted of a nanostructured film of mercaptobenzoic acid-iron nanoparticles functionalized with the amino-Mab group (MBA-Fe₃O₄-NH₂-MAB). Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (VC) techniques were used to evaluate the assembly process of the sensor platform through evaluation of the charge transfer resistance (R_{ct}) and anodic/cathodic peak currents, respectively. The results demonstrate a reduction in the R_{ct} due to the shielding effect of the interaction of the antibody with AFB1, which blocks the electron transfer of the redox pair. The sensor system composed by cys-Mab showed a linear response for AFB1 concentration ranging from 0.5 to 3×10^4 ng.mL⁻¹. While the second sensor showed response in the range of 2.5×10^2 to 3×10^4 ng.mL⁻¹. Therefore, our results demonstrated a higher sensitivity of the cys-Mab sensor for AFB1 detection. In addition, atomic force microscopy (AFM) technique allowed the morphological analysis of the surface of the immunosensors. Therefore, the proposed immunosensors represent a simple instrument with excellent sensitivity that can be used as a tool in the monitoring of AFB1 in foods.

Keywords: Immunosensor. Aflatoxin B1. Nanotechnology. Cyclic voltammetry. Electrochemical impedance spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química das Aflatoxinas.....	24
Figura 2 -	Esquema da biossíntese das aflatoxinas.....	26
Figura 3 -	Via metabólica da AFB1.....	28
Figura 4 -	Esquema da formação do adutos aflatoxina-DNA.....	29
Figura 5 -	Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.....	35
Figura 6 -	Representação do anticorpo e suas regiões.....	39
Figura 7 -	Representação dos métodos de imobilização de biomoléculas (círculo vermelho com letra B).....	41
Figura 8 -	Estrutura química da cisteína.....	44
Figura 9 -	Estrutura química do ácido mercaptobenzóico.....	45
Figura 10 -	Variação da aplicação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.....	47
Figura 11 -	Esquema representativo de um voltamograma cíclico....	48
Figura 12 -	Modelo de circuito equivalente utilizado em espectroscopia de impedância.....	50
Figura 13 -	Representação da semelhança entre um capacitor de um circuito elétrico (modelo Helmholtz) com a interface eletrodo/solução de uma célula eletroquímica.....	51
Figura 14 -	Diagramas de Nyquist (a) e Bode (b).....	52
Figura 15 -	Representação do princípio de funcionamento do AFM..	53
Figura 16 -	Curva de força em função da distância entre a sonda e a amostra.....	54
Figura 17 -	Representação do funcionamento de um difratômetro de raios X.....	55
Figura 18 -	Difratograma de amostra de titânio de bário hidrotérmico puro, sintetizado a 220°C, por 20 h.....	56
Figura 19 -	Representação esquemática da fabricação do imunossensor imunossensor (Cys-Mab).....	63
Figura 20 -	Representação esquemática da fabricação do imunossensor imunossensor (EAu-MBA-Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -MAB).....	64
Figura 21 -	Imagens de microscopia de força atômica das superfícies dos substratos contendo Cys (a); Cys-MAB (b); Cys-MAB-AFB1 (c) usando modo não contato. Área de varredura 5 × 5 µm.....	69
Figura 22 -	R _{ct} vs concentração da cisteína (a) e concentração do anticorpo (b).....	70
Figura 23-	Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) de cada etapa de imobilização de Cys, Cys-EDC-NHS, Cys-MAB-AFB1 e Cys-MAB-AFB1-BSA.....	72

Figura 24 -	Voltamogramas cíclicos (a), curva de calibração obtida do voltamograma cíclico (b), diagramas de Nyquist de Cys-MAb-AFB1-BSA, sistema-controle negativo, sistema AFB1 nas concentrações de 0.5 e 1 ng mL ⁻¹	74-75
Figura 25 -	Variação da resistência à transferência de elétrons (ΔR_{ct}) (a) e cobertura superfície pela toxina (θ) em função das diferentes concentrações de AFB1.....	78
Figura 26 -	Voltamogramas cíclicos (a), diagramas de Nyquist e variação da resistência a transferência de elétrons (ΔR_{ct}) do imunossensor antes e após a interação com AFB1 em diferentes concentrações de arroz contaminado (c).....	79-80
Figura 27 -	Difratogramas NpsFe ₃ O ₄ (a) e NpsFe ₃ O ₄ -NH ₂ (b).....	81-82
Figura 28 -	Imagens de microscopia de força atômica das superfícies dos substratos contendo MBA (a); MBA-Fe ₃ O ₄ (b); MBA-Fe ₃ O ₄ -MabAFB1 (c); MBA-Fe ₃ O ₄ -MabAFB1-AFB1 usando modo não contato. Área de varredura 10 × 10 μm.....	83
Figura 29 -	Voltamogramas cíclicos (a) e Diagramas de Nyquist (b) de cada etapa da montagem do imunossensor.....	85
Figura 30 -	R_{ct} vs concentração do anticorpo.....	86
Figura 31 -	Diagramas de Cole-Cole do imunossensor após a interação com as seis concentrações de AFB1 e o controle negativo (ocratoxina A) (a); circuito equivalente adotado para o ajuste dos dados de impedância (b) e $\Delta R_{ct}\%$ em função da concentração de AFB1 (c).....	87-88
Figura 32 -	Diagrama de Cole-Cole (a) e $\Delta R_{ct}\%$ (b) do imunossensor após a interação com AFB1 em diferentes concentrações de amendoim contaminado.....	90-91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos....	31
Tabela 2 -	Valores dos elementos do circuito equivalente do ajuste dos resultados de impedância.....	77
Tabela 3 -	Valores dos elementos do circuito equivalente do ajuste dos resultados de impedância.....	89

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Ac	Anticorpo
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFB2a	Aflatoxina B2a
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFL	Aflatoxicol
AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AFM1	Aflatoxina M1
AFP1	Aflatoxina P1
AFQ1	Aflatoxina Q1
Ag	Antígeno
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de Prata
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APTS	3-aminopropiltriethoxissilano
BSA	Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa
CYP1A2	Citocromo P1A2
CYP3A4	Citocromo P3A4
CYP3A5	Citocromo P3A5
CYP3A7	Citocromo 3A7
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DRX	Difração de Raios X
D	Tamanho médio da partícula

d	Distância entre os planos atômicos do cristal
E	Potencial
EAu	Eletrodo de ouro
EDC	1- [3- (dimetilamino) propil] -3-etilcarbodiimida
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EQM	Eletrodos Quimicamente Modificados
Fab	Porção variável
Fc	Porção cristalizável
GTS	Glutathione-S-transferase
i	Corrente resultante
IBM	<i>International Business Machines</i>
LMT	Limite Máximo Tolerado
Mab	Anticorpos Monoclonais
MBA	Ácido Mercaptobenzóico
Mtxs	Micotoxinas
n	Número inteiro correspondente a ordem de difração
NHS	N-hidroxissuccinimida
Nps	Nanopartículas
NPsFe ₃ O ₄	Nanopartículas Magnéticas
NPsFe ₃ O ₄ -NH ₂	Nanopartículas de óxido de ferro modificadas com um grupo NH ₂
O	Forma oxidada do analito
p/v	Peso/volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIM	Polímeros de Impressão Molecular
R	Forma reduzida do analito
R _B	Resistência à transferência de carga do biosistema Cys-MAb-AFB1
R _C	Resistência a transferência de carga das diferentes concentrações de AFB1 após a interação com o

	imunossensor
RPM	Rotações por minuto
SAM	Monocamadas Auto-organizadas
TFS	Tampão fosfato de sódio
v/v	Volume/volume
VC	Voltametria Cíclica

LISTA DE SÍMBOLOS

ϕ	Diâmetro
$ Z $	Módulo de impedância
Cdl	Capacitância de dupla camada elétrica
F	Força de atração
F_o	Constante de Mola
k	Constante elástica
$^{\circ}C$	Grau Celsius
Q	Elemento de fase constante
R_{ct}	Resistência à transferência de elétrons
R_{Ω}	Resistência ôhmica da solução
W	Impedância de Warburg
Z_f	Impedância faradaica
Z_{im}	Impedância imaginária
Z_{re}	Impedância real
θ	Cobertura da superfície ou ângulo de difração
ΔR_{ct}	Variação da resistência à transferência de elétrons
Ω	Ohm
φ	Ângulo de fase
ω	Frequência
λ	Comprimento de onda dos raios X incidentes
κ	Constante dependente da forma do cristalino
β	Largura da metade do pico de difração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Micotoxinas.....	22
2.2	Aflatoxina B1.....	23
2.2.1	Biossíntese da aflatoxina B1.....	25
2.2.2	Toxicologia.....	27
2.2.3	Regulamentação para Aflatoxinas.....	30
2.2.4	Métodos de detecção de Aflatoxina B1.....	32
2.3	Biossensores.....	34
2.3.1	Classificação dos sistemas de transdução.....	35
2.3.2	Classificação dos Biossensores.....	37
2.3.2.1	Imunossensores.....	38
2.3.3	Técnicas para imobilização de biomoléculas.....	39
2.3.4	Aplicações dos Biossensores.....	41
2.4	Eletrodos Quimicamente Modificados.....	43
2.5	Técnicas Eletroquímicas.....	46
2.5.1	Voltametria Cíclica.....	46
2.5.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	48
2.6	Microscopia de Força Atômica.....	52
2.7	Difração de raio X.....	55
3	OBJETIVOS	58
3.1	Objetivo Geral	59
3.2	Objetivos Específicos	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1.1	Materiais.....	61
4.1.2	Síntese das nanopartículas magnéticas.....	61
4.1.3	Construção dos imunossensores.....	62
4.1.3.1	Plataforma baseada em SAM de Cys-Mab.....	62
4.1.3.2	Plataforma baseada em SAM de MBA-Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -Mab-AFB1.....	63
4.1.4	Preparação das amostras.....	65
4.1.5	Medidas eletroquímicas.....	65
4.1.6	Análises de Microscopia de Força Atômica.....	65
4.1.7	Análise de difração de raios X.....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67

5.1	Biossensor baseado em monocamadas de cisteína e anticorpo monoclonal para detecção específica de aflatoxina B1 em arroz.....	68
5.1.1	Caracterização topográfica.....	68
5.1.2	Caracterização eletroquímica do imunossensor.....	69
5.1.3	Detecção da Aflatoxina B1.....	73
5.1.4	Análise das Amostras.....	78
5.2	Imunossensor eletroquímico baseado em monocamada auto-organizada de ácido mercaptobenzóico e nanopartículas de óxido de ferro para detecção de aflatoxina b1 em amendoim.	81
5.2.1	Caracterização das NpsFe ₃ O ₄ -NH ₂ por difração de raios X.....	81
5.2.2	Análises de AFM.....	82
5.2.3	Caracterização Eletroquímica.....	83
5.2.4	Detecção impedimétrica da AFB1.....	86
5.2.5	Análise do amendoim.....	90
6	CONCLUSÕES.....	92
	PERSPECTIVAS.....	94
	REFERÊNCIAS.....	96
	APÊNDICES.....	115

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A aflatoxina B1 (AFB1) é um metabólito secundário tóxico produzido pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, encontrada em uma variedade de produtos agrícolas, como amendoim, arroz, milho, dentre outros. (MA et al, 2016). Esse composto é considerado como a mais potente substância hepatocarcinogênica e, além disso, também tem sido atribuída propriedade genotóxica e imunotóxica. Portanto, a sua ingestão representa um grande perigo a saúde humana e animal (ZHANG et al, 2016).

A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) considera a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o método oficial para a detecção da AFB1 alimentos (SENGUL, 2016). Este método apresenta uma excelente precisão e sensibilidade, entretanto exige extrema limpeza dos extratos alimentares para análise, equipamentos de elevado custo, técnicos especializados, grandes volumes de reagentes, dificultando o uso rotineiro desta metodologia em análises rápidas. Portanto, a partir do exposto, é perceptível a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de detecção rápida de AFB1 em alimentos, como o objetivo de identificar com rapidez os produtos agrícolas contaminados antes de chegarem ao consumidor final.

Com o avanço da nanotecnologia, os imunossensores tornaram-se uma alternativa competitiva as metodologias clássicas. Uma vez que apresentam alta especificidade, sensibilidade, capacidade de miniaturização, mobilidade e rapidez nas análises. Portanto, um imunossensor para detecção de AFB1 representa uma ferramenta bastante promissora no auxílio ao controle de qualidade de alimentos e bebidas.

Atualmente, eletrodos quimicamente modificados (EQM) têm sido utilizados na fabricação dos imunossensores objetivando uma melhor sensibilidade do sistema. Desta forma, monocamadas auto-organizadas (SAM) cisteína (Cys) e de ácido mercaptobenzóico (MBA) juntamente com

nanopartículas magnéticas (NPsFe₃O₄) foram alvos de estudo do presente trabalho.

Portanto, o presente trabalho desenvolveu dois imunossensores para detecção de AFB1 em alimentos. O primeiro consistiu de um sensor baseado em SAM de Cys e anticorpo monoclonal para detecção de AFB1 em arroz e o segundo representa uma plataforma de SAM de MBA e NPsFe₃O₄ modificadas com NH₂ para detecção de AFB1 em amendoim.

Esta tese, foi estruturada em oito capítulos e um apêndice, como seguem:

- No primeiro capítulo é apresentada a introdução, onde foi destacada a AFB1 como um dos principais contaminantes de alimentos e a importância da garantia da segurança alimentar. Além disso, foi discutida a necessidade de construção de novos instrumentos de análise físico-química de alimentos com boa sensibilidade e rapidez.
- O segundo capítulo trata da revisão da literatura sobre Mtx, AFB1, métodos de detecção da AFB1, imunossensores, eletrodos quimicamente modificados, técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) e microscopia de força atômica.
- No terceiro capítulo são descritos os objetivos geral e específicos desta Tese.
- No quarto capítulo foi descrita a metodologia utilizada para o desenvolvimento das duas plataformas sensoras é apresentado o imunossensor baseado em SAMs de Cys e anticorpo monoclonal para a detecção de AFB1 em arroz.
- No quinto capítulo é exposto o imunossensor baseado em SAM de MBA e Fe₃O₄NPs quimicamente modificadas para a detecção de AFB1 em amendoim.
- O sexto e sétimo capítulos constam as conclusões desta tese e as perspectivas, respectivamente.

- No oitavo capítulo temos as referências bibliográficas utilizadas nesta tese.
- No apêndice desta Tese é apresentada a publicação dos deste trabalho na forma de artigo na revista *Journal of the Brazilian Chemical Society* e o artigo intitulado Impedimetric nanoimunossensor for aflatoxin B1 detection in peanut com os dados finais que ainda será submetido.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Micotoxinas

Micotoxinas (Mtxs) é uma expressão derivada da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxican” que significa toxinas. Essas substâncias são produzidas por um grande número de fungos, sendo denominadas de metabólitos secundários, pois são dispensáveis ao crescimento e desenvolvimento desses seres vivos (BENETT e KLICH, 2003; AUDENAERT et al, 2013).

As Mtxs com maior importância na área de alimentos são: a) Aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; b) Ocratoxinas produzidas pelo *A. ochraceus* e algumas espécies do gênero *Penicillium*; c) Fusariotoxinas (tricotecenos, zearalenona, fumosinas) sintetizadas por diversas espécies de *Fusarium*; e, d) Patulina produzida por espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys* (DILKIN, 2002; PATERSON et al, 2004).

Essas substâncias tóxicas podem contaminar os alimentos durante toda a cadeia produtiva levando a grandes perdas econômicas (DINÇKAYA et al, 2011; ZAIN, 2011). Além das perdas econômicas, os alimentos contaminados quando ingeridos pelo homem ou animais podem desencadear doenças chamadas de micotoxicoses. Danos à saúde causados pelas Mtxs vão de câncer, mutações, nefropatias, diminuição ou até mesmo inibição da fertilidade, além de morte (ZAIN, 2011).

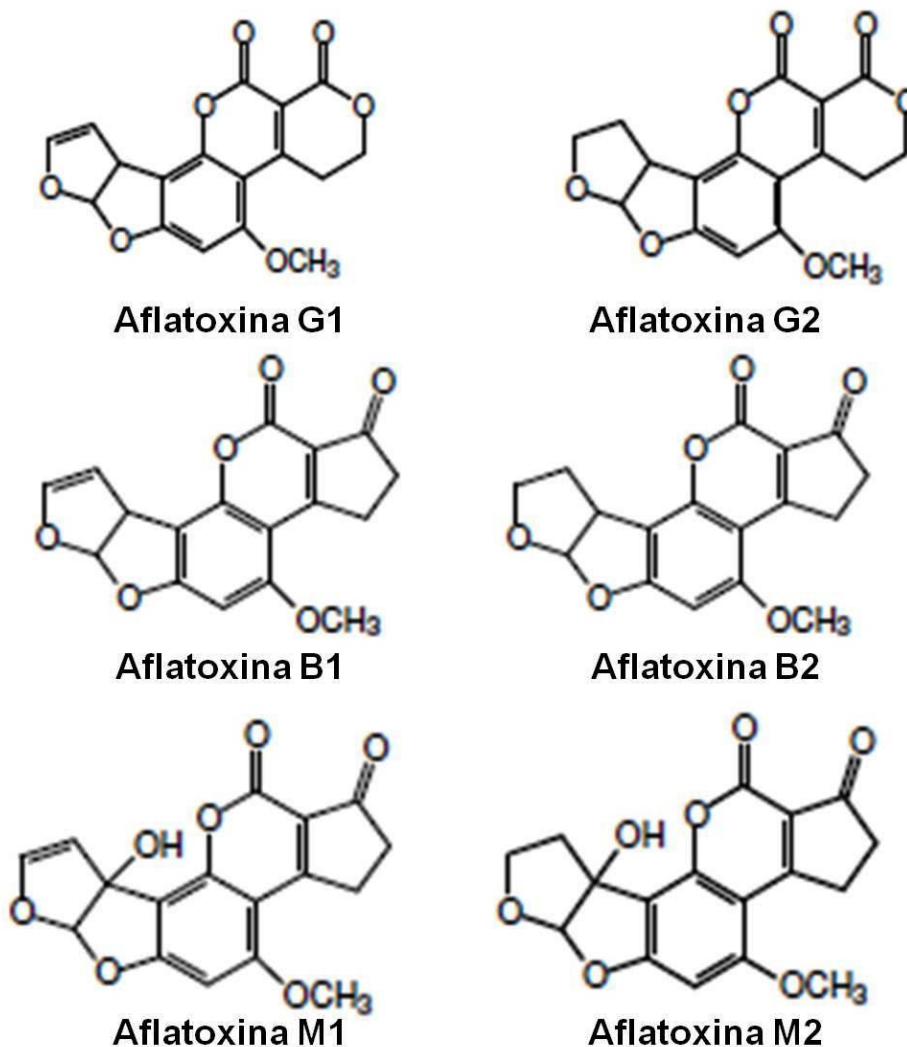
É importante frisar que esses efeitos dependem da dose e da frequência de ingestão das Mtxs. Os mesmos podem apresentar-se de forma aguda devido ao consumo de doses elevadas ou subaguda resultado de doses menores (BENNETT e KLICH, 2003; MURPHY et al, 2006; SHEPHARD, 2008). Nesse contexto, é possível perceber que as Mtxs representam um enorme problema de caráter econômico e de saúde pública.

2.2 Aflatoxina B1

As aflatoxinas são um grupo de Mtxs produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (LOPEZ et al, 2001). Os primeiros relatos de aflatoxicoses surgiram no início da década de 60 quando ocorreu na Inglaterra a morte de vários perus jovens (BENNETT e KLICH, 2003). A princípio, a causa era desconhecida e essa elevada mortalidade foi atribuída a “Doença X do peru”. Entretanto, as investigações realizadas demonstraram que essas aves sofreram de uma hepatite aguda necrosante decorrente da ingestão de ração a base de amendoim. Esta por sua vez estava contaminada com uma toxina produzida pelo *Aspergillus flavus* (aflatoxina) proveniente do Brasil e África (RAWAL e COULOMBE, 2011).

De acordo com a estrutura química, as aflatoxinas são derivados difurocumarinos que apresentam fluorescência sob luz ultravioleta a $\lambda = 365$ nm, sendo classificadas com base na cor da fluorescência e na mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada: B1 e B2 para a cor azul (B – *blue*) e G1 e G2 para a verde (G – *green*). Quimicamente, a aflatoxina G difere da B, pela presença de um anel 3-lactona no lugar no anel ciclopentenona. Além disso, as AFB1 e G1 apresentam uma dupla ligação 8,9 na configuração de um éter vinil no anel terminal furano, nas séries B2 e G2 essa estrutura não está presente (JAIMEZ, 2000; RAWAL e COULOMBE, 2010).

Essas diferenças estruturais também promovem diferenças na atividade das Mtxs. De forma geral a B1 e G1 são consideradas carcinogênicas e mais tóxicas que a B2 e G2. Já as Aflatoxinas M1 e M2 são produzidas a partir da biotransformação das Aflatoxinas B1 e B2 em substâncias hidroxiladas e recebem essa nomenclatura por serem encontradas no leite (*Milk*) (Fig. 1) (RICHARD, 2007).

Figura 1 – Estrutura química das Aflatoxinas.

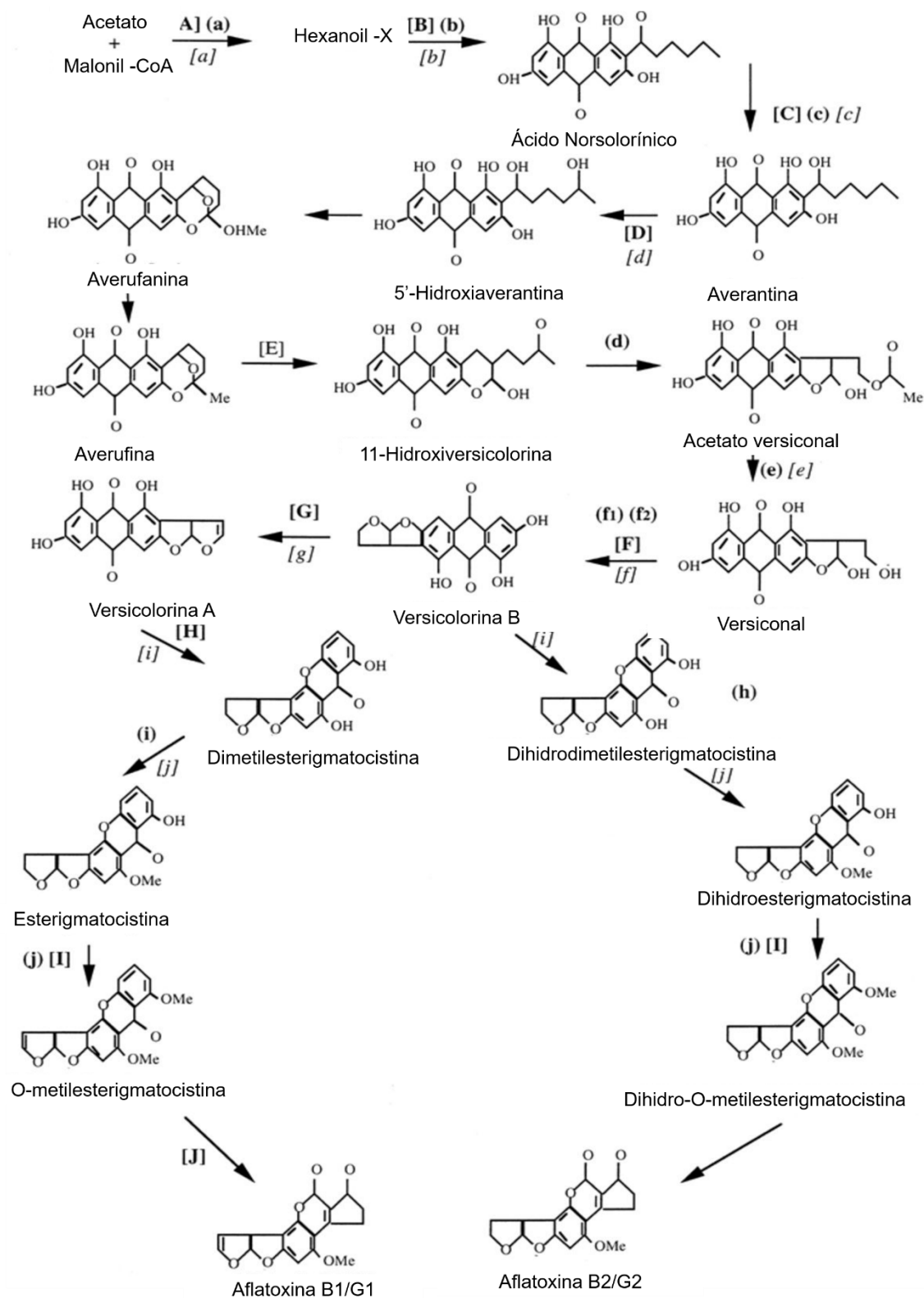
Fonte: FOGUEL (2011).

A AFB1 é uma Mtx termorresistente de fórmula C₁₇H₁₂O₆ e peso molecular de 312,28 g.mol⁻¹, apresenta alto ponto de fusão, sendo destruída a temperatura igual ou superior a 268°C. É um composto químico solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, metanol, dimetilsulfóxido e acetonitrila. Esta substância é instável na presença de radiação ultravioleta, oxigênio e sob condições extremas de pH (3 > pH > 10) (SILVA, 2005). A umidade relativa do ar acima de 85% e temperatura em torno de 27°C são fatores que favorecem a síntese de AFB1 (PRADO, MATTOS e PEREIRA, 1989).

A AFB1 é encontrada com frequência em amendoim, cereais, oleaginosas e especiarias. A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, durante a colheita, armazenamento e transporte (BRAGA, CARDOSO e MACÊDO, 2002). Diversos estudos têm relatado que essa Mtx apresenta propriedades carcinogênica, teratogênica, mutagênica e imunossupressora (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993; SHARMA, 1993; HANIOKA et al, 2012).

2.2.1 Biossíntese da Aflatoxina B1

A via biossintética da AFB1 envolve diversas reações bioquímicas (Fig. 2). O primeiro passo inicia-se com a formação do henanoil-CoA pela associação do acetato com o malonil-CoA catalisada pela enzima ácido graxo sintetase. Na sequência a enzima policetideo sintase o converte em ácido norsolorínico. Este por sua vez, após diversas conversões enzimáticas é transformado em versicolorina B, último metabólito comum na biossíntese das aflatoxinas. A partir deste ponto a via pode seguir dois caminhos distintos, um deles levará a formação de ABF1/B2 e o outro a AFG1/G2. Para sintetizar a AFB1 este metabolito segue a seguinte sequência de conversões: versicolorina A; dimetilesterigmatocistina; esterigmatocistina; O-metilesterigmatocistina; aflatoxina B1 (SWEENEY e DUBSON, 1999).

Figura 2 – Esquema da biossíntese das aflatoxinas.

Fonte: SWEENEY e DUBSON (1999).

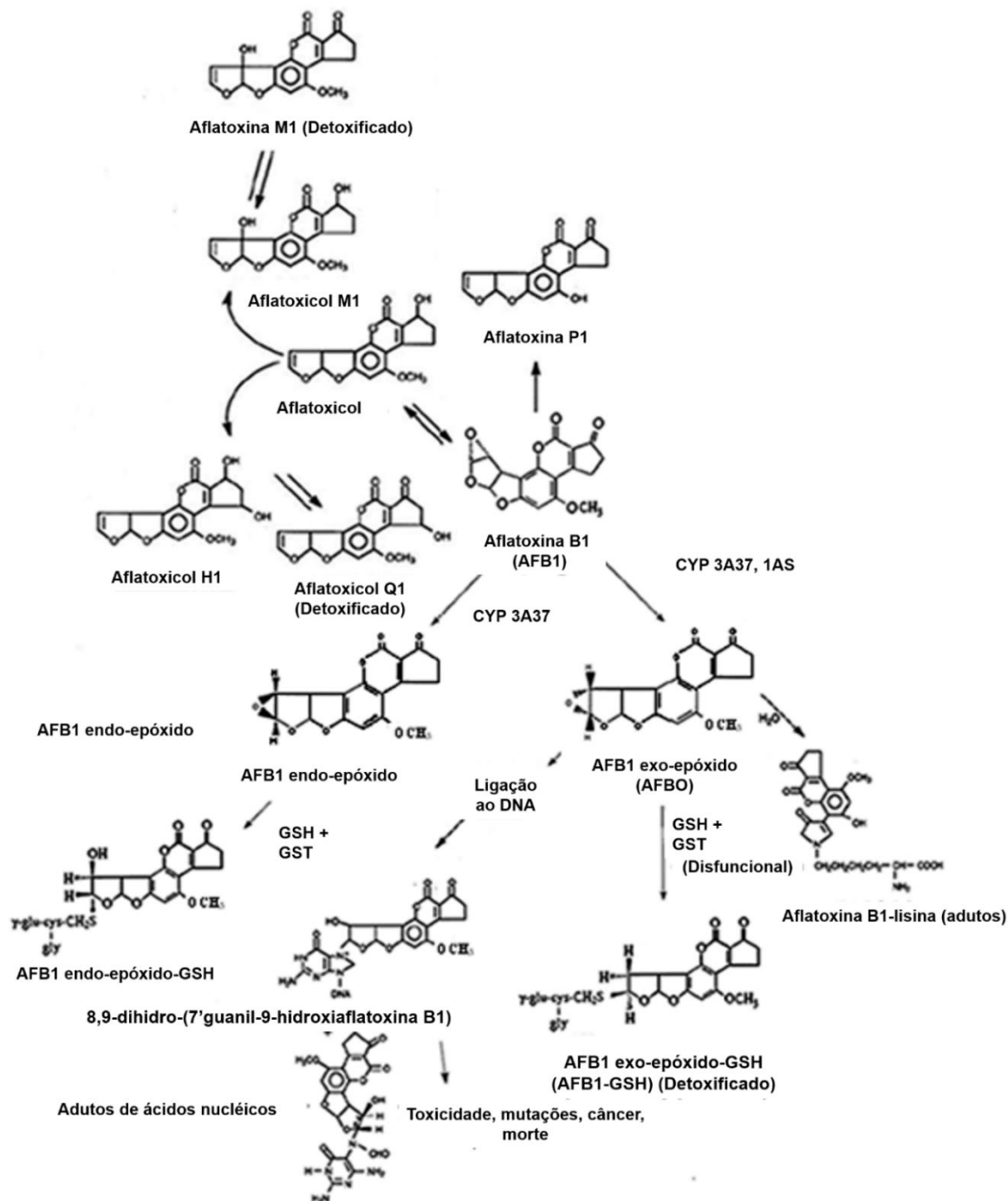
2.2.2 Toxicologia

A AFB1 devido a sua alta lipossolubilidade e baixo peso molecular é absorvida de forma rápida pelo trato gastrointestinal (IARC, 2002). Esta ocorre por difusão passiva e após absorção é distribuída em pequenas quantidades nos diversos órgãos, sendo o fígado a principal rota de detoxificação. A biotransformação consiste de um importante processo de eliminação de substâncias tóxicas do organismo. Através desse mecanismo, agentes nocivos são transformados em compostos menos reativos para serem eliminados.

A biotransformação hepática da AFB1 é mediada por um conjunto de enzimas microssomais pertencentes à família do citocromo P450 (CYP1A2, 3A4, 3A5 e 3A7). A ação das diferentes enzimas pode promover distintas reações na AFB1, nas reações de hidroxilação ocorre formação das aflatoxinas M1 (AFM1) e Q1 (AFQ1), a hidratação forma B2a (AFB2a), a reação de o-demetilação produz a aflatoxina P1 (AFP1), já a redução da AFB1 produz o aflatoxicol (AFL) e a reação de epoxidação produz o composto 8,9 epóxido ou AFB1-epóxido (Fig. 3) (BIEHL e BUCK, 1987). O metabólito AFB1-epóxido ainda pode se conjugado com a glutathione redutase pela ação da enzima glutathione-S-transferase (GTS), representando outra importante forma de detoxificação da AFB1 pelo organismo humano (SANTELLA, 2007).

A biotransformação da AFB1 induz a chamada “ativação metabólica” da AFB1, a qual produz substâncias ainda mais tóxicas, como é o caso do composto AFB1-epóxido (HUSSEIN E BRASEL, 2001). Este metabólito é o responsável pela atividade carcinogênica e mutagênica da AFB1, pois tem a capacidade de se ligar ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e induzir a modificação da sua estrutura e atividade biológica. Dessa forma, tem sido sugerido que a AFB é um pró-cancerígeno, pois para manifestar seus efeitos tóxicos, esta Mtx requer primeiro uma bioativação (OGIDO, 2003).

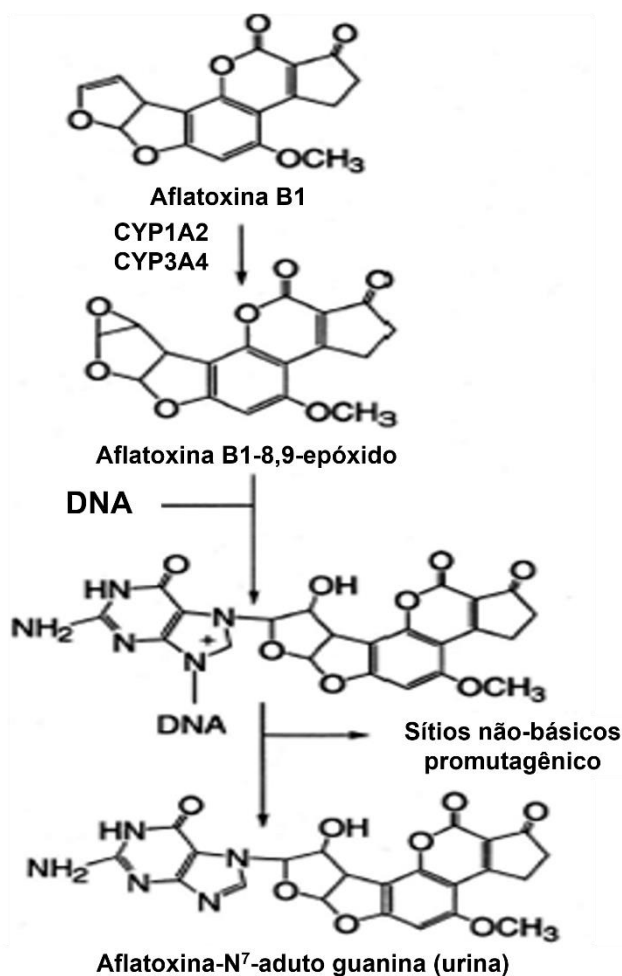
Figura 3 –Via metabólica da AFB1.



Fonte: BIEHL e BUCK (1987)

Quando o AFB1-epóxido liga-se ao DNA ocorre à formação de adutos (lesão bioquímica primária) (WILD e MONTESANO, 2009). Os quais se originam através de uma ligação covalente do carbono C8 do AFB1-epóxido com o nitrogênio N7 dos resíduos de guaninas da molécula de DNA (Fig. 4). Este complexo durante o processo de replicação do DNA se intercala causando mutação (substituição da base nitrogenada guanina por timina), ao nível do códon 249 do gene supressor de tumores p53. Essa alteração prejudica a atividade desse gene, acelerando a proliferação celular e o processo de formação de tumores. Esse tipo modificação de tem sido observado em diversos tipos de carcinomas, principalmente no hepático (STEYN e STANDER, 1999; FERREIRA et al, 2006).

Figura 4 – Esquema da formação do adutos aflatoxina-DNA.



Fonte: MCGLYNN et al (2003)

O ácido ribonucléico e as proteínas são outras estruturas que podem formar adutos e conseqüentemente provocar morte celular decorrente da inativação de macromoléculas essenciais às células. Além disso, a quantidade de adutos formados e a ocorrência de tumores hepáticos demonstrou uma relação diretamente proporcional com a dose ingerida de AFB1 (FERREIRA et al, 2006). Considerando os resultados observados em modelos animais e evidências epidemiológicas encontradas em humanos a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer considera a AFB1 como um carcinógeno humano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

Outra característica da AFB1 é de promover a teratogênese e alguns dos efeitos decorrentes deste processo foram observados em estudos realizados com animais (WANGIKAR et al, 2005; NIKNEJAD et al, 2012). Menor número de nascimentos vivos, baixo peso médio dos nascidos vivos, atraso no desenvolvimento físico, malformação do esqueleto e sistema nervoso, fenda palatina e imunossupressão são algumas das alterações fetais observadas (KIHARA et al, 2000; WILD e TURNER, 2002).

2.2.3 Regulamentação para Aflatoxinas

Tendo em vista o grande potencial da AFB1 em causar danos à saúde, alguns países decidiram estabelecer o limite máximo da Mtx em alimentos (Tabela 1). A legislação europeia estabelece como a quantidade máxima de AFB1 2µg/kg, onde acima desse nível, manifestações tóxicas podem surgir induzindo o câncer no fígado (CASTILLO et al, 2015).

Até recentemente, o Brasil não possuía uma legislação própria sobre os limites máximos de Mtxs tolerados nos alimentos (NUNES, 2008). Em 2011, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aprovou o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados de Mtxs em alimentos, a resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Nesse documento fica disposto o limite máximo tolerado (LMT) de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1

permitido para diversos tipos de alimentos, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos.

País	Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/Kg)
Brasil	Aflatoxina M1	Leite fluido	0,5
		Leite em pó	5
		Queijos	2,5
	Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada maltada	5
		Feijão	5
		Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
		Frutas desidratadas e secas	10
		Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
		Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
		Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
		Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
		Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
		Amêndoas de cacau	10
		Produtos de cacau e chocolate	5
		Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre); Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
		Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
		Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
União europeia	Aflatoxina B1	Cereais e produtos processados	2
	Aflatoxinas (total)	Cereais e produtos processados	4
Austrália	Aflatoxinas (total)	Todos os alimentos	5
Japão	Aflatoxinas (total)	Todos os alimentos	10
Singapura	Aflatoxinas (total)	Todos os alimentos	0
Suécia	Aflatoxinas (total)	Todos os alimentos	5
Estados unidos	Aflatoxinas (total)	Todos os alimentos	20
Alemanha	Aflatoxina B1	Todos os alimentos	2
	Aflatoxinas (total)	Todos os alimentos	4
	Aflatoxinas (total)	Alimentos infantis (cereais, leite, dentre outros)	0,05

Fonte: Adaptado de Fonseca (2016)

Devido às sérias implicações que a presença de aflatoxinas pode conferir para a saúde dos seres humanos e animais, é de fundamental importância a manutenção da qualidade dos alimentos. A qual pode ser alcançada através da utilização de um programa de monitoramento de Mtxs, o qual constitui um procedimento prático, capaz de garantir a qualidade sanitária do alimento, através da utilização de técnicas de análise adequadas.

2.2.4 Métodos de detecção de Aflatoxina B1

O monitoramento da AFB1 é de extrema importância para garantir a segurança do consumidor. Os principais métodos utilizados na detecção de AFB1 são cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (CL-EM) (IAMANAKA, OLIVEIRA E TANIWAK, 2010). Estas análises cromatográficas são consideradas os métodos oficiais na determinação de aflatoxinas e a CCD e CLAE são os métodos mais utilizados para determinar quantitativamente aflatoxinas (KOLOSOVA et al, 2006).

De forma geral, a cromatografia consiste numa técnica utilizada para separar componentes de uma matriz complexa, como por exemplo, um alimento. Nessa ferramenta a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, líquido ou um fluido supercrítico (fluido denso formado a partir do aquecimento de um gás acima da temperatura crítica juntamente com a compressão acima da pressão crítica). Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada na coluna ou em uma superfície sólida. Os diferentes tipos de cromatografia surgem das diferenças entre as fases utilizadas e os mecanismos de separação envolvidos (CECCHI, 2003).

A CCD representa a técnica mais simples e econômica, através da qual é possível obter de forma rápida e significativa a separação das Mtxs a partir de uma mistura complexa. Essa característica faz com que esta técnica

apresente boa especificidade e sensibilidade. Apesar de ser uma metodologia utilizada em processo de triagem de Mtxs, são verificadas variações significativas na reprodutibilidade entre as análises (CAST, 2003; KOLOSOVA et al, 2006). A CLAE é a metodologia mais utilizada na determinação de Mtxs, pois consegue identificar baixos níveis de contaminação revelando uma excelente sensibilidade e representando um bom método quantitativo. O mesmo é adotado pela AOAC como método oficial para identificação de Mtxs em diversos tipos de alimentos (SENGUL, 2016). A CL-EM é um método rápido e prático e representa uma poderosa ferramenta para triagem, identificação e mensuração de um grande número de Mtxs, sem a necessidade de manipulação pós-coluna (PITTET, 2005).

As técnicas cromatográficas são consideradas o padrão ouro na determinação de Mtxs. Contudo, as suas limitações são aparato instrumental de alto custo, técnicos especializados, utilização de solventes tóxicos, extrema limpeza das amostras, além de exigir tempo para obtenção dos resultados (CHU et al, 1988; SYDENHAM e SHEPHARD, 1996; STROKA e ANKLAM, 2002).

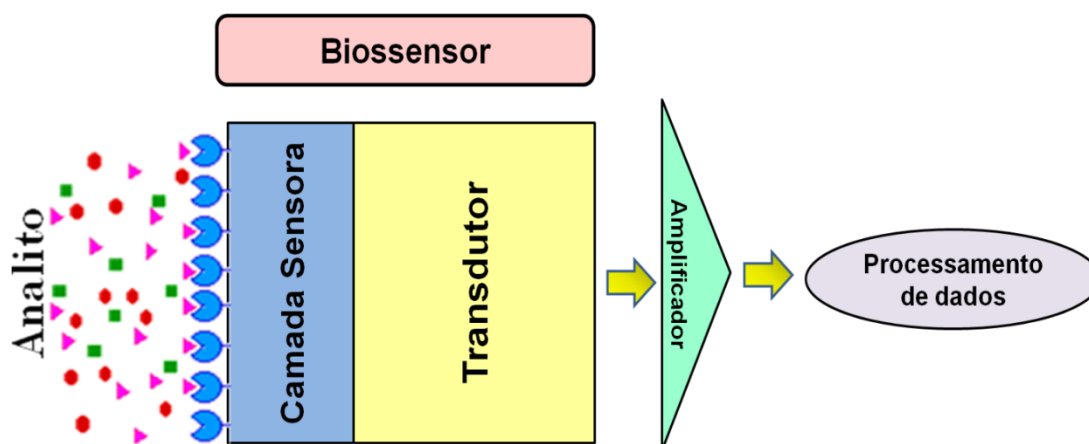
Nesse contexto, os imunoenaios tornaram-se uma ferramenta analítica alternativa para a análise de Mtxs em alimentos, destacando-se o ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*). Esta técnica é desenvolvida em microplacas contendo vários poços onde são depositados os reagentes e baseia-se na interação antígeno-anticorpo. A reação ocorre por meio da identificação de anticorpos e/ou antígenos através de anticorpos marcados com uma enzima, de maneira que o substrato sofre uma reação enzimática que resulta na modificação da cor do cromógeno. O produto da reação, além de colorido, é insolúvel para não difundir do local da formação (FRANK, 2004). Apresenta algumas vantagens como rapidez, boa sensibilidade e simplicidade, entretanto pode apresentar algumas desvantagens em relação a alguns tipos de alimentos, pois podem ocorrer interações inespecíficas do anticorpo com os constituintes do alimento como ácidos graxos e proteínas (HEFLE, 1995; BARNA-VETRO et al, 1996).

Desta forma, a partir do exposto é perceptível a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas destinadas à detecção de AFB1 em alimentos que superem as limitações dos métodos atuais. Nesse contexto, os imunossensores representam uma alternativa promissora para a detecção rápida, simples e com boa sensibilidade da AFB1.

2.3 Biossensores

Os biossensores são instrumentos analíticos que apresentam uma molécula biológica ou biomimética conectado a um transdutor capaz de reconhecer um agente específico. A molécula de bioreconhecimento é capaz de detectar a presença, a atividade ou a concentração da amostra em análise (D'ORAZIO, 2003). A camada sensora pode ser constituída de qualquer tipo de elemento capaz de ligar-se a um substrato alvo. Destacam-se como elementos de reconhecimento, os microrganismos, anticorpos, antígenos, oligonucleotídeos, lectinas, enzimas, aptâmeros e polímeros de impressão molecular – PIM (matrizes sintetizadas, que possuem a capacidade de reconhecer e interagir com a molécula alvo) (D'ORAZIO, 2003). A escolha do material a ser utilizado como camada sensora e do elemento de transdução dependem das características dos compostos que serão analisados e do próprio elemento de bioreconhecimento, respectivamente.

O princípio de detecção é baseado na interação entre a molécula sensora e o analito (Fig. 5). Após esta ligação específica ocorrem alterações de algumas propriedades físico-químicas que são captadas e transformadas em um sinal elétrico proporcional as concentrações da substância alvo pelo transdutor. As principais mudanças visualizadas são alterações de pH, transferência de elétrons, alteração de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons específicos (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003).

Figura 5 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.

Fonte: SILVA (2013)

2.3.1 Classificação dos sistemas de transdução

Os transdutores eletroquímicos apresentam a propriedade de mensurar as alterações eletroquímicas decorrentes da reação de bioreconhecimento (CONROY et al, 2009). Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados em quatro classes, potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e impedânciométrico. Na primeira, uma corrente elétrica constante é aplicada enquanto o transdutor faz a leitura da diferença de potencial produzida entre os dois eletrodos. No caso do amperométrico, quando um potencial elétrico é aplicado ocorre processo de oxido-redução das espécies eletroativas que geram uma corrente, sendo esta mensurada. Os biossensores condutimétrico e impedânciométrico fazem a leitura das alterações de condutância após a aplicação de um potencial alternado e detecta a variações de impedância do eletrodo, respectivamente. (D’ORAZIO, 2003; RUMAYOR, 2005; RAHAIE e KAZEMI 2010).

Os biossensores de fibra óptica, ressonância de plásmons e de ondas evanescentes são denominados de biossensores ópticos. Apresentam como

princípio as alterações na absorção, luminescência, fluorescência, dispersão ou índice de reflexão da luz após interação físico-química do analito com a camada sensora (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003).

Os sensores de fibra óptica consistem de uma fibra óptica onde em uma das extremidades é imobilizada a molécula sensora e na outra o substrato alvo. A detecção é realizada por meio de mudanças captadas por um marcador opticamente ativo. Corantes sensíveis ao pH, a concentração de oxigênio, peróxido de hidrogênio, moléculas fluorescentes e bio ou quimioluminescentes são exemplos de marcadores que podem ser utilizados com essa finalidade (MELLO e KUBOTA, 2002; RUMAYOR et al, 2005).

A ressonância de plásmons de superfície é um evento óptico que ocorre quando a luz polarizada interage com filmes finos metálicos. Este gera um campo evanescente que excita os plásmons da superfície, que são oscilações eletromagnéticas que se propagam na interface prisma/metál para um determinado ângulo de incidência da luz, chamado de ângulo de ressonância. Este, por sua vez modifica-se após o processo de bioreconhecimento proporcionalmente a concentração do analito (HALL, 2002; RUMAYOR et al, 2005).

Alguns sensores se baseiam no fenômeno de ondas evanescentes que são decorrentes da reflexão interna total da fluorescência. Neste tipo de sensor é gerado um campo evanescente quando a radiação é transmitida por reflexão interna total meio através de um guia de onda. Nesta técnica a interação das moléculas fluorescentes imobilizadas modifica sua fluorescência e as variações de transmissão podem ser mensuradas e relacionadas com a concentração do analito (PATEL, 2002; RUMAYOR et al, 2005).

Os transdutores piezelétricos são constituídos por um material piezelétrico, como por exemplo, o quartzo, que pode entrar em ressonância quando um campo elétrico alternado é aplicado. Nesse tipo de transdutor modificações na frequência de oscilação são correlacionadas com as mudanças de massa na superfície de um cristal de quartzo. Ou seja, a

imobilização de molécula na superfície, assim como, o processo interação molecular produzem modificações na massa e consequente variação na frequência de oscilação. (CHANG et al., 2000, TANIWAKI et al., 2006).

Os transdutores térmicos detectam a variação de temperatura por meio de termoresistores. No processo de detecção, ocorrem reações exotérmicas e o calor gerado pode ser relacionado com a concentração do analito (CHANG et al, 2000; RUMAYOR et al, 2005).

Os transdutores nanomecânicos após ocorrer interação da camada biossensora com a molécula alvo ocorrerá tanto alterações na tensão superficial do líquido como modificações na deflexão e/ou frequência de ressonância da microplaca de silício (ÁLVAREZ et al., 2003; RUMAYOR et al., 2005).

2.3.2 Classificação dos biossensores quanto ao elemento de bioreconhecimento

Tipo de interação, método de detecção, elemento de bioreconhecimento e sistema de transdução são algumas variáveis utilizadas para classificar os biossensores. De acordo com o tipo de interação os biossensores podem ser classificados como de bioafinidade na qual ocorre uma ligação específica entre o receptor e a molécula objeto de estudo; e os biocatalíticos que empregam biocatalizadores como, por exemplo, enzimas para favorecer reações químicas (RAHAIE e KAZEMI 2010).

Com base no método de detecção podem ser classificados em diretos e indiretos. No primeiro caso, serão captadas alterações físico-químicas decorrentes da formação de um complexo entre elemento de reconhecimento e o analito, já no segundo as alterações captadas são provenientes da formação de uma substância após a interação receptor-molécula alvo. Em relação ao elemento de reconhecimento, diversas moléculas podem ser

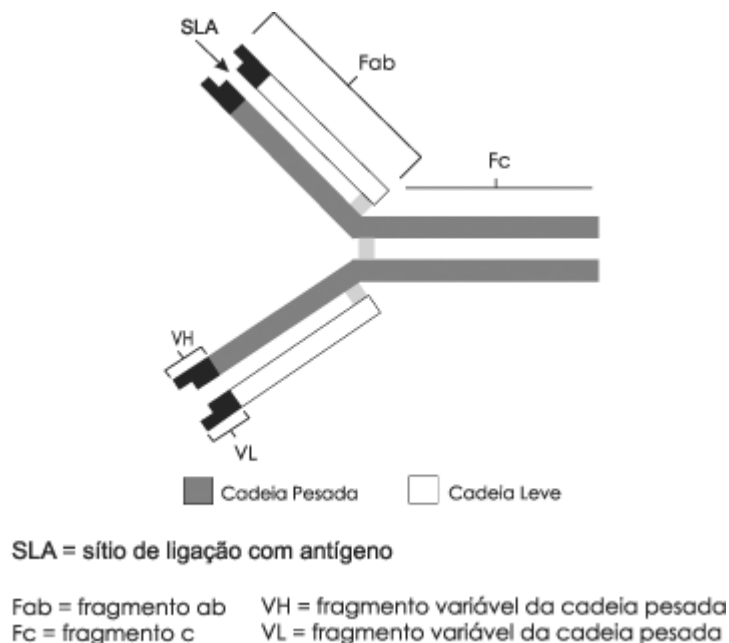
utilizadas, tais como célula, organela, enzima, anticorpo, ácido nucléico, tecido, aptâmeros, PIM, ácido nucléico peptídeos (RAHAIE e KAZEMI 2010).

2.3.2.1 Imunossensores

De acordo com a variável elemento de bioreconhecimento, o anticorpo representa uma molécula utilizada como camada sensora. Neste caso, o biossensor passa denominar-se imunossensor. A base do funcionamento do imunossensor é a formação de um complexo estável entre o antígeno e o anticorpo, resultado da especificidade do reconhecimento molecular (LUPPA et al., 2001).

Anticorpos (Ac) (Fig. 6) são moléculas de glicoproteínas produzidas por linfócitos B em resposta a um agente estranho, apresentam grande afinidade por moléculas específicas, chamadas de antígenos (Ag). Os Ac são constituídos por dois sítios, chamados de porção variável (Fab), responsável pela ligação aos Ag, e porção cristalizável (Fc), responsável pela variação de classe nos anticorpos. A interação antígeno-anticorpo geralmente são interações de van der Waals que ocorrem nos epítomos (Fab) do anticorpo, associado a pelo menos uma ligação de hidrogênio. Dessa forma, a imobilização de forma ordenada e orientada do anticorpo na superfície do transdutor é extremamente importante. Para a correta ligação, a porção Fc deve ser ligada ao transdutor para manter as porções Fab livre o reconhecimento com o antígeno (FERREIRA e YAMANAKA, 2006).

Na construção de imunossensores tem sido utilizado anticorpos monoclonais (Mab). Essas estruturas são produzidas a partir de linfócitos B clonados e imortalizados para produzir anticorpos com a mesma estrutura, especificidade, afinidade e ligando-se a um único epítomo (POHANKA et al., 2009). Nesse contexto, imunossensores que utilizam Mab apresentam uma maior eficiência.

Figura 6 – Representação do anticorpo e suas regiões.

Fonte: BLAU, MENEGON e CHUNG (2006)

2.3.3 Técnicas para Imobilização de Biomoléculas

A imobilização do anticorpo sob a superfície do transdutor é um passo crucial no desenvolvimento dos imunossensores, pois deve permitir uma maior estabilidade e a manutenção da atividade biológica do anticorpo. A escolha do método apropriado varia de acordo com algumas condições como o analito, o receptor, o transdutor e as condições operacionais do imunossensor. Os métodos mais utilizados na imobilização de biomoléculas são: adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada (*cross-linking*) e aprisionamento ou oclusão (TEDESCHI et al., 2003; RUMAYOR et al., 2005; MELLO e KUBOTA, 2002) (Fig. 7).

Um exemplo de adsorção física é o processo onde a biomolécula é dissolvida em um solvente adequado e por imersão o eletrodo é exposto à

solução. Por meio deste método a biomolécula é imobilizada sobre a superfície do transdutor através de ligações tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, ligações iônicas. Essa técnica é bastante empregada por ser simples, rápida, de baixo custo e eficiente. Entretanto, apresenta a possibilidade de dessorção da biomolécula visto que as forças de interação são frágeis e podem sofrer influência do pH, temperatura e força iônica do meio (SOUZA, 1997; D'SOUZA, 2001).

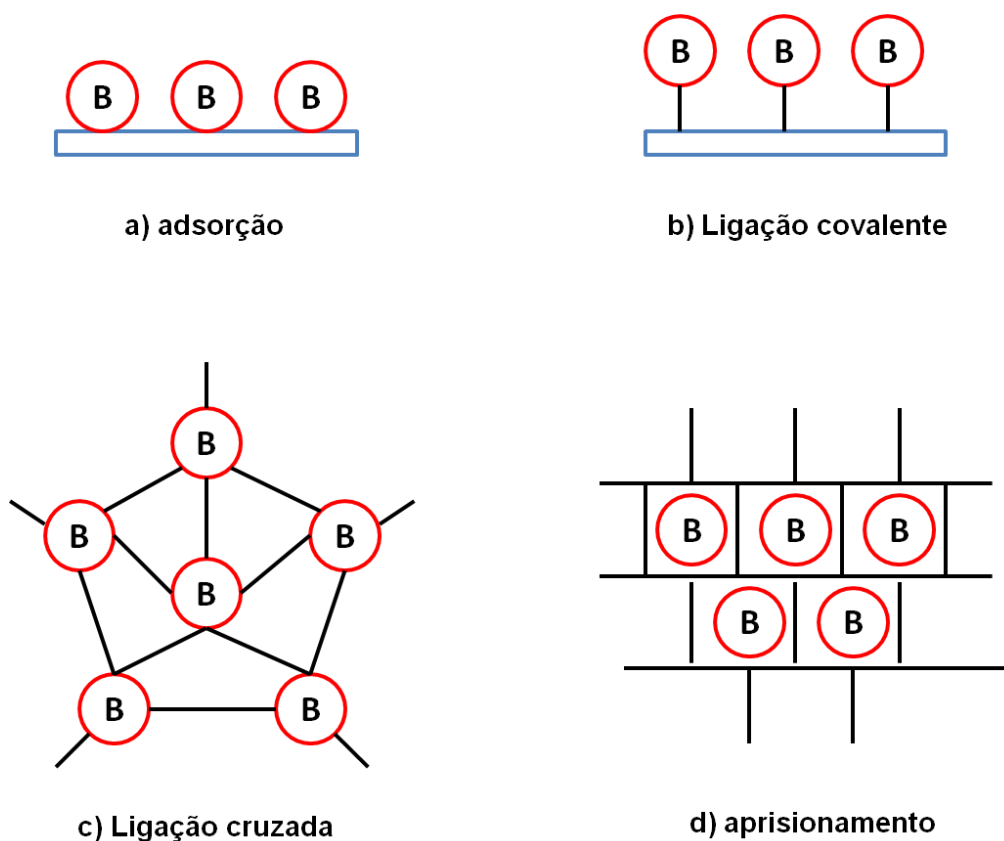
Na técnica de ligação covalente, a imobilização ocorre através de ligações químicas entre os grupos reativos do substrato e os grupos funcionais da biomolécula que não sejam indispensáveis a atividade biológica. Esta técnica é bastante estável o que diminuiu a possibilidade de dessorção da molécula. Apresenta o inconveniente de exigir maior tempo para ser realizada e não permitir a regeneração da matriz suporte (COSNIER, 1999; D'SOUZA, 2001; MELLO E KUBOTA, 2002).

O método de ligação cruzada permite que as moléculas se liguem formando uma rede tridimensional sobre a superfície de um suporte sólido através de um reagente bi ou multifuncional como glutaraldeído, hexametileno di-isocianato, 2,4 dinitro-benzeno. É um método atrativo por ser simples, de custo moderado, apresenta elevada estabilidade a variações de pH e temperatura. Apresenta algumas limitações como elevada toxicidade de alguns reagentes, difícil controle da reação de imobilização, grande quantidade de biomaterial necessário para reação e não é possível regeneração (GIL et al., 1999; D'SOUZA, 2001; MELLO E KUBOTA, 2002).

No método de aprisionamento ou oclusão a biomolécula fica limitada ao interior dos espaços das ligações covalentes cruzadas que deram origem a uma matriz polimérica ou porosa. Esta é uma técnica simples, de baixo custo, exige pouco material biológico, o elemento de reconhecimento fica mais próximo do transdutor e não permite modificações do sensor biológico. Apresenta alguns problemas como, ligação frágil, possibilidade de

impedimento estérico, não é possível a regeneração (MELLO E KUBOTA, 2002; D'SOUZA, 2001; EDSON, 2012).

Figura 7 – Representação dos métodos de imobilização de biomoléculas (círculo vermelho com letra B).



Fonte: SILVA (2013)

2.3.4 Aplicações dos Biossensores

Em 1962 Clark e Lyons desenvolveram o primeiro biossensor para mensurar a pressão de oxigênio, este foi baseado na imobilização da enzima glicose oxidase em uma membrana de acrilamida sobre a superfície de um eletrodo amperométrico de platina. O princípio de funcionamento deste biossensor denominado até então de “eletrodo enzima”, consistia na oxidação do substrato da D-glicose formando o produto D-glucono- δ -lactona (ácido

glutâmico) catalisada pela enzima glicose oxidase. Nesse processo uma demanda de oxigênio era exigida e tal consumo era proporcional a concentração da glicose. Então, a partir de 1975, a empresa *Yellow Springs Instrument Company* começou a comercializar esse sensor enzimático. (RUMAYOR, 2005).

O primeiro biodispositivo que utilizava microrganismos vivos imobilizados como camada biossensora foi desenvolvido no ano de 1977. Nesse biossensor os microrganismos foram imobilizados sobre a superfície de um eletrodo sensível a amônia com o objetivo de desenvolver uma plataforma capaz de detectar o aminoácido arginina. Devido a sua seletividade o dispositivo recebeu a denominação de sensor bio-seletivo e posteriormente de biossensor. E foi a partir desse momento que o termo biossensor surgiu na literatura científica (D' ORAZIO, 2003).

A tecnologia dos biossensores aplica-se a diversas áreas científicas, como controle de qualidade de alimentos e ambiental, no diagnóstico clínico, na indústria farmacêutica. O interesse no uso desses dispositivos na área alimentícia tem aumentado devido à possibilidade de combinar uma tecnologia extremamente sensível, capaz de miniaturização e de fornecer resultados em tempo real. Os biossensores representam uma importante ferramenta que podem ser utilizadas no controle de qualidade de alimentos, visando à determinação de contaminantes alimentares, a fim de garantir a inocuidade dos produtos alimentícios. (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003; ROGERS, 2006; BALLERSTADT et al., 2006; KAPPEL et al., 2007; VÄLIMAA et al., 2010; MARAGOS e BUSMAN, 2010).

Na construção de biossensores vem sendo utilizado eletrodos quimicamente modificados (EQM) com a finalidade de melhorar a resposta eletroquímica e conseqüentemente os resultados obtidos. Desta forma, a utilização de monocamadas auto-organizadas (do inglês, *self-assembled monolayers* - SAM) e nanopartículas magnéticas são duas estratégias

interessantes para imobilização de biomoléculas e construção de sistemas biossensíveis.

2.4 Eletrodos Quimicamente Modificados

A expressão eletrodo quimicamente modificado foi utilizada pela primeira vez por Moses e col. em 1975 para nomear a modificação da superfície de eletrodos com espécies quimicamente ativas. (MOSES, WIER E MURRAY, 1975). A modificação da superfície do eletrodo representa uma estratégia bastante interessante, pois possibilita que o eletrodo modificado passe a apresentar as novas propriedades físico-químicas da espécie eletroativa que foi imobilizada sob sua superfície. Dessa forma, através das modificações superficiais é possível desenvolver interfaces eletroquímicas efetivas, com a reatividade e seletividade desejadas, permitindo o desenvolvimento de dispositivos com as mais diversas aplicações (SOUZA, 1997; JANEGITZ, MARCOLINO JR e FATIBELLO-FILHO, 2007).

A utilização de EQM é extremamente útil dentro da eletroanálise, uma vez que permite minimizar alguns problemas que podem surgir de alterações na cinética de transferência de elétrons entre o analito e a superfície eletródica. Este processo de transferência, por exemplo, pode se apresentar muito lento e conseqüentemente influenciar na sensibilidade de detecção de compostos, assim como na seletividade das determinações. Portanto, o emprego dos EQM é uma alternativa que aumenta a eficiência dos eletrodos convencionais e a aplicabilidade, pois contorna tais problemas (GALLI et al., 2006; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

Atualmente existem diferentes possibilidades de realizar modificação em superfícies eletródicas e dentre elas podemos destacar a formação de SAM (FERRETI et al., 2000; CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002). SAM é uma camada de espessura molecular formada pela auto-organização espontânea de moléculas de maneira ordenada, por meio de adsorção química de um grupo funcional sobre uma superfície sólida (ARYA *et al*, 2009). O alto grau de organização das SAM é garantido através de interações hidrofóbicas entre as

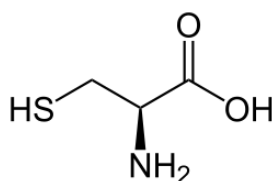
longas cadeias carbonadas ligadas a um grupo funcional. Várias moléculas têm sido utilizadas na formação de sistemas organizados, como por exemplo, alquil, alcoóis, aminas, tióis etc. Dentre os materiais utilizados como suporte temos platina, ouro, prata e outros (FREIRE, PESSOA e KUBOTA, 2003).

Nos últimos anos tem crescido o interesse na utilização das SAM para o desenvolvimento de imunossensores, pois esta técnica representa uma maneira simples de construir uma camada ultrafina, organizada, reprodutível e estável sendo adequada à imobilização de anticorpos. Dessa forma, a técnica SAM oferece um ambiente propício ao desenvolvimento de biodispositivos com alta sensibilidade e reprodutibilidade (LI et al., 2015).

Em decorrência da alta afinidade de grupos SH com o ouro (Au), que formam ligações Au-S fortes e estáveis tem aumentado a atenção para as SAM formadas por SH, uma vez que esse tipo de estrutura representa uma excelente plataforma para construção de dispositivos eletrônicos biomoleculares como os imunossensores (GALAL, ATTA e EL-ADS, 2012).

Dentro desse contexto, a cisteína que é um aminoácido que apresenta em sua estrutura três grupos funcionais, -SH, -COOH e -NH₂ (JIANG et al., 2013) (Fig. 8) representa uma molécula interessante para construção de SAM e por consequência imobilização de anticorpos. Uma vez que esta molécula pode ser ancorada a superfície do eletrodo de ouro através de uma ligação covalente do grupo tiol (-SH). O anticorpo pode ser imobilizado covalentemente sobre a SAM por meio de uma ligação amida entre os grupos carboxílicos ativados da cisteína e os grupos aminos do anticorpo.

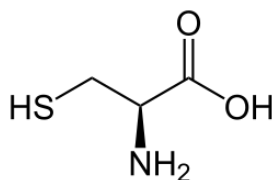
Figura 8 – Estrutura química da cisteína.



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 04/01/2016.

Outra molécula que merece destaque na construção de SAM é o ácido mercaptobenzóico (MBA). O MBA é uma molécula que apresenta dois grupos funcionais em sua estrutura, -SH, o qual permite uma ligação estável com a superfície do eletrodo de ouro e um -COOH livre que interage com as nanopartículas de óxido de ferro modificadas com um grupo NH_2 ($\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$) (Fig. 9) (ZAMBORINI et al., 2002; MICHOTA e BUKOWSKA, 2003; WANG et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

Figura 9 – Estrutura química do ácido mercaptobenzóico.



Fonte: <http://www.glenthams.com>. Acesso em 04/01/2016.

Nanopartículas (Nps) são partículas de dimensões nanométricas. Esta é uma dimensão extremamente pequena, da ordem de 1 a 100 nanômetros. As Nps apresentam propriedades físico-químicas diferentes das partículas macroscópicas (ESTEVES et al., 2004). Por apresentarem tais propriedades as Nps facilitam a transferência de elétrons, podendo ser modificadas por uma variedade de ligantes e biomoléculas e utilizadas na construção de sensores (bio)químicos (WANG, 2005; RONKAINEN e OKON, 2014).

As nanopartículas de magnetita são uma classe de nanomaterial que tem sido extensivamente utilizado no desenvolvimento de biossensores, pois oferecem diversas vantagens como melhora da biocompatibilidade, aumento da área superficial, superparamagnetismo e boa dispersibilidade (GUBIN et al., 2005; TARTAJ et al., 2003; SILVA et al., 2013; CASTREJÓN-PARGA et al., 2014). As $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ utilizadas neste estudo fornecem vários sítios para ligação covalente com anticorpos, constituindo uma plataforma adequada para construção de um imunossensor para detecção de Mtxs.

2.5 Técnicas eletroquímicas

Técnicas eletroquímicas são baseadas em fenômenos de óxido-redução em soluções eletrolíticas. Essas técnicas estudam propriedades elétricas mensuráveis como potencial e corrente de um analito numa célula eletroquímica submetido a uma diferença de potencial. Os métodos eletroquímicos possibilitam a construção de ferramentas com maior sensibilidade, rapidez e possibilidade de miniaturização diferente das outras técnicas de detecção de MTXs, inclusive no desenvolvimento de imunossensores. Portanto nessa seção iremos abordar duas técnicas eletroquímicas, a Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) com o objetivo principal de aplicá-las para o desenvolvimento de um imunossensor para AFB1.

2.5.1 Voltametria Cíclica

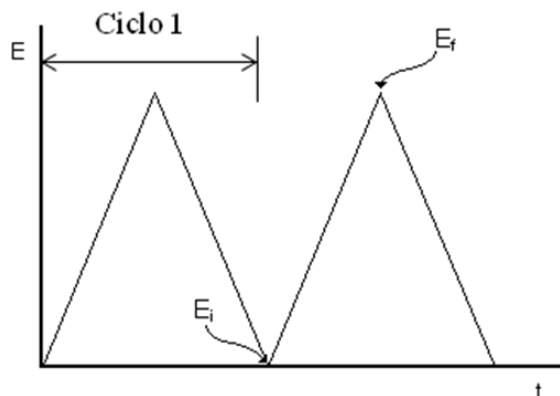
A VC é uma técnica utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. Seu principal uso é a detecção de espécies eletroativas presentes na solução eletrolítica. A eficiência desta técnica é decorrente da rapidez no fornecimento de informações sobre os processos de óxido-redução que ocorrem na superfície dos eletrodos e que promovem a modificação da cinética de transferência de elétrons (BRETT e BRETT, 1996).

A determinação do analito por VC só é possível se este composto for eletroativo, ou seja, que apresente a capacidade de oxidação ou redução em uma região de potencial aplicado, na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, dessa forma, criando um fluxo de elétrons (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

Esta técnica consiste em aplicar uma variação de potencial em função do tempo entre os eletrodos de trabalho e de referência, variando entre um valor máximo e mínimo de potencial que corresponde ao início e término da varredura em cada um dos sentidos do potencial (CIRNE E PATACAS, 2007). O parâmetro aplicado é o potencial (E) e o parâmetro mensurado é a corrente

resultante (i). O potencial (Fig. 10) aplicado é varrido linearmente e tem uma forma triangular (LOJOU e BIANCO, 2006). Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus potencial aplicado.

Figura 10 – Variação da aplicação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.



Fonte: KISSINGER e HEINEMAN (1983).

As informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica obtida pela transferência de elétrons durante o processo de oxirredução (Eq. 1). A quantidade de analito presente na interface do eletrodo e na célula eletroquímica é correlacionada com a magnitude da corrente gerada. E o registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma (Fig. 10).

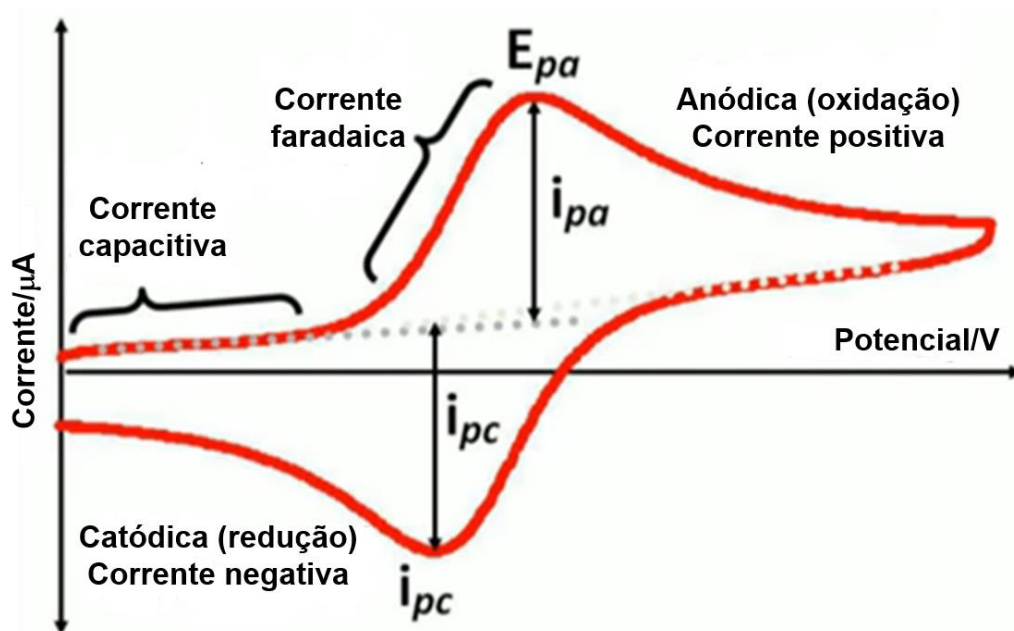


Na equação em questão O é a forma oxidada do analito e R, a forma reduzida (BARD e FAULKNER, 2001).

A corrente total gerada é constituída de duas componentes, a corrente capacitiva, resultante da redistribuição de cargas e espécies na superfície do eletrodo e a corrente faradáica relativa à reação de oxiredução da espécie em estudo no eletrodo.

Inicia-se a aplicação do potencial negativo onde nenhuma oxidação ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais positivas (anódica) ocorre a oxidação do composto em solução. O rápido aumento da corrente anódica gera um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre. Posteriormente, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial e, no caso de uma reação reversível, os produtos que tiveram sido gerados no sentido direto serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico de oxidação (Fig. 11) (KISSINGER e HEINEMAN, 1983; LOJOU e BIANCO, 2006).

Figura 11 – Esquema representativo de um voltamograma cíclico.



Fonte: Adaptado de Pharmacy Brighton (2016).

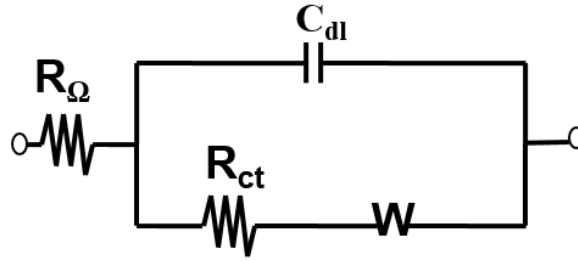
2.5.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é um método que fornece informações detalhadas sobre as propriedades dielétricas da interface eletrodo/solução. É frequentemente utilizada para estudar o comportamento dielétrico de um sistema, no qual vários processos físico-químicos inter-

relacionados acontecem em distintas velocidades (DONG et al., 2001; KATZ e WILLNER, 2003). A técnica vem sendo amplamente utilizada em estudos de membranas, suspensões sanguíneas, tecidos biológicos, sistemas coloidais e sensores.

O princípio de funcionamento desta técnica envolve a aplicação de um estímulo elétrico entre os eletrodos dispostos em uma amostra de interesse e a observação da resposta. O referido estímulo consiste na aplicação de um pequeno potencial elétrico ou corrente sobre o sistema que está sendo investigado. O sistema é submetido à aplicação de um potencial sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial de pequena amplitude (BARD e FAULKNER, 2001). Este por sua vez causa alterações mínimas no sistema, reduzindo desta forma possíveis erros causados pela técnica de medição. Este método possibilita que o sistema seja submetido a pequenos valores de potencial elétrico, em torno de milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos elétricos próximos ao estado de equilíbrio. Como ao potencial aplicado no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional (MACDONALD, 1987; SLUYTERS-REHBECH, 1994; BRETT e BRETT, 1996).

Assim que surgiu o conceito de impedância este era utilizado para representar a resposta dos sistemas formados pela associação de capacitâncias, resistências e indutâncias. Posteriormente, o uso desta técnica foi expandido para os sistemas eletroquímicos, uma vez que a relação entre corrente e potencial do sistema pode ser influenciada por diversos processos (SLUYTERS-REHBECH, 1994). As reações que ocorrem no eletrodo podem ser detalhadamente analisadas através de circuitos equivalentes. Na Fig. 11 é exemplificado o circuito de Randles. Os circuitos equivalentes são utilizados como modelos de medida devido à semelhança do comportamento da célula eletroquímica com um circuito elétrico composto por resistores, capacitores e indutores (Fig. 12).

Figura 12 – Modelo de circuito equivalente utilizado em espectroscopia de impedância.

Fonte: Elaborada pela autora.

No circuito de Randles estão presentes quatro elementos que representam os processos que ocorrem nos eletrodos e na solução: a capacitância de dupla camada elétrica (C_{dl}), que surge na interface eletrodo/solução devido à distribuição de cargas na interface e possui um comportamento similar à de um capacitor de placas paralelas (modelo Helmholtz); a resistência ôhmica da solução (R_{Ω}) ao transporte de íons entre os eletrodos; a impedância faradaica (Z_f) que pode ser subdividida em uma resistência à transferência de elétrons (R_{ct}), está relacionada ao fluxo de portadores na interface eletrodo/solução ou por conta do movimento de íons na interface quando um potencial é aplicado. Outro elemento que pode ser inserido no circuito de Randles e que é muito específico para circuito em biossensores é impedância de Warburg (W) que representa a resistência no transporte de massa das espécies eletroativas (BRETT e BRETT, 1996).

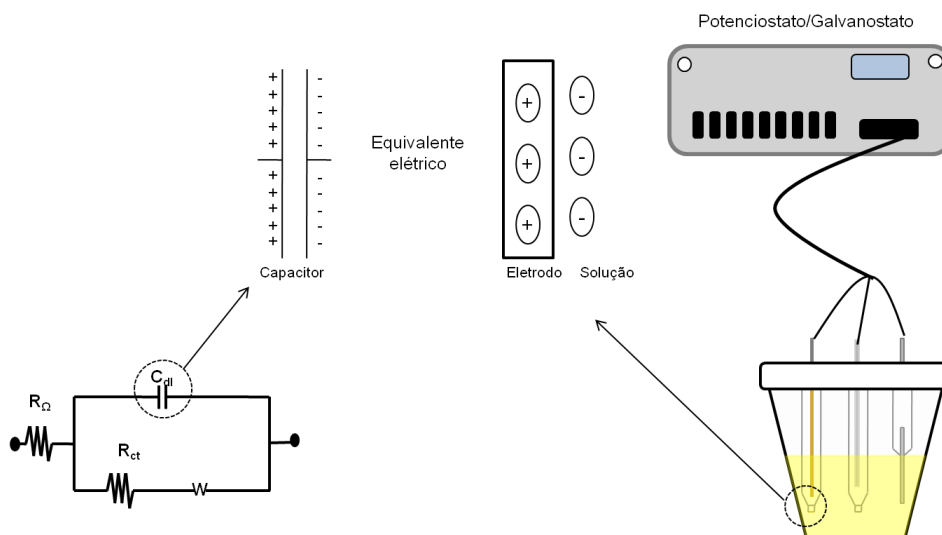
Para o circuito equivalente apresentado, as componentes real (Z') e imaginária (Z'') da impedância do sistema são:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad (2)$$

$$Z'' = \frac{\omega C_{dl} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad (3)$$

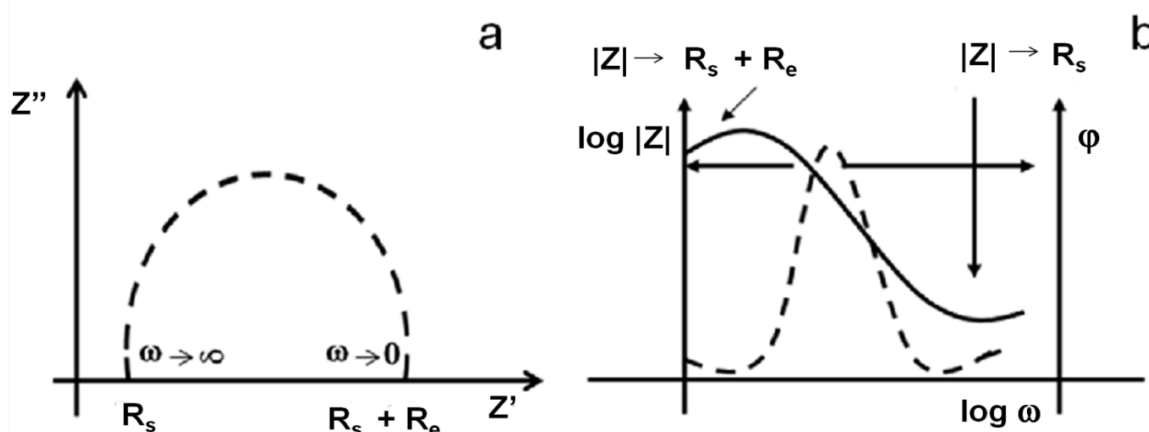
Em que, R_{Ω} (resistência ôhmica da solução), R_{ct} (resistência à transferência de elétrons), ω (frequência angular) e C_{dl} (capacitância da dupla camada elétrica).

Figura 13 – Representação da semelhança entre um capacitor de um circuito elétrico (modelo Helmholtz) com a interface eletrodo/solução de uma célula eletroquímica.



Fonte: Adaptado de SILVA (2013).

Os resultados de impedância podem se ilustrados de dois modos diferentes: através do diagrama de Nyquist (Fig. 14a), no qual podem ser observados os valores da parte capacitiva representada pela componente imaginária (Z_{im}), em função da parte resistiva representada pela componente real (Z_{re}) e o outro é o diagrama de Bode (Fig. 14b), que descreve a relação de $\log |Z|$ ($|Z|$, módulo da impedância) e ϕ (ângulo de fase) vs $\log \omega$ (ω - frequência).

Figura 14 – Diagramas de Nyquist (a) e Bode (b).

Fonte: DAMOS et al., 2004.

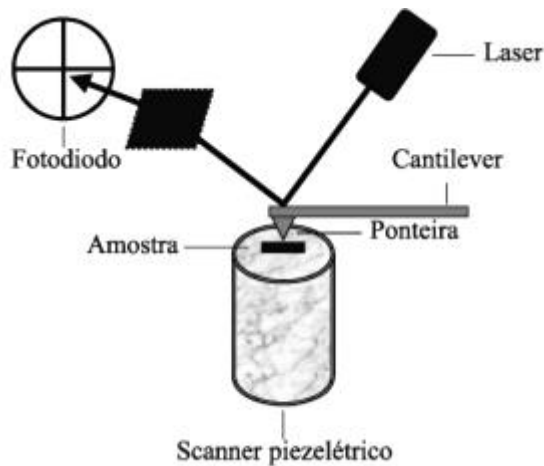
2.6 Microscopia de Força Atômica

Em 1986 a colaboração entre a *International Business Machines* (IBM) e a Universidade de Stanford permitiu que Binnig, Quate, Gerber desenvolvessem a técnica de microscopia de força atômica (AFM). O AFM surgiu após a observação de que a ponta do *cantilever* do microscópio de tunelamento com varredura exerce forças sobre a superfície da amostra na mesma ordem das forças interatômicas (GARCIA e PÉREZ, 2002; PAIVA, 2003).

Nesta técnica a superfície da amostra é varrida por uma sonda sensível a força, a qual é formada por uma haste em movimento (*cantilever* flexível) e uma ponta de dimensão atômica (Fig. 15). O princípio de funcionamento consiste em medir as deflexões do suporte decorrentes da força de interação entre os átomos da ponta e da amostra. As deflexões são mensuradas com o uso de laser emitido por um diodo de estado sólido, refletido pelo braço de AFM e captado um fotodetector de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*. A sonda de AFM se desloca seguindo os contornos da superfície e traçando um diagrama de altura construindo a topografia da amostra que resulta em

imagens topográficas 2D e 3D da superfície (HERRMANN et al., 1997, MENGUI, 2006).

Figura 15 – Representação do princípio de funcionamento do AFM.



Fonte: FERREIRA E YAMANAKA, 2006.

A força de interação que a amostra exerce sobre a ponteira é determinada pela deflexão do *cantilever*, dada pela lei de Hooke:

$$F = -Kx \quad (4)$$

Nesta equação, F representa a força de atração, k a constante elástica da ponta que depende de sua geometria e do material de fabricação e x o deslocamento do *cantilever*, pela deflexão provocada pela interação (HOWLAND e BENATAR, 1996).

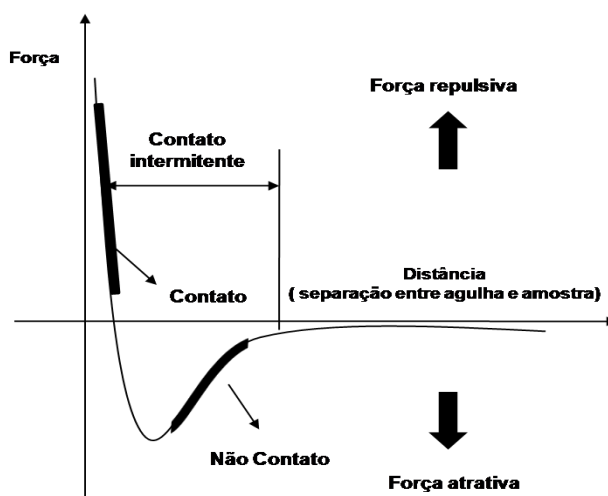
No AFM as forças existentes entre o *cantilever* e a amostra dependem de fatores tais como os materiais que compõem o *cantilever* e a amostra, distância entre os mesmos, geometria da ponteira ou contaminação sobre a superfície da amostra (HERRMANN et al., 1997).

No início do processo de varredura a ponteira se aproxima da amostra, devido às forças atrativas existentes na região, como as forças de van der Waals. A interação procede até determinada distância, acima da qual a proximidade dos átomos permite que os orbitais eletrônicos comecem a se

repelir. Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns angstroms. Quando as forças se tornam positivas, podemos dizer que os átomos da ponteira e da amostra estão em contato e as forças repulsivas acabam por dominar (TUSSET e BALTHAZAR, 2010).

De acordo com o modo de operação a técnica de AFM pode ser classificada em três modos distintos: contato, não-contato e intermitente que se referem fundamentalmente à distância mantida entre a sonda e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a sonda sobre a superfície em estudo (Fig. 16). No modo contato a agulha varre a amostra mantendo uma distância interatômica e o aparelho opera na região de forças repulsivas, sendo necessário precaução para que a agulha não danifique a amostra. Na técnica de não-contato a força entre a sonda e a amostra é menor do que no modo contato, minimizando o contato físico sonda-amostra e consequentemente a deformação da amostra. No modo não-contato atuam forças atrativas como, Van der Waals, eletrostática e força de dipolo magnético. No modo contato intermitente o *cantilever* vibra próximo a sua frequência de ressonância de modo a tocar levemente a amostra (HERRMANN et al., 1997).

Figura 16 - Curva de força em função da distância entre a sonda e a amostra.

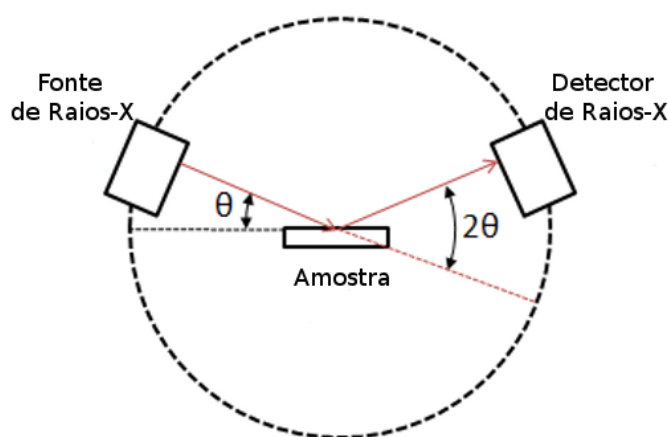


Fonte: HERRMANN et al., 1997.

2.7 Difração de raio X

Os raios X são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda menor que aproximadamente 1 Å descobertos pelo físico alemão Roentgem em 1895. A descoberta dos raios X demonstrou grande interesse da comunidade científica devido as diversas aplicações destas ondas, dentre quais o princípio de difração de raios X em arranjos cristalinos com o objetivo de estudar diferentes tipos de estruturas cristalinas (CULLITY, 2001).

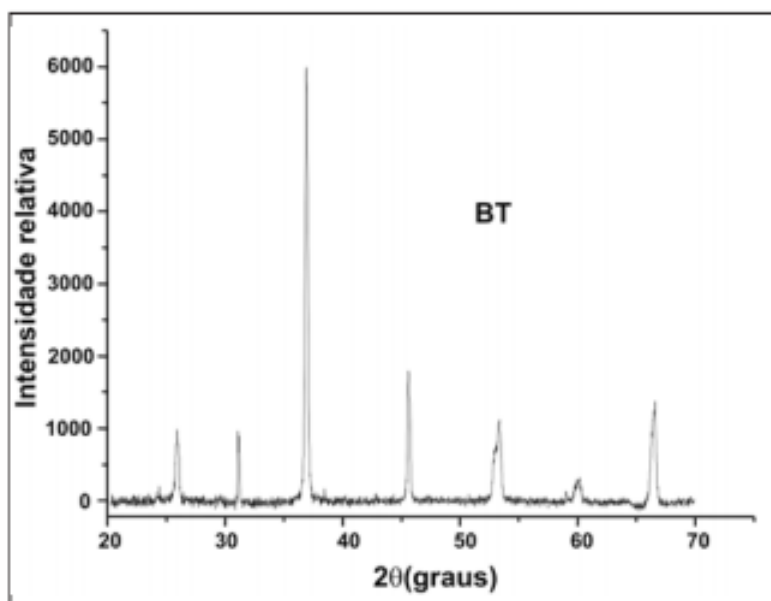
Figura 17 – Representação do funcionamento de um difratômetro de raios X



Fonte: <http://sites.ifi.unicamp.br>, 15 fev 2017.

A técnica de difração de raios X é bastante utilizada na caracterização de nanomateriais por ser versátil e não destrutiva. Consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons que constituem o feixe difratado (Fig. 17). A representação gráfica obtida do difratômetro é registrada na forma de espectro de intensidade versus o ângulo 2θ e é denominada de difratograma (Fig. 18).

Figura 18 – Difratoograma de amostra de titânio de bário hidrotérmico puro, sintetizado a 220°C, por 20 h.



Fonte: PEREIRA, FILHO e ARAÚJO, 2006.

A difração de raio X é descrito segundo a lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que o originaram (ALBERS et al., 2002). A lei de Bragg é dada pela seguinte equação:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (5)$$

onde,

n = número inteiro correspondente a ordem de difração

λ = comprimento de onda dos raios X incidentes

d = distância entre os planos atômicos do cristal

θ = ângulo de difração

Outra informação que pode ser obtida com utilização do DRX é o tamanho médio das partículas através das curvas de DRX tendo como base na largura da metade do pico de difração de maior intensidade do plano. Dessa

forma, forma o tamanho médio da partícula pode ser determinado através da utilização da equação de Scherrer (equação 6).

$$D = \frac{k \times \lambda}{\beta \times \cos \theta} \quad (6)$$

Na equação, D representa o tamanho médio da partícula, k é uma constante dependente da forma do material (0,94 para magnetita), λ é o comprimento de onda de raio X (1,54056 Å), β é a largura da metade do pico de difração e θ é o ângulo de difração (PRADO et al., 2013).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver imunossensores eletroquímicos em escala nanométrica para detecção de aflatoxina B1 em alimentos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a modificação da superfície do eletrodo de ouro com Cys-MAb-AFB1 e MBA-Fe₃O₄-NH₂-MAb-AFB1 através das técnicas eletroquímicas e microscopia de força atômica;
- Estudar as propriedades eletroquímicas interfaciais (capacitância de dupla camada elétrica, resistência a transferência de carga, impedância de Warburg, resistência ôhmica) dos sistemas sensores Cisteína-Anticorpo e Ácido mercaptobenzóico-nanopartículas de óxido de ferro-anticorpo (Cys-MAb-AFB1 e MBA-Fe₃O₄-NH₂-MAb-AFB1), bem como avaliar a bioatividade dos sistemas frente a AFB1;
- Analisar morfologia dos sensores por microscopia de força atômica;
- Estudar a especificidade do biossensor utilizando padrão negativo (ocratoxina A);
- Analisar os componentes do circuito elétrico para determinar a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) e resistência à transferência de cargas (R_{ct});
- Utilizar técnicas eletroquímicas de VC e EIE para caracterizar a interação dos sensores com diferentes concentrações de Mtxs isoladas e no arroz e amendoim.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Materiais

Cloreto férrico, cloreto ferroso, Ferro e ferricianeto de potássio foram obtidos da VETEC (Brazil). Albumina de soro bovino (BSA), de L-cisteína, 3-aminopropiltrietoxissilano (APTS) ácido 4-mercaptobenzóico, AFB1 e anticorpo monoclonal de coelho anti-AFB1 (MAb), 1- [3- (dimetilamino) propil] -3-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). Todas as substâncias químicas empregadas neste estudo eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional. A água deionizada obtida após um tratamento Milli-Q plus foi usada ao longo dos experimentos (Billerica, USA).

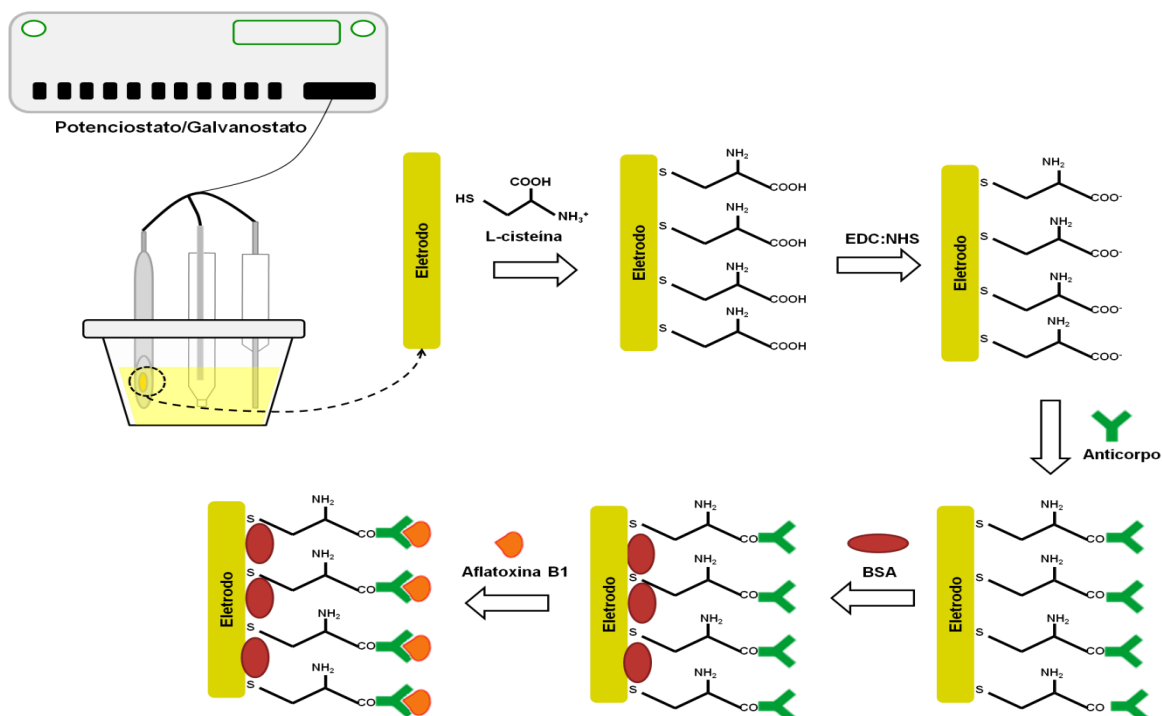
4.1.2 Síntese das nanopartículas magnéticas

O método de co-precipitação foi utilizado para obter as nanopartículas magnéticas (YANG et al., 2009). Inicialmente a síntese das nanopartículas foi conduzida sob atmosfera de N_2 por um período de 30 min. Durante este tempo, 200mL de solução de 0,1M de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e 0.5M de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ foi mantida sob agitação intensa em um balão de três bocas de fundo redondo. Posteriormente, foi adicionada uma solução aquosa 0,45 M de HCl até o pH atingir 1,7, seguida do acréscimo de uma solução aquosa 1,5M de NH_4OH até a observação de uma coloração preta, a qual representava um pH igual 8. Durante toda a noite a mistura foi mantida sob agitação e as partículas magnéticas resultantes foram separadas com o auxílio de um ímã. Depois, 0.2g de NPs de Fe_3O_4 foram misturadas com 90 mL de solução de etanol (50%) e dispersas utilizando um banho de ultrassom. Para tornar as nanopartículas de ferro funcionalizadas com o grupo amino (NPS $Fe_3O_4-NH_2$), 300 μL de APTS e 500 μL de NH_4OH foram adicionados à solução (GAN et al, 2011). Em seguida, a solução foi mantida sob agitação vigorosa e aquecida até 60 °C durante 6 horas sob atmosfera de N_2 .

4.1.3 Construções dos imunossensores

4.1.3.1 Plataforma baseada em SAM de Cys-Mab

Inicialmente, o eletrodo de ouro ($\phi = 2\text{mm}$) foi limpo utilizando uma solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$, enxaguado cuidadosamente com água ultrapura e seco à temperatura ambiente (20°C). A formação de SAM procedeu pela adição de um pequeno volume de Cys ($1\ \mu\text{L}$, $25\ \text{mM}$) diluído em tampão fosfato na superfície do eletrodo de Au (EAu) e deixado secar durante $10\ \text{min}$. Em seguida, o eletrodo foi lavado com tampão fosfato para remover quaisquer moléculas não ligadas de Cys. Subsequentemente, $1\ \mu\text{L}$ de $0,4\ \text{mol L}^{-1}$ de EDC e $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ de NHS numa proporção de $1:1\ (\text{v/v})$ foi depositado sobre a superfície do eletrodo modificado com Cys e deixado secar por $10\ \text{min}$. Depois disso, $1\ \mu\text{L}$ de solução de MAb ($25\ \mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado ao eletrodo modificado com EDC:NHS-Cys e incubado durante $10\ \text{min}$ à temperatura ambiente. A fim de bloquear os sítios ativos remanescentes foi adicionado $1\ \text{mL}$ de BSA ($10\%\ \text{p/v}$) a superfície de EAu durante $10\ \text{min}$ (Fig. 19). Após a obtenção da camada sensora $1\ \mu\text{L}$ de AFB1 em diferentes concentrações (0.5 , 1 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e $3 \times 10^4\ \text{ng mL}^{-1}$) foi adicionado a superfície do sensor e durante $10\ \text{min}$ procedeu o tempo de exposição. Finalmente, foram realizados os experimentos com amostras de arroz contendo diferentes concentrações de AFB1.

Figura 19 – Representação esquemática da fabricação do imunossensor.

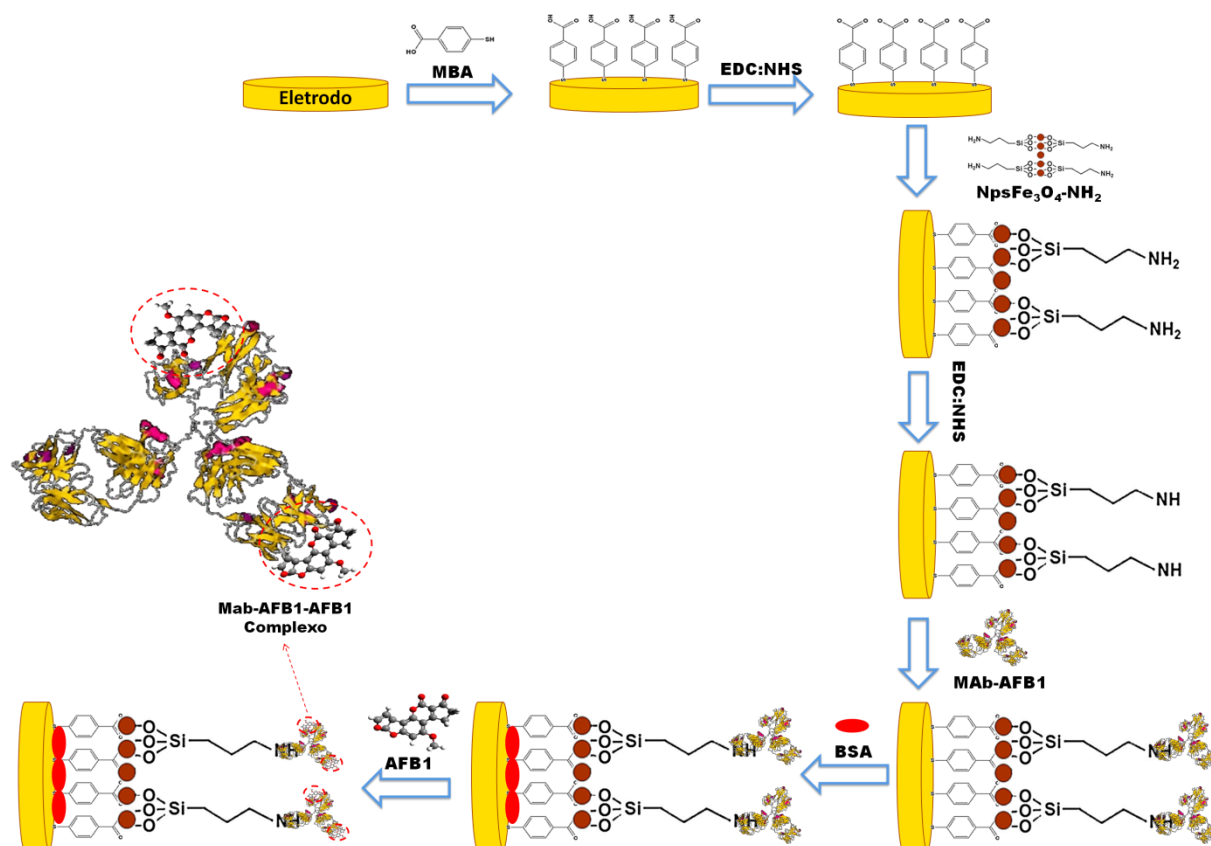
Fonte: elaborada pela autora.

4.1.3.2 Plataforma baseada em SAM de MBA-Fe₃O₄-NH₂-MAb-AFB1

O eletrodo de ouro foi limpo utilizando uma solução H₂SO₄/HNO₃, enxaguado cuidadosamente com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. 1 µL MBA (5%) foi adicionado a superfície do EAU e deixado secar para a obtenção de um filme fino. Posteriormente, o EAU modificado com MBA foi ativado usando 1 µL de 0,4M de EDC e 0,1M de NHS (1:1v/v) por 10min. Então, 4 µL de NpsFe₃O₄-NH₂ foi depositado sobre a superfície e esperado 20min. Subsequentemente, a reação de acoplamento EDC-NHS foi realizada por 10 min para ativar a superfície EAU-MBA-Fe₃O₄-NH₂. Após, 2 µL da solução de MAb-AFB1 foi imobilizado sobre a superfície EAU-MBA-Fe₃O₄-NH₂ e incubado por 20 min a temperatura ambiente. Os sítios ativos remanescentes foram bloqueados usando 1 µL de BSA (10% p/v) sobre a superfície EAU-MBA-Fe₃O₄-NH₂-MAb-AFB1 por 5 min. Finalizado a formação da camada sensora, os experimentos de sensibilidade e especificidade foram

realizados utilizando 2 μ L da toxina em diferentes concentrações (2 - 3 $\times 10^4$ ng.mL⁻¹) com uma exposição de 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, experimentos adicionais foram realizados com amostras de uma solução de diferentes concentrações de amendoim contaminado (2 - 3 $\times 10^4$ ng.mL⁻¹) (Fig. 20).

Figura 20 – Representação esquemática da fabricação do imunossensor.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Preparação das amostras

O arroz e o amendoim utilizados neste estudo foram adquiridos em mercado local. Inicialmente, os alimentos foram moídos separadamente em um liquidificador doméstico até obter um pó fino. Subsequentemente, 1 mg das amostras moídas foram misturadas com AFB1 ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) e homogeneizado no vórtex. Posteriormente, 5 mL de metanol (80%) foi adicionado à amostra, seguido por agitação durante 45 min. Na sequência a amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pipeta automática e diluído em tampão fosfato (TAN et al., 2009).

4.1.5 Medidas eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas em um PGSTAT 128N potenciostato/galvanostato (Autolab, Holanda). As medidas de EIE e VC obtidas do eletrodo modificado foram realizadas numa célula eletroquímica contendo uma solução de 10 mM do par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) em TFS 10 mM (pH 7,4). O sistema eletroquímico foi composto por um eletrodo de platina, um de Ag/AgCl (saturado com KCl) e um disco de ouro ($\phi=2\text{mm}$) utilizados como eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho, respectivamente. Os diagramas de Nyquist foram obtidos numa faixa de frequências compreendida entre 100 MHz e 100 kHz com uma amplitude do potencial aplicado de onda sinusoidal de 10 mV e os gráficos de CV foram obtidos a uma faixa de potencial entre -0,2 V e +0,7 V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}

4.1.6 Análises de Microscopia de Força Atômica

As medidas de microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas com um microscópio comercial PicoPlus (Molecular Imaging, USA). *Cantilevers* com uma sonda de silício (Multi 75 Al, frequência de ressonância = 75 KHz, força

constante = 3 Nm^{-1}) sendo utilizado em modo não contato em ar à temperatura ambiente ($T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A resolução lateral foi fixada em 512×512 pixels em uma área de varredura de $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$. As imagens foram obtidas a partir da análise de três áreas macroscopicamente separadas para garantir uma boa distribuição. As imagens foram analisadas utilizando o software Gwyddion (NEČAS e KLAPETEK, 2012).

4.1.7 Análise de difração de raios X

As medidas de difração de raios X foram realizadas num difratômetro de Raio-X D8 Advanced Davinci (Bruker). O método utilizado foi o método do pó, utilizando radiação $\text{K}\alpha 1$ do cobre, com comprimento de onda (λ) igual a $1,54056 \text{ \AA}$. As medidas foram realizadas com corrente de 40 mA e tensão de 40 kV . Foram realizadas análises: NpsFe_3O_4 e $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$. Os picos foram identificados seguindo o arquivo do JCPDS n° 19-0629 referente à magnetita (Fe_3O_4). Os tamanhos dos cristalinos foram calculados através da equação de Scherrer (Eq.6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

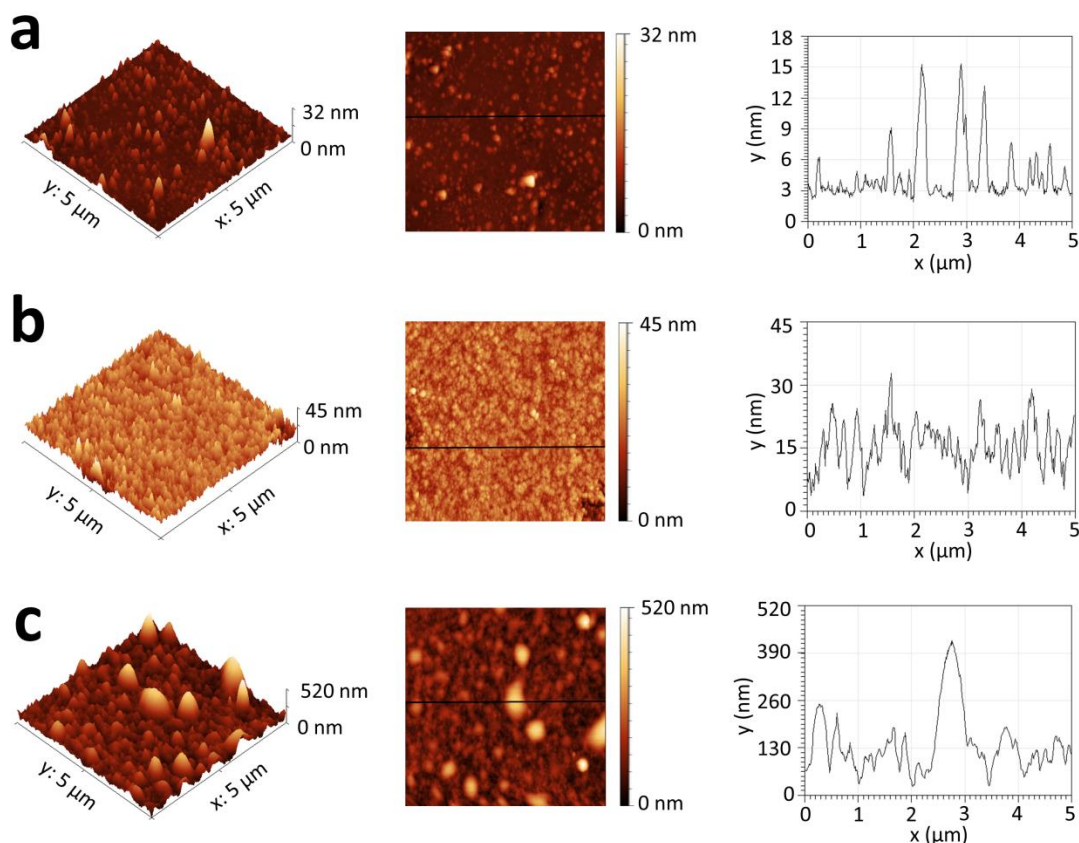
5 Resultados e Discussão

5.1 Biossensor baseado em monocamadas de cisteína e anticorpo monoclonal para detecção específica de aflatoxina B1 em arroz

5.1.1 Caracterização da topografia

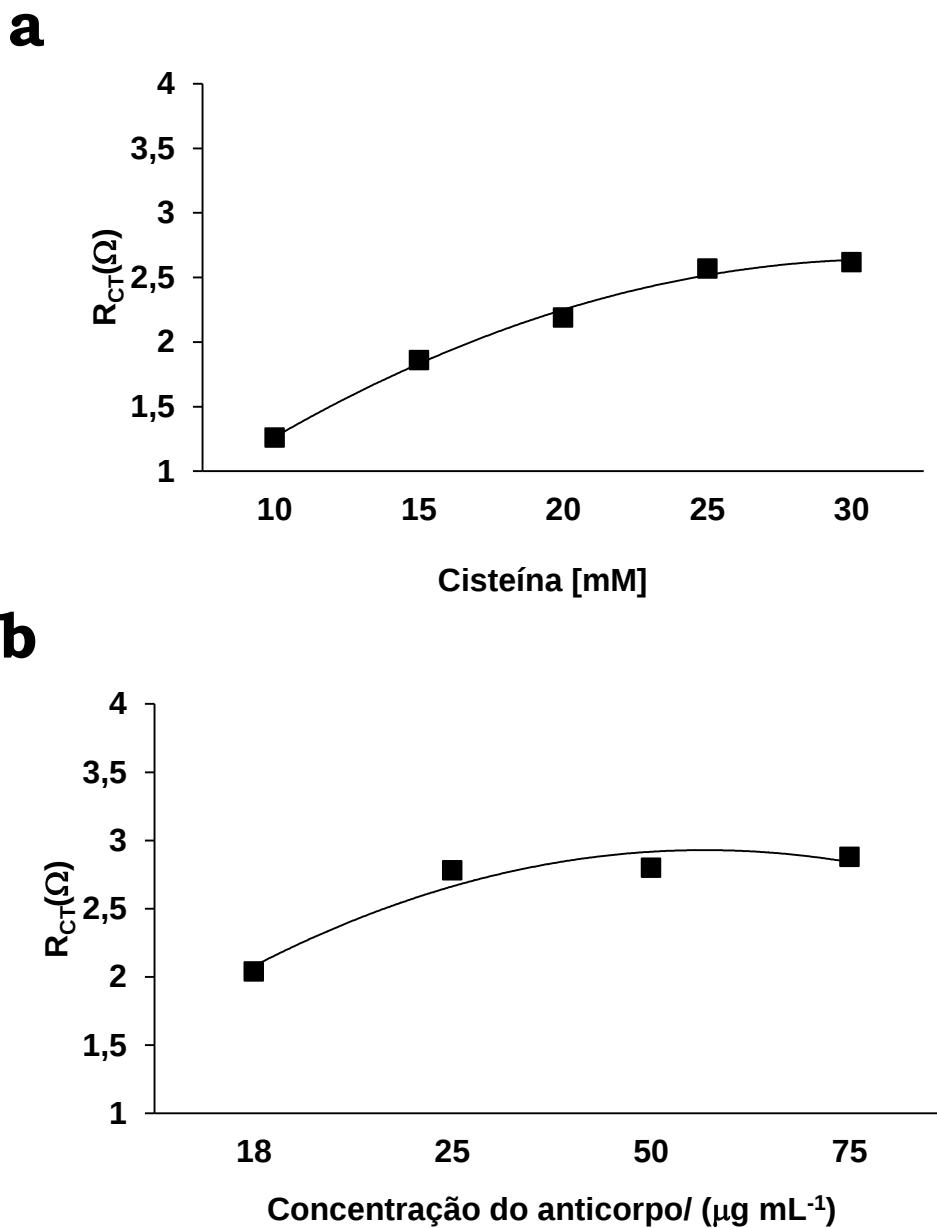
A análise da topografia foi realizada por meio de AFM. Esta é uma técnica complementar excelente para a avaliação de biossensores, uma vez que a resposta eletroquímica depende da morfologia, tais como a rugosidade da superfície, porosidade dos filmes e defeitos do filme (GALAL et al, 2012). A topografia típica (2D) e imagens 3D de AFM das superfícies dos substratos contendo Cys, Cys-MAb e Cys-MAb-AFB1 obtido pelo modo não contato são mostrados na Fig. 19. A Fig. 21a mostra a topografia da superfície do eletrodo após a modificação com Cys. Os nossos resultados para a altura da Cys estão em acordo com estudos de Huayhuas-Chipana et al, 2014. É possível visualizar uma camada completa e homogênea na superfície sem a presença de agregados ou defeitos. Após a obtenção do sistema de sensor Cys-MAb foi observado um aumento da rugosidade da superfície (Fig. 21b). O sistema sensor Cys-MAb demonstra uma rugosidade superficial de 24 ± 2 nm. O MAb imobilizado (Fig. 21c) tem um aspecto mais globular, demonstrando sua natureza proteica (YANG e LI, 2005). Alguns autores encontraram uma altura típica para a camada de anticorpos variando de 6 a 12 nm (YANG e LI, 2005; HAO et al., 2007). Ao comparar as imagens de AFM do sistema sensor antes e após o reconhecimento AFB1 uma diferença clara pode ser observada, indicando que a AFB1 foi reconhecida com sucesso.

Figura 21 – Imagens de microscopia de força atômica das superfícies dos substratos contendo Cys (a); Cys-MAb (b); Cys-MAb-AFB1 (c) usando modo não contato. Área de varredura $5 \times 5 \mu\text{m}$.



5.1.2 Caracterização eletroquímica do imunossensor

Um estudo prévio variando a concentração de Cys (10, 15, 20, 25 e 30 mmol L^{-1}) foi realizado com o objetivo de determinar a concentração ótima para a modificação do eletrodo. Utilizando um tempo de adsorção fixo de 10 min, observou-se que após 25 mmol L^{-1} de Cys ocorreu à saturação do eletrodo (Fig. 22a). Em adição, foi realizado um estudo variando a concentração de MAb-AFB1 (18, 25, 50 e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) adsorvido sob a superfície do eletrodo de ouro utilizando um tempo de incubação de 10 min. Um comportamento de saturação foi observado na superfície do eletrodo em 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MAb-AFB1 (Fig. 22b).

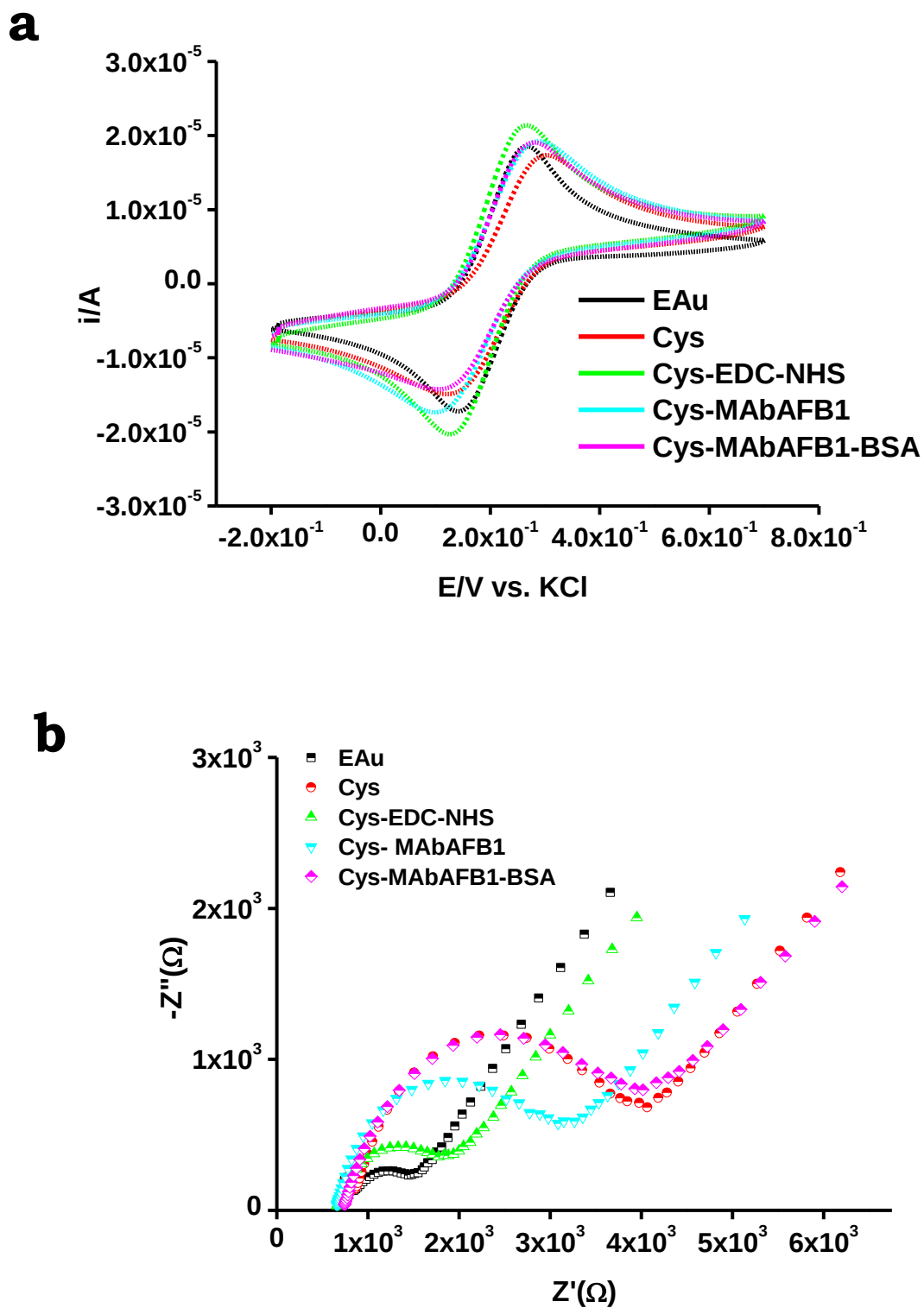
Figura 22 – R_{ct} vs concentração da cisteína (a) e concentração do anticorpo (b).

Os coeficientes de variação de cada etapa da montagem do imunossensor são mostrados na figura 23a. A reação redox de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ exibiu um voltamograma cíclico reversível para o eletrodo de ouro limpo. A cys é utilizada para modificar a superfície do eletrodo através do grupo sulfidríla. A adsorção da Cys na superfície do eletrodo

promoveu uma redução nos picos das correntes anódica e catódica. A molécula de Cys pode aumentar a resistência devido a repulsão eletrostática entre o grupo carboxílico do Cys e a carga negativa da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/3-$ (LUNA et al, 2015). Após a co-adição dos agentes acopladores NHS e EDC, os grupos carboxílicos terminais carregados negativamente da Cys ativados foram substituídos pelo éster NHS sobre a superfície do eletrodo. Portanto, foi observado um aumento na resposta amperométrica devido a uma atração eletrostática. O éster NHS carregado neutra/positivamente promoveu a transferência da sonda redox negativa para a superfície do eletrodo (GENG et al, 2008). Os agentes acoplantes EDC/NHS são importantes para facilitar a ligação do anticorpo ao sistema sensor. Então, MAb-AFB1 foi adicionado ao sistema sensor para formar a camada sensora. A imobilização de MAb-AFB1 sobre o sistema sensor promove uma diminuição nos picos de correntes anódico e catódico do $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Subsequentemente, 10% de BSA foi adicionado para bloquear qualquer resposta não específica, aumentando a especificidade do sensor (SHARMA et al., 2010).

A Figura 23b mostra o diagrama de Nyquist correspondente à modificação do eletrodo de ouro limpo para obter o sistema sensor. A curva obtida para o EAU revela um pequeno semicírculo associado a um reduzido valor de R_{ct} . A montagem da Cys sobre superfície do eletrodo induz a um aumento na R_{ct} como indicação de um bloqueio à transferência de elétrons. A modificação da monocamada de Cys utilizando os agentes acopladores EDC-NHS resulta na diminuição da R_{ct} . Os agentes acoplantes causam uma diminuição na resistência devido à atração entre os grupos NHS carregados positivamente e sonda redox com carga negativa (DING et al., 2013). Após a imobilização de MAb-AFB1 sobre o eletrodo modificado com Cys foi observado um aumento na R_{ct} . Como esperado, com adição do BSA sob o eletrodo modificado com Cys-MAb-AFB1, um novo aumento em R_{ct} foi observado. A resposta impedimétrica é maior após a completa montagem do sistema sendo proporcional a quantidade de material imobilizado sob a superfície do eletrodo, demonstrando que a camada sensora foi obtida com sucesso.

Figura 23 – Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) de cada etapa de imobilização de Cys, Cys-EDC-NHS, Cys-MAb-AFB1 e Cys-MAb-AFB1-BSA.



5.1.3 Detecção da Aflatoxina B1

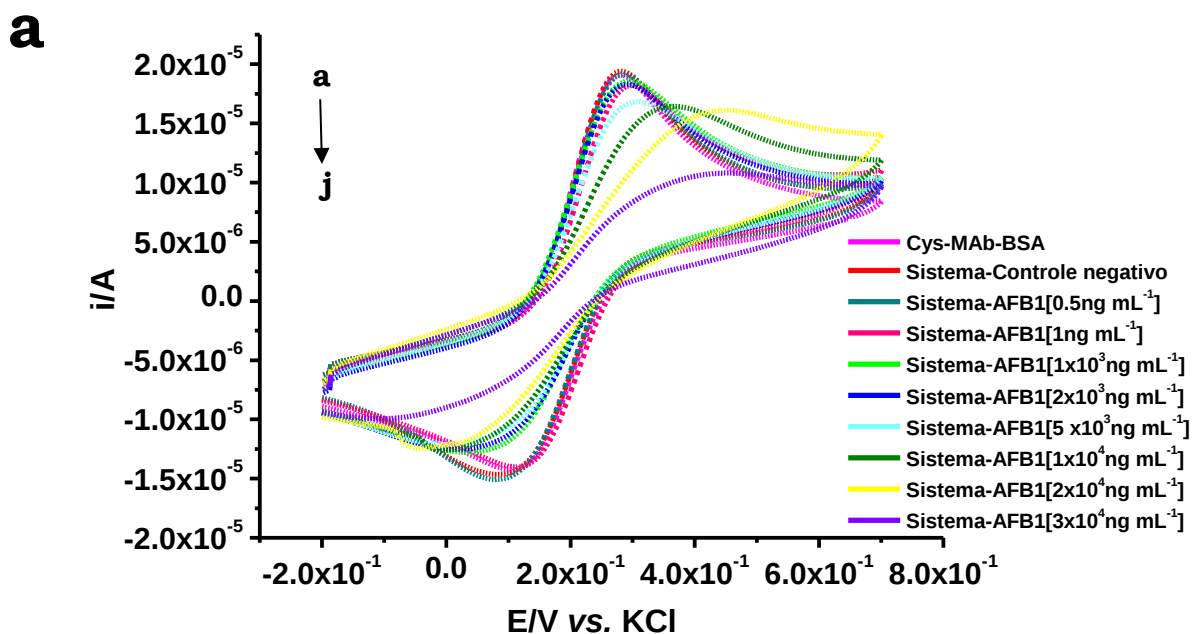
A figura 24a mostra o processo de bioreconhecimento do imunossensor para sete diferentes concentrações de AFB1 (0,5, 1, 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 3×10^4 ng mL⁻¹) e o controle negativo. Os VCs das diferentes concentrações de AFB1 revelam uma diminuição gradual dos picos de correntes e um aumento na separação dos picos com o aumento da concentração de AFB1. A curva de calibração é mostrada na figura 24b. A curva exibiu detecção da toxina variando de 0,5 ng mL⁻¹ para 3×10^4 ng mL⁻¹. Com base nesses dados, encontramos que o resultado está alinhado com a faixa da referência clínica e pode ser aplicado a identificação de toxinas em alimentos. Em adição, o coeficiente de variação deste ensaio foi encontrado aproximadamente dentro de 2% evidenciando a aplicabilidade deste método em análises de campo. Para avaliar a especificidade do imunossensor foi usada a Mtx ocratoxina A como controle negativo. Visualizando a curva b (controle negativo) não são observadas variações significativas nos picos anódicos e catódicos dos voltamogramas demonstrando a especificidade dos biossensor.

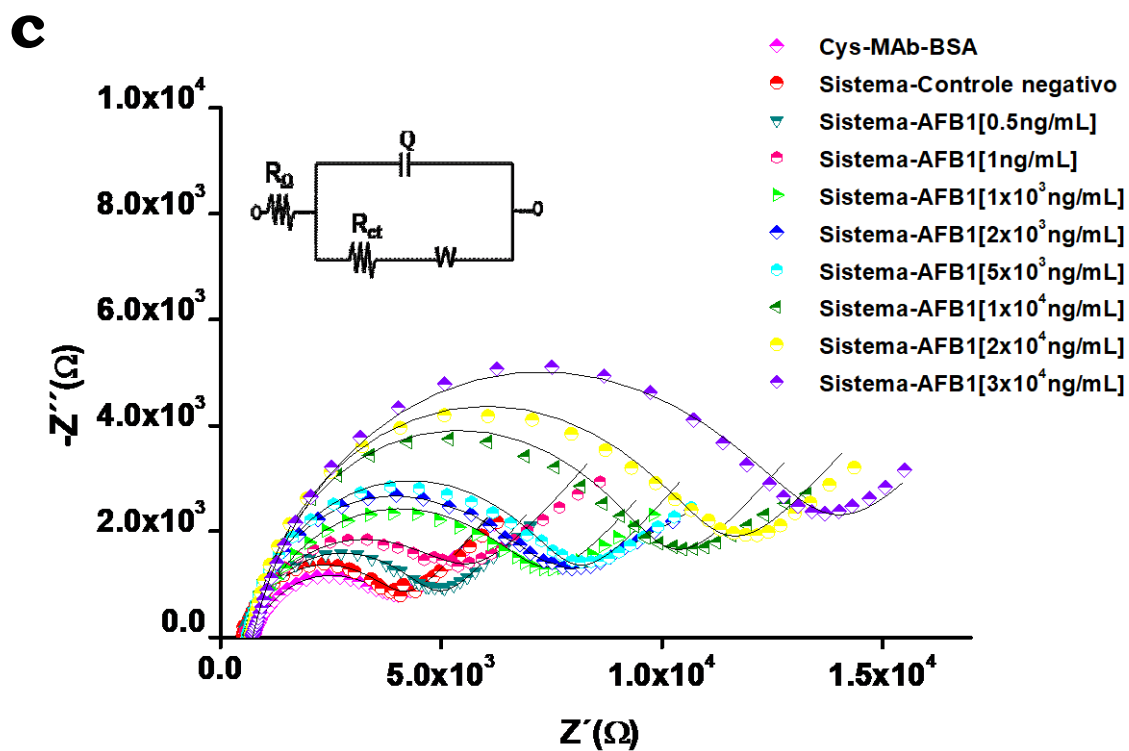
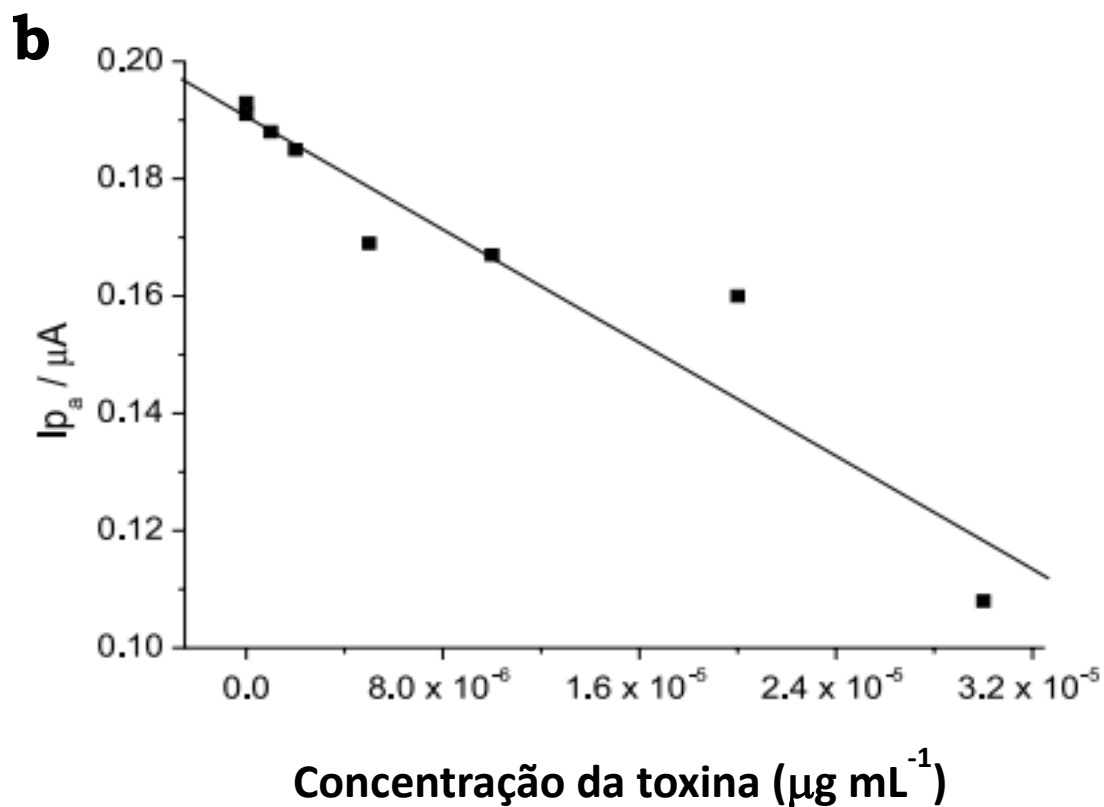
A Figura 24c apresenta o aumento sucessivo nos valores de R_{ct} associado ao aumento da concentração de AFB1. Os resultados de EIE estão de acordo com as análises do coeficiente de variação. A redução da resposta amperométrica e o aumento gradual nos valores de R_{ct} (Figuras 24a, b e c, respectivamente) resultam do progressivo bloqueio a passagem de elétrons na interface eletrodo/solução. Este bloqueio está relacionado com a quantidade do complexo anticorpo-antígeno formado (MAb-AFb1) sobre a superfície do eletrodo. Na Figura 24c foi observado valor insignificante de R_{ct} devido à interação do imunossensor com o controle negativo demonstrando a especificidade do mesmo.

Adicionalmente, a análise dos dados dos diagramas de Nyquist foram realizados através do programa EQUIVCRT. Os dados experimentais foram ajustados utilizando o circuito equivalente de Randles modificado (detalhe da Fig. 24c), o qual permitiu obter as curvas teóricas (Fig. 23c). A impedância de

Warburg (W) representa a impedância difusional da sonda redox para o eletrodo. A resistência ôhmica (R_Ω) da solução é associada com as propriedades de volume da solução eletrolítica. O elemento de fase constante (Q) representa o comportamento da dupla camada elétrica para um sistema não homogêneo. O ângulo de fase do elemento Q está relacionado com o parâmetro n, onde n é relacionado com a dispersão do tempo de relaxação através da superfície devido a não homogeneidade da capacitância. A resistência à transferência de elétrons (R_{ct}) controla a cinética de transferência de elétrons da sonda redox na interface eletrodo/solução.

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos (a), curva de calibração obtida do voltamograma cíclico (b), diagramas de Nyquist de Cys-MAb-AFB1-BSA, sistema-controle negativo, sistema AFB1 nas diferentes concentrações.





A tabela 2 mostra os parâmetros do circuito equivalente das curvas ajustadas para a preparação do imunossensor seguido pela interação do anticorpo com as diferentes concentrações de amostras de AFB1.

A performance do imunossensor para detecção da aflatoxina foi avaliada através da variação relativa da R_{ct} , de acordo com a equação 7:

$$\Delta R_{ct} = \left(\frac{R_{ct(toxina)} - R_{ct(MAb-AFB1)}}{R_{ct(MAb-AFB1)}} \right) \times 100 \quad (7)$$

onde, $R_{ct(toxina)}$ é o valor da resistência a transferência de elétrons após o reconhecimento da toxina e $R_{ct(MAb-AFB1)}$ corresponde ao valor de R_{ct} da camada sensora. ΔR_{ct} em função da concentração da toxina (Fig. 25a), indicando a interação entre anticorpo e AFB1. Dessa forma, esses resultados demonstram que o eletrodo modificado é eficaz para detecção de AFB1. O preenchimento dos sítios de reconhecimento através da cobertura da superfície pela toxina (θ) pode ser calculado por (equação 8):

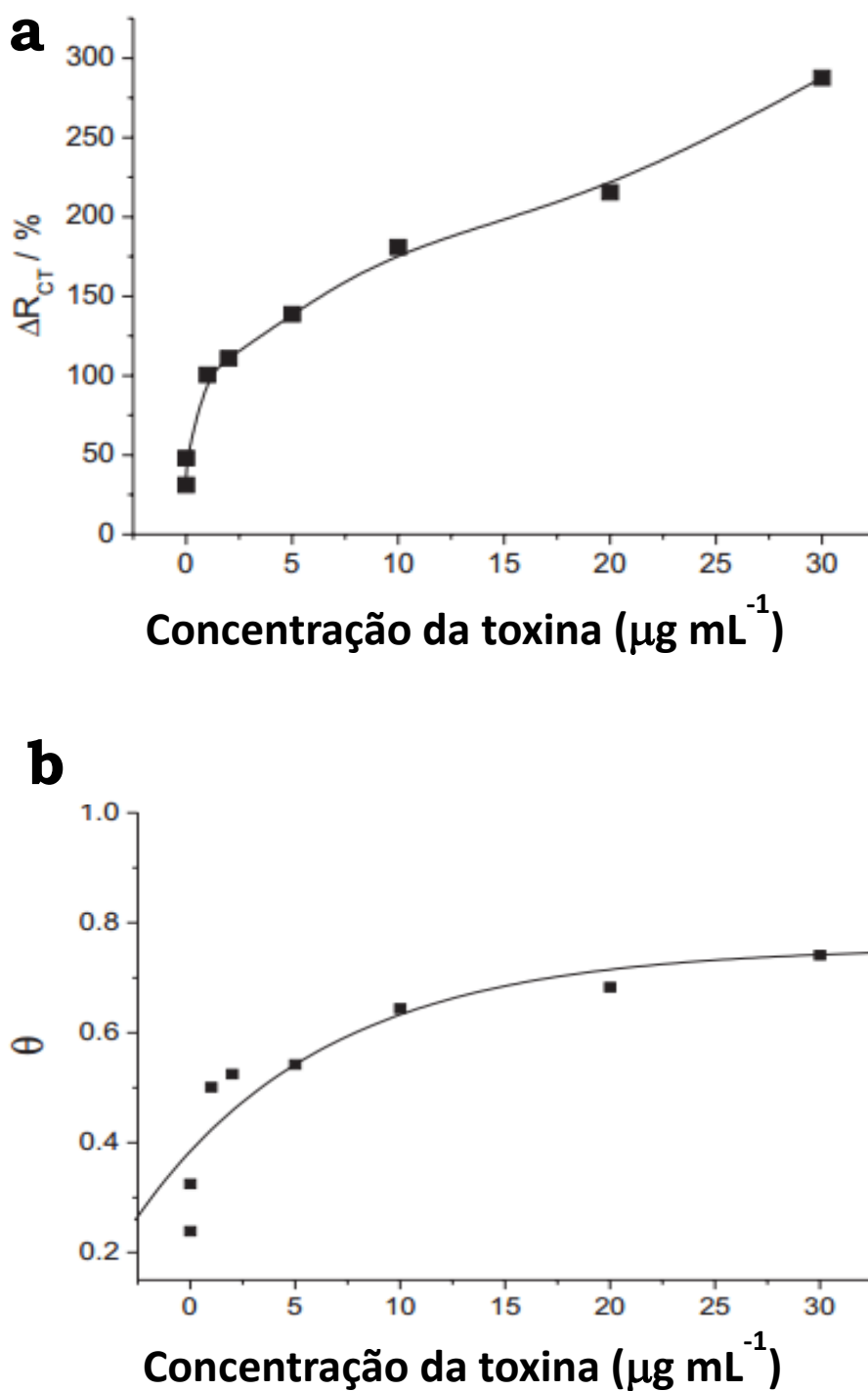
$$\theta = 1 - \left(\frac{R_B}{R_C} \right) \quad (8)$$

onde R_B é a resistência a transferência de carga do biosistema Cys-MAb-AFB1 e R_C é a resistência a transferência de carga das diferentes concentrações de AFB1 após a interação com o imunossensor. A figura 25b mostra o gráfico de θ em função da concentração da toxina ligada ao imunossensor. Os valores de θ exibem uma relação linear com a concentração da toxina e são encontrados 75% para 3×10^4 ng mL⁻¹ de toxina.

Tabela 2 - Valores dos elementos do circuito equivalente do ajuste dos resultados de impedância.

Eletrodo Modificado	Toxina (ng/mL)	R_{CT}/kΩ	Q/μF	N
Eletrodo de ouro limpo		0,75	8,15	0,68
Cisteína		2,99	3,34	0,81
Cisteína -EDCNHS		1,22	7,19	0,72
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo		2,40	3,78	0,77
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo -BSA		3,20	5,27	0,76
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	0,5	4,20	2,78	0,80
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	1	4,74	4,30	0,80
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	1×10^3	6,42	2,98	0,80
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	2×10^3	6,75	1,69	0,86
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	5×10^3	7,00	1,74	0,87
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	1×10^4	8,99	1,41	0,89
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	2×10^4	10,10	1,53	0,88
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Toxina	3×10^4	12,40	3,03	0,84
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	0,5	3,70	3,50	0,85
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	1	4,04	3,91	0,83
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	1×10^3	5,06	7,50	0,76
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	2×10^3	6,21	5,12	0,80
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	5×10^3	6,76	4,00	0,83
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	1×10^4	9,81	4,88	0,81
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	2×10^4	10,84	4,60	0,81
Cisteína -EDCNHS-Anticorpo-BSA-Arroz	3×10^4	14,70	3,87	0,82

Figura 25 – Variação da resistência à transferência de elétrons (ΔR_{ct}) (a) e cobertura superfície pela toxina (θ) em função das diferentes concentrações de AFB1.

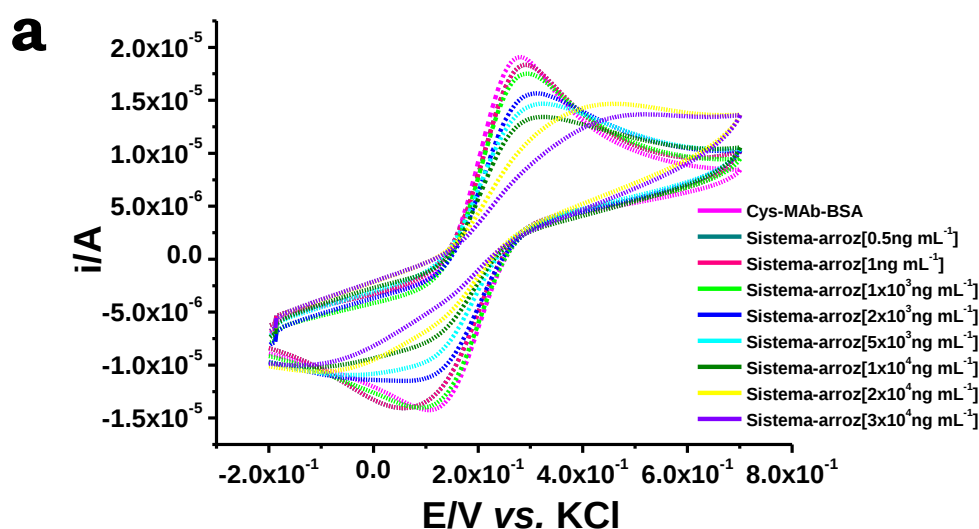


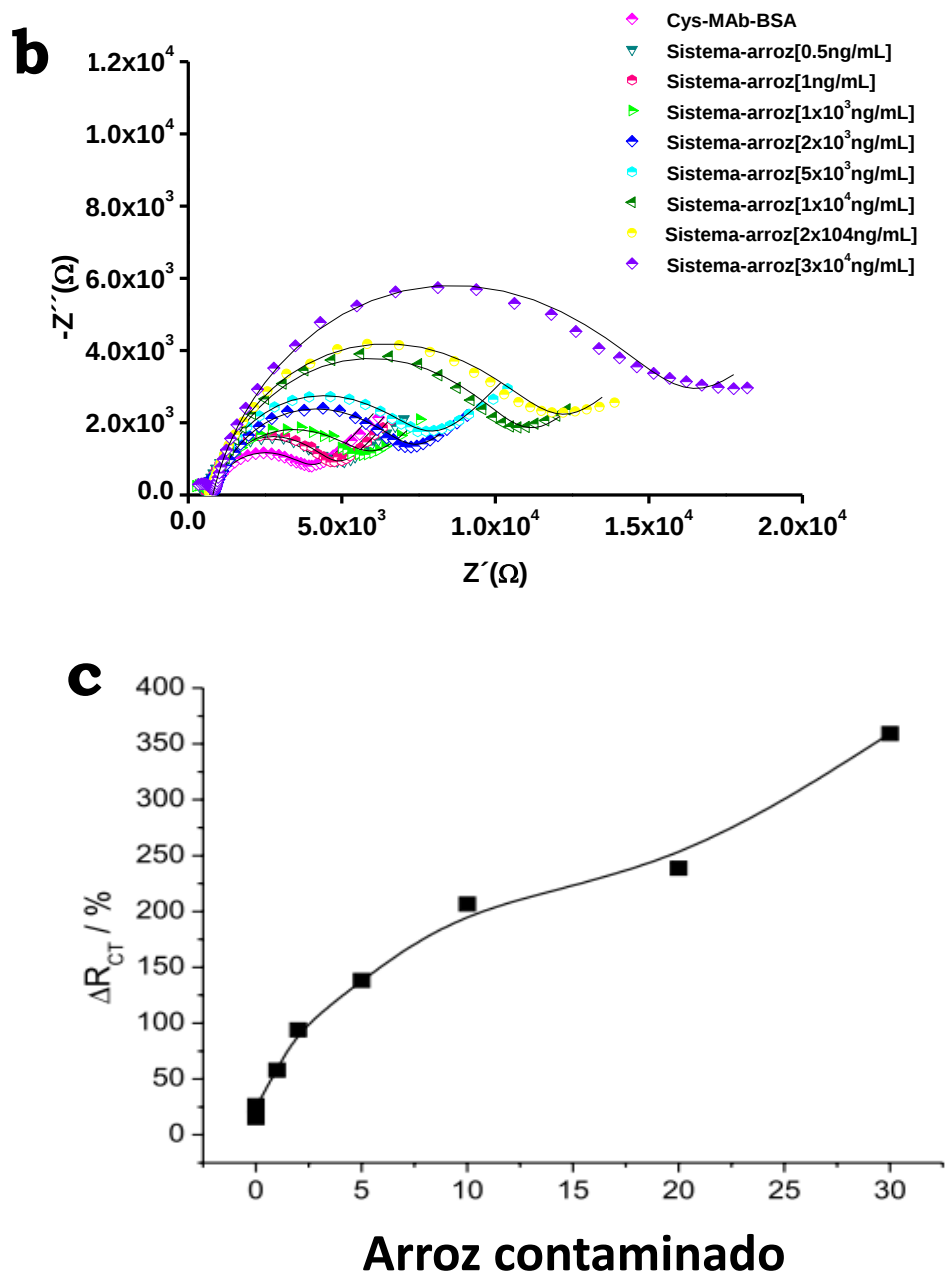
5.1.4 Análise das amostras

Após as análises iniciais, o imunossensor proposto foi aplicado para determinação de AFB1 em arroz para testar o desempenho em amostras

alimentícias. A Figura 26 mostra o comportamento eletroquímico do imunossensor utilizando as amostras. Na figura 26a são mostrados os Vcs do biossistema em diferentes concentrações de AFB1 em arroz. Após a montagem do sistema sobre a superfície do eletrodo e o processo de ligação entre anticorpo e AFB1 presente no arroz é possível observar uma diminuição nos picos de corrente da sonda redox seguido de um aumento na separação dos picos. Um estudo mais detalhado da sensibilidade do imunossensor foi conduzido por EIE. Concentrações distintas de AFB1 em arroz foram analisadas (0,5, 1, 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 3×10^4 ng mL⁻¹) e espectro de impedância revelou um aumento na R_{ct} proporcional a concentração de AFB1 (Fig. 26b). Em maiores concentrações pode ser observado um aumento nos valores de R_{ct} após o processo de reconhecimento de AFB1. Na figura 26c foi observada uma relação linear positiva entre ΔR_{ct} e a concentração de AFB1 disponível no arroz contaminado. Portanto, esses dados indicam que o sensor proposto pode detectar AFB1 em amostras de arroz adicionadas de pequenas concentrações (0,5 ng mL⁻¹), demonstrando que o sistema biossensível estabelecido pode ser aplicado para determinação de AFB1 em produtos agrícolas.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos (a), diagramas de Nyquist e variação da resistência a transferência de elétrons (ΔR_{ct}) do imunossensor antes e após a interação com AFB1 em diferentes concentrações de arroz contaminado (c).



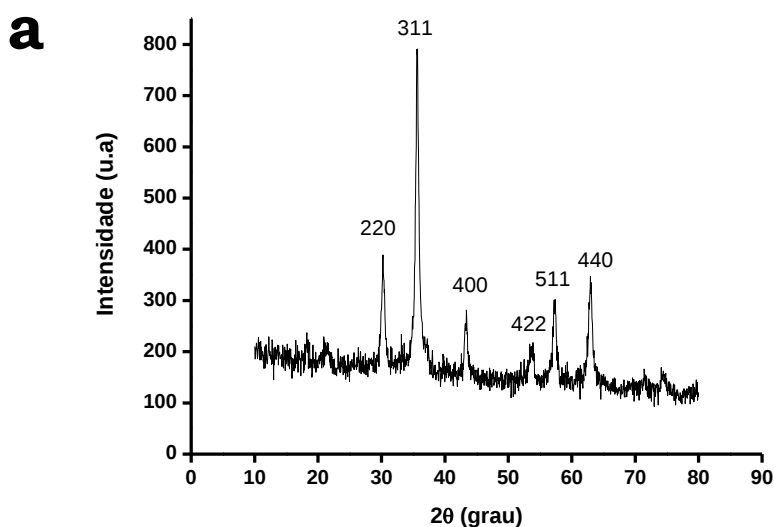


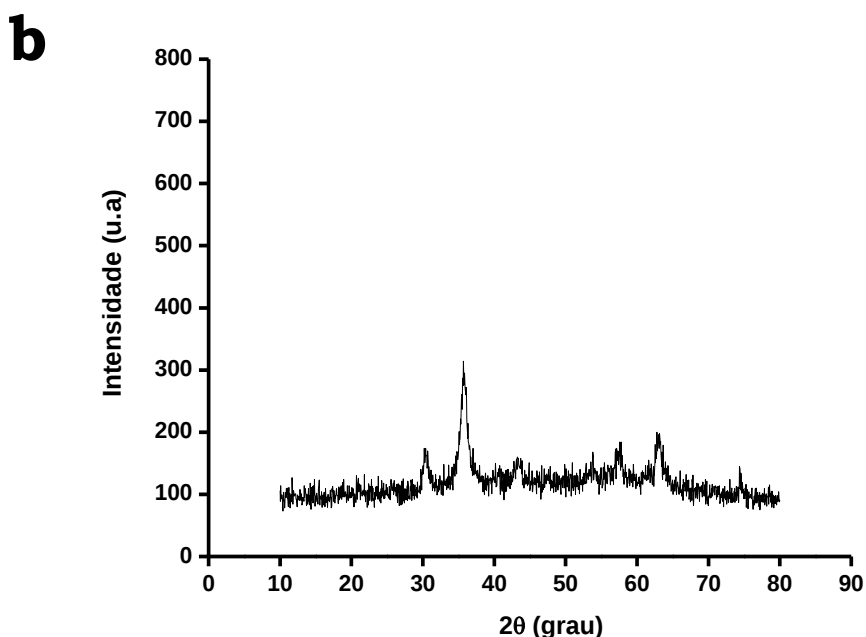
5.2 Imunossensor eletroquímico baseado em monocamada auto-organizada de ácido mercaptobenzóico e nanopartículas de óxido de ferro para detecção de aflatoxina B1 em amendoim

5.2.1 Caracterização das $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ por difração de raios X

Foram realizadas medidas de difração de raios X das NpsFe_3O_4 e $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$. Os picos encontrados no difratograma da Fig. 27a são característicos da magnetita segundo JCDPS-ICCD 19-0629. É possível observar na Fig. 27b uma variação causada no difratograma decorrente da presença de um material amorfo (NH_2), o que resulta em picos com menores intensidades. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Huang et al., 2010, no qual a utilização da quitosana na síntese de um nanocompósito de nanopartículas e óxido de ferro/quitosana produziu uma redução da cristalinidade. O tamanho das partículas foi determinado através da equação de Scherrer (equação 6) demonstrando $\text{Nps Fe}_3\text{O}_4$ (137nm) e $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ (165nm).

Figura 27 – Difratogramas das NpsFe_3O_4 e $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$



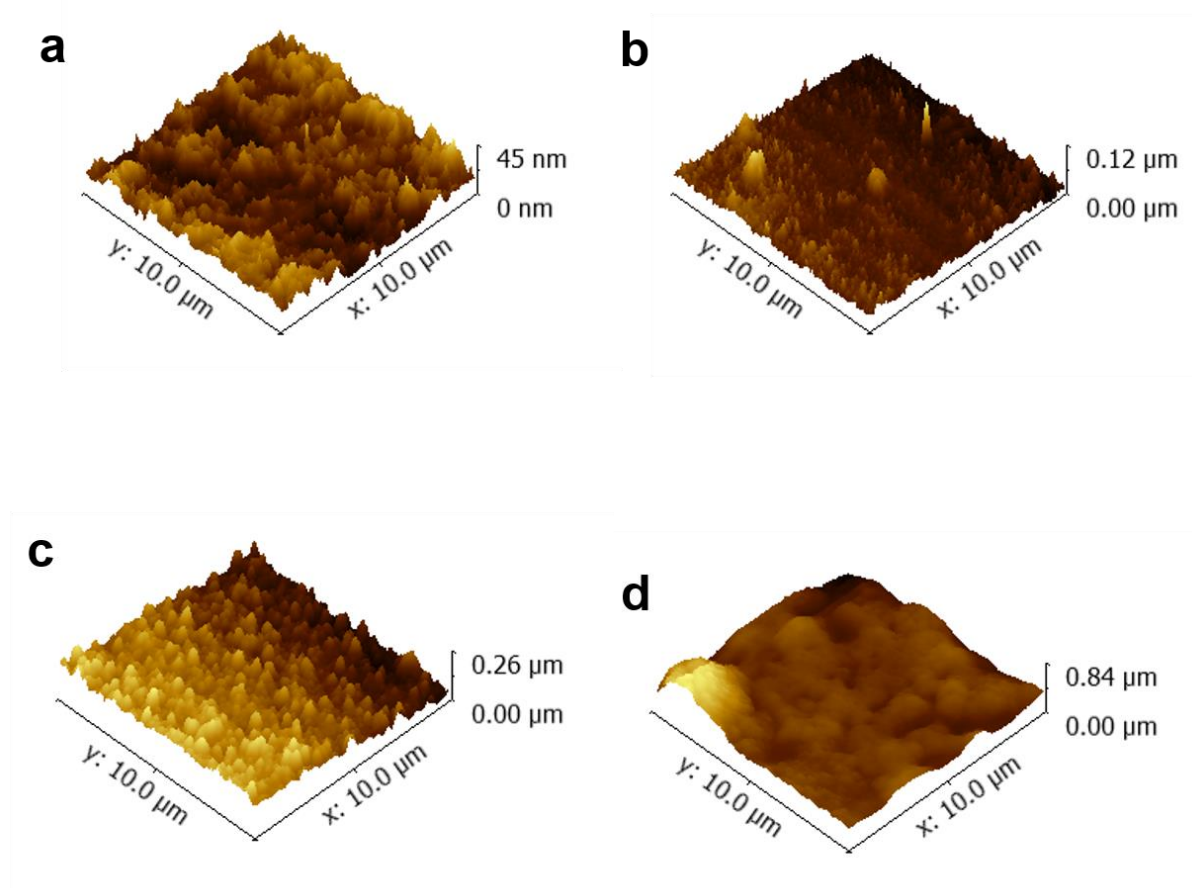


5.2.2 Análises de AFM

A técnica de AFM é uma ferramenta útil para a obtenção de informações sobre as características da topografia do imunossensor após cada etapa de modificação do eletrodo (MALVANO et al., 2016). A Fig. 28 representa a arquitetura da superfície do MBA, MBA-Fe₃O₄, MBA-Fe₃O₄-NH₂-MabAFB1 e MBA-Fe₃O₄-NH₂-MabAFB1-AFB1. A caracterização topográfica do imunossensor foi realizada através de AFM em modo não contato. A Fig. 28a mostra a topografia da superfície do eletrodo após a modificação com o MBA revelando pequena rugosidade. A fig. 28b mostra a superfície topográfica após ligação das Fe₃O₄-NH₂ com o MBA a qual é significativamente diferente da topografia na imagem 28a. O resultado da fig. 28c demonstra que as Fe₃O₄-NH₂ representam um meio eficaz para a imobilização do MabAFB1, uma vez que após a adição dos anticorpos é possível verificar um aumento na rugosidade da superfície e uma diferença de 0,14μm na altura das imagens. Na fig. 28d é possível visualizar o completo recobrimento da superfície decorrente da formação do complexo antígeno-anticorpo. Em adição, as diferenças nas alturas (45nm, 0,12μm, 0,26μm e 0,84μm) das imagens 3D de

AFM podem confirmar a modificação da superfície e consequentemente o desenvolvimento do imunossensor.

Figura 28 - Imagens de microscopia de força atômica das superfícies dos substratos contendo MBA (a); MBA-Fe₃O₄ (b); MBA-Fe₃O₄-MabAFB1 (c); MBA-Fe₃O₄-MabAFB1-AFB1 usando modo não contato. Área de varredura 10 × 10 μm.



5.2.3 Caracterização eletroquímica

A Figura 29a mostra o comportamento eletroquímico do EAU na solução de Fe(CN)₆^{4-/3-}. Um pico bem definido do par redox pode ser observado, demonstrando VCs reversíveis. Após a modificação da superfície é possível observar uma diminuição da resposta amperométrica. Este comportamento ocorreu devido a repulsão entre as cargas negativas presentes na estrutura do MBA e a solução de Fe(CN)₆^{4-/3-}. Após a adição dos agentes EDC-NHS uma

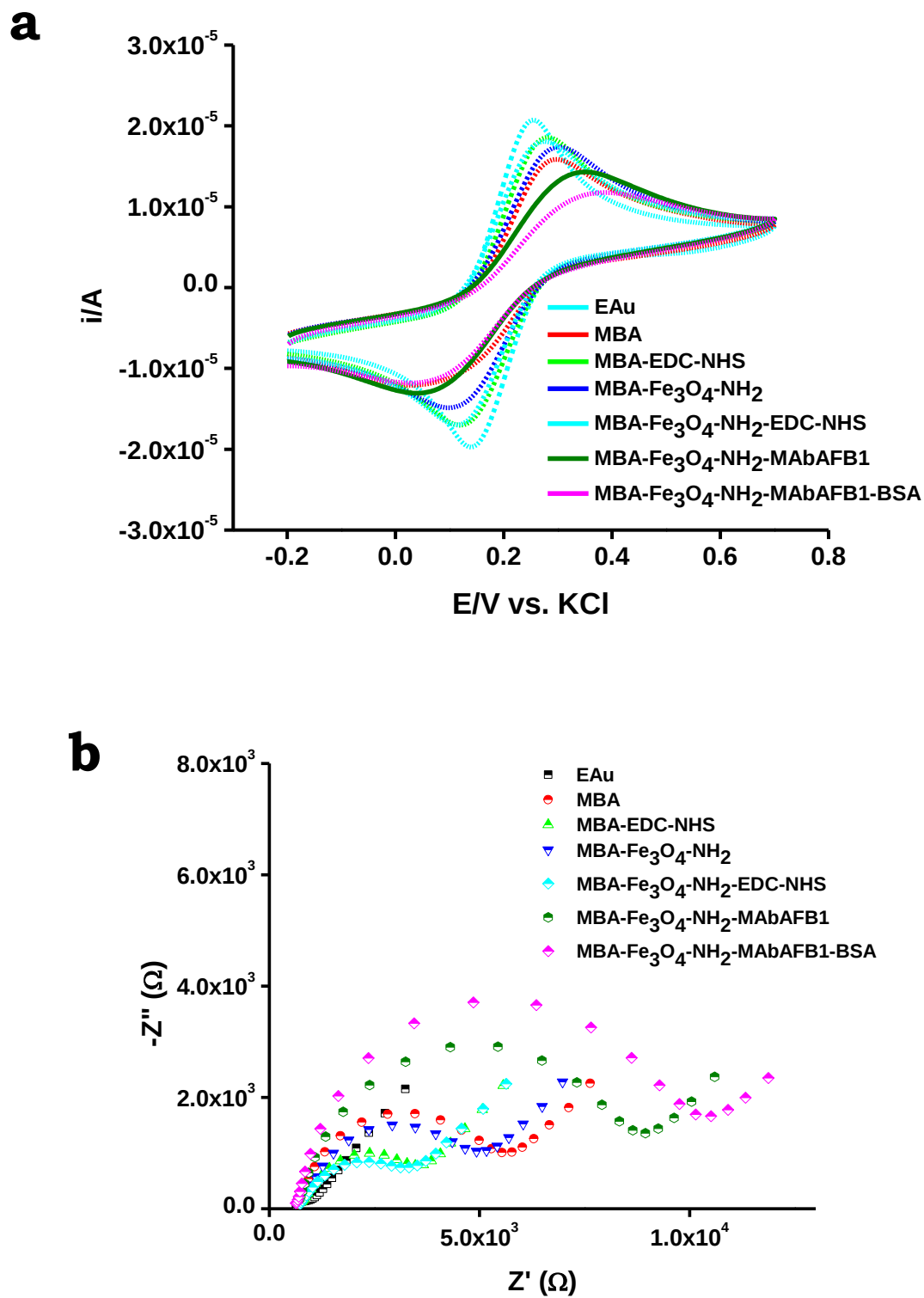
aumento na resposta amperométrica é observada. Os grupos carboxílicos terminais de MBA carregados negativamente ativados foram substituídos pelo éster NHS sobre a superfície do eletrodo. O éster NHS carregado neutra/positivamente contribui para a transferência da sonda redox negativa para o eletrodo (GENG et al., 2008).

As $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ foram ligadas ao MBA através do método de acoplamento EDC:NHS, o que causou uma redução nas correntes de pico, devido a penetração da sonda redox sobre a superfície do eletrodo. Após isso, o MAb-AFB1 foi ligado covalentemente ao eletrodo modificado com MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ também usando o método de acoplamento EDC:NHS. A imobilização do MAb-AFB1 sobre o sistema promoveu uma diminuição das correntes de pico anódica e catódica de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/^{3-}$. A diminuição da corrente no sensor pode ser atribuída a formação de uma barreira causada pela imobilização das biomoléculas a qual promove um bloqueio a transporte de elétrons na interface eletrodo/solução. Finalmente, o BSA foi adicionado para bloquear a resposta não específica e aumentar a especificidade do sensor (ADITYA SHARMA et al., 2010).

Na Fig. 29b a curva correspondente ao EAU revela um pequeno semicírculo, associado a uma baixa resistência a transferência de elétrons ($2,79 \times 10^2 \Omega$). O MBA sobre a superfície do eletrodo induz a uma diminuição do R_{ct} ($3,77 \times 10^3 \Omega$) indicando um bloqueio à transferência de elétrons.

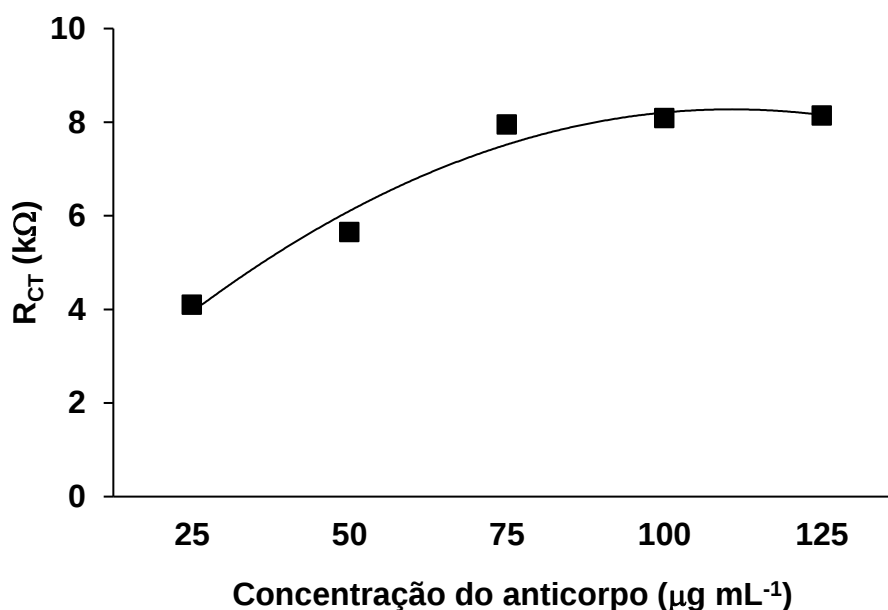
A ativação da monocamada de MBA usando os agentes acoplantes diminui os valores de R_{ct} (2,95 K Ω). A imobilização das $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ sobre o eletrodo modificado com MBA e subsequentemente MAb-AFB1 leva a um aumento nos valores de R_{ct} (4,31 K Ω para 7,95 K Ω , respectivamente). A adição de BSA sobre o eletrodo modificado promove um aumento adicional no valor de R_{ct} (9,29 K Ω). Como esperado, o aumento nos valores de R_{ct} é proporcional a quantidade de material imobilizado, que retarda a cinética de transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e a sonda redox. Assim, a partir do exposto a camada sensora foi construída com sucesso.

Figura 29 – Voltamogramas cíclicos (a) e Diagramas de Nyquist (b) de cada etapa da montagem do imunossensor.



Estudos prévios, variando a concentração de MAb-AFB1 (25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram realizados (Fig. 30). É importante notar que o aumento na concentração de MAB-AFB1 aumentou o R_{ct} até a concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a partir deste ponto ocorreu a formação de um platô devido a saturação da superfície. Portanto, 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a concentração de anticorpo utilizada nos experimentos.

Figura 30 - R_{ct} vs concentração do anticorpo.



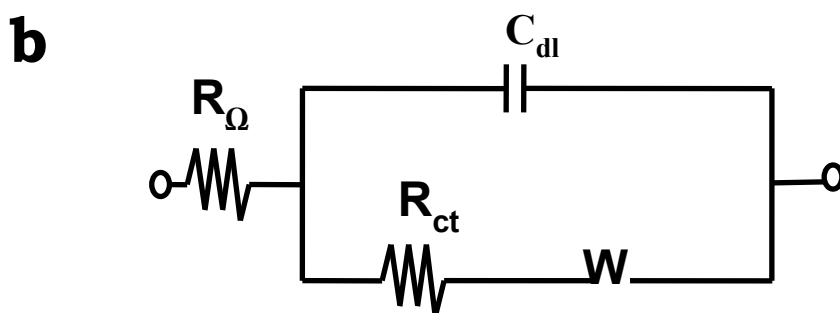
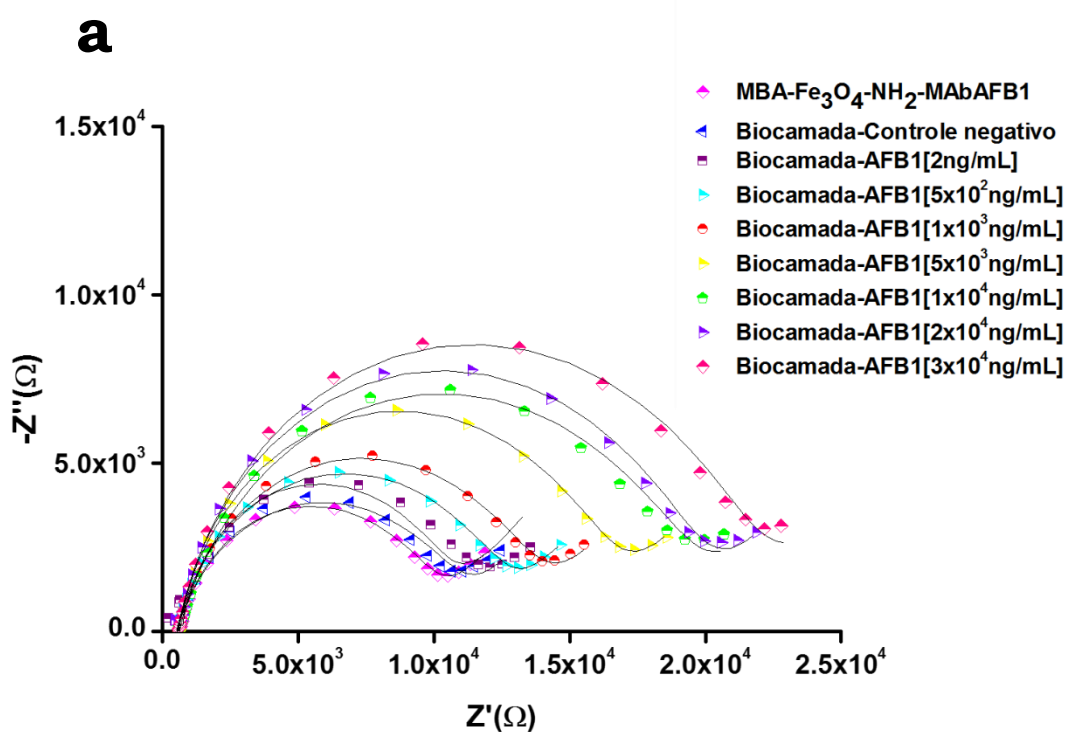
5.2.4 Detecção impedimétrica da AFB1

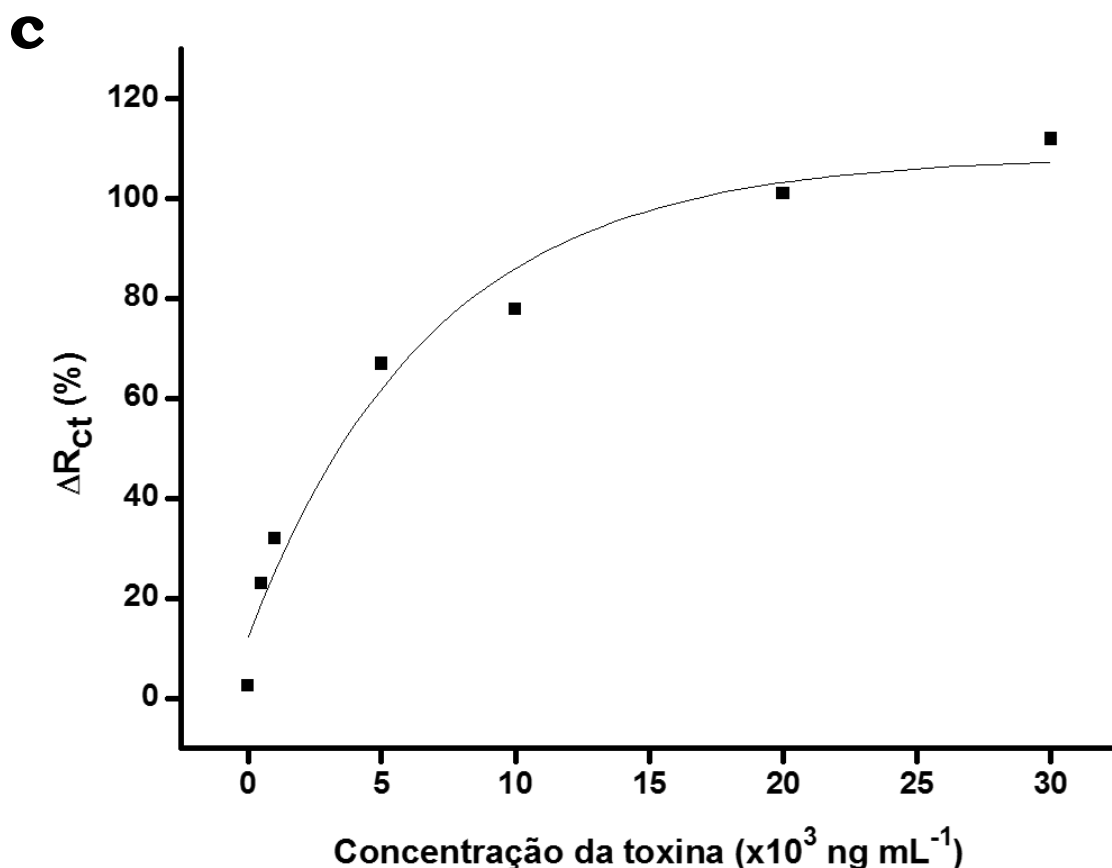
Na fig. 31 é possível visualizar o processo de detecção da plataforma sensora para sete diferentes concentrações de AFB1 e o controle negativo. A formação com complexo MAb-AFB1-AFB1 (anticorpo-antígeno) sobre a superfície do eletrodo promove aumento no R_{ct} proporcional a concentrações de AFB1 como pode ser observado nos diagramas de Nyquist. A Fig. 31a indica que o resultado impedimétrico para o controle negativo (ocratoxina A) é insignificante comprovando a especificidade do imunossensor.

Curvas teóricas (Fig. 30a) foram obtidas dos dados de impedância usando o circuito equivalente de Randles (Fig. 31b). Os componentes analisados foram resistência eletrolítica (R_Ω) que representa as propriedades

de carga da solução eletrolítica, a capacitância de dupla camada elétrica (C_{dl}) que depende das características dielétricas da interface eletrodo/solução, a resistência a transferência de carga (R_{ct}), que controla a cinética de transferência da sonda redox na interface e a impedância de Warburg (W) que representa a difusão da sonda redox para o eletrodo.

Figura 31 – Diagramas de Cole-Cole do imunossensor após a interação com as sete concentrações de AFB1 e o controle negativo (ocratoxina A) (a); circuito equivalente adotado para o ajuste dos dados de impedância (b) e $\Delta R_{ct}\%$ em função da concentração de AFB1 (c).





Os parâmetros do circuito equivalente das curvas ajustadas são mostrados na tabela 3. A performance do sensor foi avaliada através da variação da R_{ct} (ΔR_{ct}), de acordo com a equação 9:

$$\Delta R_{ct} = \left(\frac{R_{ct(AFB1)} - R_{ct(sensor)}}{R_{ct(sensor)}} \right) \times 100 \quad (9)$$

Nesta equação, $R_{ct(AFB1)}$ são os valores da R_{ct} após formação do complexo anticorpo-antígenos com as sete diferentes concentrações de micotoxina e do amendoim contaminado com a micotoxina. $R_{ct(sensor)}$ representa os valores de R_{ct} da plataforma de reconhecimento. O ΔR_{ct} aumentou proporcionalmente com a concentração (Fig. 31c) da toxina evidenciando o processo de bioreconhecimento. A equação de regressão da curva de calibração apresenta um comportamento exponencial. Em adição, resposta não significativa foi encontrada quando a plataforma foi utilizada para analisar a ocratoxina A

utilizada como controle negativa. Esses resultados revelam que a camada sensora pode detectar a AFB1.

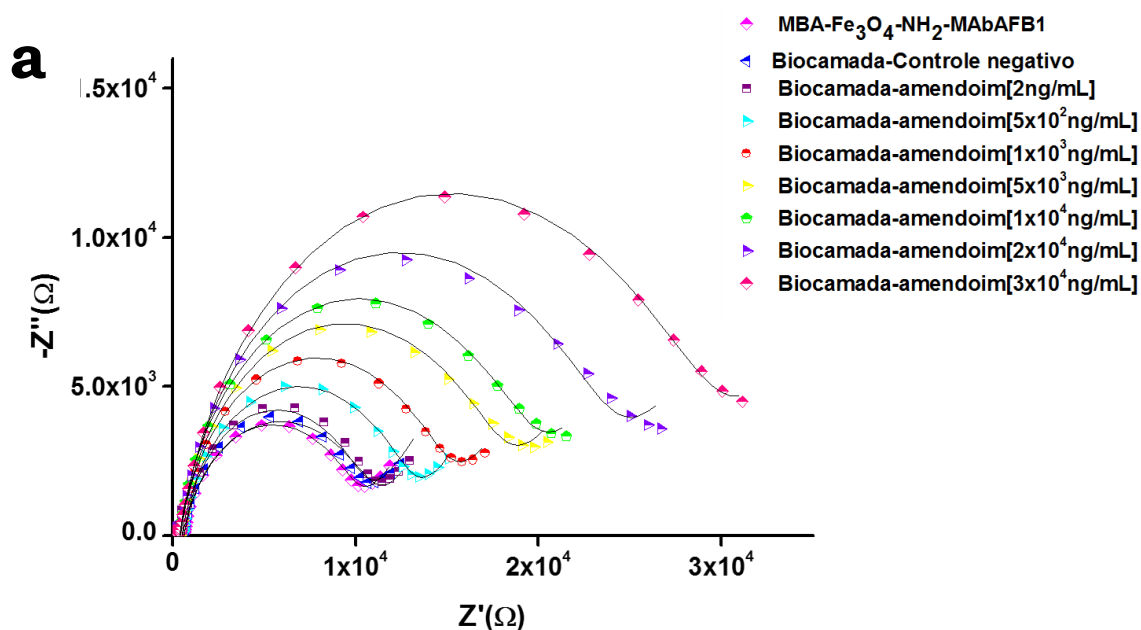
Tabela 3 - Valores dos elementos do circuito equivalente do ajuste dos resultados de impedância.

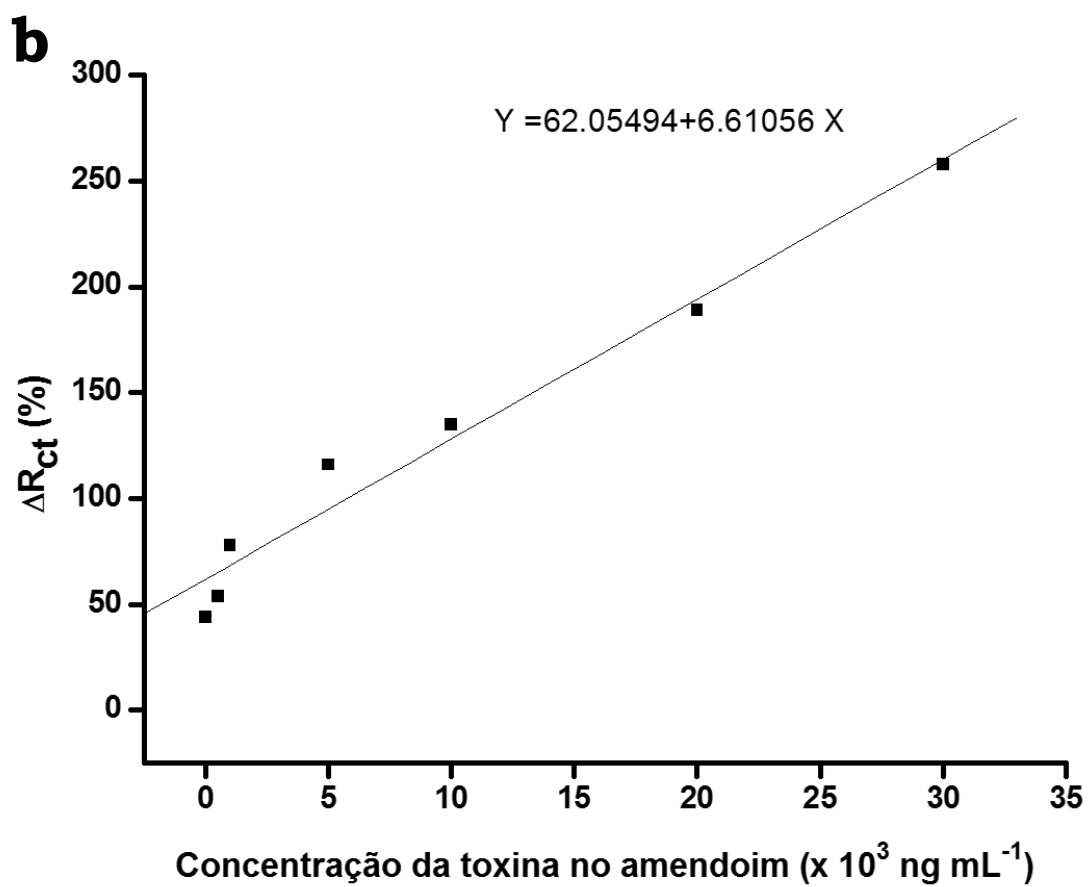
Eletrodo Modificado	Toxina (ng/mL)	R_{Ω} (Ω)	C_{dl} (F)	R_{ct} (Ω)	W (Ω)
EAu		6,36e+2	9,83e-7	2,79e+2	3,85e-4
MBA		7,33e+2	9,89e-7	3,77e+3	2,95e-4
MBA-EDC-NHS		7,14e+2	1,10e-5	2,95e+3	4,32e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂		7,20e+2	6,91e-6	4,31e+3	4,25e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS		6,86e+2	1,24e-5	2,81e+3	4,06e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA		6,24e+2	3,20e-6	9,29e+3	4,32e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 25µg/mL		6,88e+2	9,07e-6	4,10e+3	4,28e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 50µg/mL		6,41e+2	3,95e-6	5,65e+3	4,29e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 75µg/mL		6,59e+2	3,18e-6	7,95e+3	4,27e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 100µg/mL		6,76e+2	2,87e-6	8,09e+3	4,19e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 125µg/mL		5,94e+2	3,45e-6	8,14e+3	4,32e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	2	7,05e+2	1,0e-6	8,15e+3	2,17e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	5×10 ²	5,75e+2	8,66e-7	9,80e+3	2,16e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	1×10 ³	5,94e+2	1,08e-6	1,05e+4	2,09e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	5×10 ³	6,20e+2	1,07e-6	1,33e+4	1,99e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	1×10 ⁴	7,02e+2	1,24e-6	1,42e+4	1,67e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	2×10 ⁴	6,27e+2	7,54e-7	1,60e+4	1,79e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxina	3×10 ⁴	6,33e+2	1,59e-6	1,69e+4	1,74e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	2	6,23e+2	2,11e-6	1,15e+4	2,40e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	5×10 ²	5,08e+2	2,31e-6	1,23e+4	3,87e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	1×10 ³	4,27e+2	2,84e-6	1,42e+4	3,63e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	5×10 ³	3,96e+2	2,48e-6	1,72e+4	3,02e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	1×10 ⁴	4,04e+2	3,60e-6	1,87e+4	3,36e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	2×10 ⁴	3,99e+2	2,19e-6	2,30e+4	2,57e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Amendoim	3×10 ⁴	3,80e+2	3,03e-6	2,85e+4	3,04e-4

5.2.5 Análise do amendoim

Teste adicionais foram realizados para verificar a performance do imunossensor para detecção de AFB1 em amendoim. A sensibilidade do imunossensor para as diferentes concentrações de AFB1 foram avaliadas utilizando o EIE (Fig. 32a). O bioreconhecimento de AFB1 resultou no aumento da R_{ct} proporcional a concentração de AFB1 ($1,15 \times 10^4 \Omega - 2,5 \times 10^4 \Omega$). Uma avaliação minuciosa através do ΔR_{ct} , demonstrou uma relação linear com a concentração da toxina presente no amendoim (Fig. 32b). A equação de regressão da curva de calibração é $y = 62.05494 + 6.61056 x$, $R^2 = 0.97039$. Esses dados sugerem que a plataforma sensora desenvolvida é um método interessante para possível aplicação na detecção de AFB1 em alimentos e rações.

Figura 32 – Diagrama de Cole-Cole (a) e $\Delta R_{ct}\%$ (b) do imunossensor após a interação com AFB1 em diferentes concentrações de amendoim contaminado.





CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÕES

Nesta tese foram desenvolvidos dois imunossensores para detecção de aflatoxina B1 em arroz e amendoim. Para detecção de AFB1 no arroz foi construída uma plataforma sensorial baseada em monocamadas de cisteína e anticorpo monoclonal. Já para análise do amendoim um imunossensor constituído por uma monocamada de ácido mercaptobenzóico, nanopartículas de magnetita modificadas com NH_2 e anticorpo monoclonal foi desenvolvido. A caracterização eletroquímica foi realizada através das técnicas de VC e EIE que demonstram alterações da resposta amperométrica e resistência à transferência de carga após cada etapa de montagem dos imunossensores, respectivamente. A visualização topográfica de todo o processo de modificação do imunossensor foi possível por meio da análise das imagens de AFM. Os sistemas sensores MAbAFB1-Cys e MAbAFB1- Fe_3O_4 - NH_2 -MBA demonstraram a capacidade de detectar a AFB1 em arroz e amendoim na ordem de ng.mL^{-1} , respectivamente. Dessa forma, os dispositivos resultantes exibiram uma boa sensibilidade e reprodutibilidade e podem ser usados para detectar toxinas em alimentos.

PERSPECTIVAS

7.1 PERSPECTIVAS

- Estudar os sistemas propostos em outros tipos de aflatoxinas e outras classes de micotoxinas e alimentos;
- Desenvolver novas plataformas de detecção com maior sensibilidade.

REFERÊNCIAS

8.1 REFERÊNCIAS

- ALBERS, A.P.F.; MELCHIADES, F.G.; MACHADO, R.; BALDO, J.B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**. v. 48, n. 305, p. 34-37, 2002.
- ÁLVAREZ M.; CALLE, A.; TAMAYO, J.; LECHUGA, L.M.; ABAD, A.; MONTOYA, A. Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT. **Biosensors and Bioelectronics**. v.18, p. 649-653, 2003.
- ARYA, S.K.; SOLANKI, P.R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- AUDENAERT, K.; VANHEULE, A.; HÖFTE, M.; HAESAERT, G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of Fusarium to its environment. **Toxins**. v. 6, p. 1-19, 2013.
- BALLERSTADT, R.; EVANS, C.; MCNICHOLS, R.; GOWDA, A. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, p. 275-284, 2006.
- BARD J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and applications**, John Wiley: New York., 2001.
- BARNA-VETRÓ, I.; SOLTÍ, L.; TÉREN, J.; GYÖNGYÖSI, Á.; SZABÓ, E.; WÖLFLING, A. Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 12, p. 4071– 4074, 1996.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical of Microbiology Review**. v.16, p. 497–516, 2003.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**. v. 50, p. 1058-1073, 1987.

BLAU, L.; MENEGON, R.F.; CHUNG, M.C. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. **Química Nova**. v. 29, 2006.

Braga, S.M.L.F.M.; Cardoso M.A.A.; Macêdo, R.O. Micotoxinas em produtos naturais: Alguns aspectos e perspectivas. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 15, p. 53-68, 2002.

BRETT, A.M.O.; BRETT, C. M. A. Cyclic Voltammetry and Linear Sweep Techniques. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**. Oxford University Press, 1996, Cap. 9, p. 174.

CAST, Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Ames, Iowa: Task Force Report N° 139, p36-128, 2003.

CASTILLO, G.; SPINELLA, K.; POTURNAYOVÁ, A.; ŠNEJDÁRKOVÁ, M.; MOSIELLO, L. HIANIK, T. Detection of aflatoxin B₁ by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. **Food Control**. v. 52, p. 9-18, 2015.

Castrejón-Parga, K. Y.; Camacho-Montes, H.; Rodríguez-González, C. A.; Velasco-Santos, C.; Martínez-Hernández, A.L.; Bueno-Jaquez, D.; Rivera-Armenta, J. L.; Ambrosio, C.R.; Conzalez, C.C.; Mendoza-Duarte, M.E.; García-Casillas, P.E. Chitosan–starch film reinforced with magnetite-decorated carbon nanotubes. **Journal of Alloys and Compounds**. v. 615, S505–S510, 2014.

CECCHI, H.M. Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos. 2ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2003.

CHAKI, N.K. E VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 17, p. 1-12, 2002.

CHANG, S.M, MURAMATSU, H; NAKAMURA, C; MIYAKE, J. The principle and applications of piezoelectric crystal sensors. **Materials Science and Engineering**. v.12, p.111-123, 2000.

CHU, F.S.; LEE, R.C.;TRUCKSESS, M.W.;PARK, D.L. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of cleanup for Thin-Layer Chromatography of aflatoxin B1 in corn, peanuts, and peanut butter. **Journal Association of Official Analytical Chemists Int**. v. 71, p. 953-956, 1988.

CIRNE E PATACAS, R. **Desenvolvimento, Caracterização e Optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. 127 f. Dissertação. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

CONROY, P.J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R.J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 20, p. 10-26, 2009.

COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. **Biosensor and Bioelectronics**. v. 14, p. 443-456, 1999.

CULLITY, B.D.; STOCK, S.R.; STOCK, S., **Elements of X ray Diffraction** – 3rd Edition, Prantice Hall, NY, 2001.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. v. 334, p. 41-69, 2003.

D'SOUZA, S.F. Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 16, p. 337–353, 2001.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**. v. 27, p. 970-979, 2004.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos clínicos, preventivos e patológicos. **Biológico**. v. 64, p. 187-191, 2002.

DINÇKAYA, E.; KINIK, Ö.; SEZGINTÜRK, M.K.; ALTUĞ, Ç.; AKKOCA, A. Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p. 3806–3811, 2011.

DING, P.; LIU, R.; LIU, S.; MAO, X.; HU, R. LI, G. Reusable gold nanoparticle enhanced QCM immunosensor for detecting C-reactive protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 188, p. 1277-1283, 2013.

DONG, S., LUO, G., FENG, J., LI, Q.W., GAO, H. Immunoassay of Staphylococcal enterotoxin C₁ by Ftir spectroscopy and electrochemical gold electrode. **Eletroanalysis**. v.13, p. 30-33, 2001.

EDSON, G. R. F. **Imobilização de enzimas em plataformas (Sub)microestruturadas para aplicação em biossensores**. 2012. 155 f. Tese. USP. São Carlos.

ESTEVES, A.C.C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**. v. 27, p. 798-806, 2004.

FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**. v.29, p. 137-142, 2006.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, Marta Chagas. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**. v. 2, p. 113-127, 2006.

FERRETI, S.; PAYTNER, S.; RUSSELL, D.A.; SAPSFORD, K.E. E RICHARDSON, D.J. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 19, p. 530-540, 2000.

FRANK, L.A., PETUNIN, A.I. VYSOTSKI, E.S. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label. **Analytical Biochemistry**. v. 325, p. 240-246, 2004.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. EMPREGO DE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS. **Química Nova**. v. 26, p. 381-389, 2003.

GALAL, A.; ATTA, N.F.; EL-ADS, E.H. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles - Towards selective electrochemical sensors. **Talanta**. v. 93, p. 264-273, 2012.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S.A.S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**. v. 29, p. 105-112, 2006.

GAN, N.; JIN, H.J.; LI, T.H.; ZHENG, L. Fe₃O₄/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of

alfa-fetoprotein. **International Journal of Nanomedicine**. v. 6, p. 3259-3269, 2011.

GARCÍA, R.; PÉREZ, R. Dynamic atomic force microscopy methods, **Surface Science Reports**. v. 47, p. 197-301, 2002.

GENG, P.; ZHANG, X.N.; MENG, W.W.; WANG, Q.J.; ZHANG, W.; JIN, L.T.; FENG, Z.; WU, Z.R. Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**. v. 53, p. 4663-4668, 2008.

GIL, E.S.; KUBOTA, L.T. YAMAMOTO, Y.I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**. v. 22, p. 874-881, 1999.

GUBIN, S.P.; KOKSHAROV, Y.A.; KHOMUTOV, G.B.; YURKOV, G.Y. Magnetic nanoparticles: Preparation methods, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**. v. 74, p. 439-520, 2005.

HALL, R.H. Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 425-432, 2002.

HANIOKA, N.; NONAKA, Y.; SAITO, K.; NEGISHI, T.; OKAMOTO, K.; KATAOKA, H.; NARIMATSU, S. Effect of aflatoxin B1 on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in HepG2 cells. **Chemosphere**. v. 89, p. 526-529, 2012.

HAO, C.; YAN, F.; DING, L.; XUE, Y.D.; JU, H.X. A self-assembled monolayer based electrochemical immunosensor for detection of leukemia K562A cells. **Electrochemistry Communications**. v. 9, p. 1359-1364, 2007.

HEFLE, S.L. Immunoassay fundamentals. **Food Technology**. v. 49, p. 102-107, 1995.

HERRMANN, P. S. P.; DA SILVA, M. A. P.; FO, R. B.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. p. 51-61,1997.

HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Pratical Guide to Scanning Probe Microscopy**, Park Scientific Instruments, 1996.

HUANG, H.Y.; SHIEHB, Y.T.; SHIHA, C.M.; TWUA, Y.K. Magnetic chitosan/iron (II, III) oxide nanoparticles prepared by spray-drying. **Carbohydrate Polymers**. v. 81, 906-910, 2010.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**. v. 167, p.101-134, 2001.

<http://www.glentham.com>. Acesso em 04/01/2016.

<http://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 04/01/2016.

<http://sites.ifi.unicamp.br>. Acesso em 15/02/2017.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, IDJANE S.; TANIWAKI, M.H. MICOTOXINAS EM ALIMENTOS. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**. Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1993, v. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins, Lyon, IARCPress, pp. 245–395.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2002, v. 82, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins, Lyon, IARCPress, pp. 557.

JAIMEZ, J.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A. MAHUZIER, G. PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 882, p.1-10, 2000.

JANEGITZ, B.C.; MARCOLINO JR, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu(II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Química Nova**. v. 30, p. 1673–1676, 2007.

JIANG, D.L.; JI, J.; AN, L.; SUN, X.L.; ZHANG, Y.Z.; ZHANG, G.Y.; TANG, L.L. Mast cell-based electrochemical biosensor for quantification of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). **Biosensors and Bioelectronics**. v. 50, p. 150-156, 2013.

KAPPEL, N.D.; PROLL, F.; GAUGLITZ, G. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, p. 2295-2300, 2007.

KATZ, E.; WILLNER, L. Probing biomolecules interactions of conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA – sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**. v. 15, p. 913-947, 2003.

KIHARA, T.; MATSUO, T.; SAKAMOTO, M.; YASUDA, Y.; YAMAMOTO, Y.E.; TANIMURA, T. Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors sciences. **Toxicological Sciences**, Oxford, v.53, p. 392-399, 2000.

KISSENGER, P. T.; HEINEMAN, W.R. Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**. v. 60, p. 702-706, 1983.

KOLOSOVA, A.Y.; SHIM, W.; YANG, Z.; EREIMIN, S.A.; CHUNG, D. Direct competitive ELISA based on monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 384, p. 286-294, 2006.

LI, Z.; FU, Y.; FANG, W.; LI, Y. Electrochemical Impedance Immunosensor based on Self-Assembled Monolayers for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 with Signal Amplification using Lectin. **Sensors**. v. 15, p. 19212-19224, 2015.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal Electroceramics**. v. 16, p. 79-91, 2006.

LOPEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L., PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, p. 211-215, 2001.

LOWINSOHN, D. BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**. v. 29, p. 1318-1325, 2006.

LUNA, D.M.N.; AVELINO, K.Y.P.S.; CORDEIRO, M.T.; ANDRADE, C.A. S.; OLIVEIRA, M.D.L.; Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 220, p. 565-572, 2015.

LUPPA, P.B.; SOKOLL, L.J.; CHAN, D.L.W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. v. 314, p. 1–26, 2001.

MA, H.; SUN, J.; ZHANG, Y.; BIAN, C.; XIA, S.; ZHEN, T. Label-free immunosensor based on one-step electrodeposition of chitosan-gold nanoparticles biocompatible film on Au microelectrode for determination of aflatoxin B₁ in maize. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 80, p. 222–229, 2016.

MACDONALD JR. **Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems**. Wiley, New York. 1987.

MARAGOS, C.M.; BUSMAN, M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. **Food Additives and Contaminants**. v. 27, p. 688-700, 2010.

MALVANO, F.; ALBANESE, D.; PILLOTON, R. DI MATTEO, M. A highly sensitive impedimetric label free immunosensor for Ochratoxin measurement in cocoa beans. **Food Chemistry**. v. 212, p. 688-694, 2016.

MCGLYNN, K.A.; HUNTER, KENT; LEVOYER, THOMAS; ROUSH, JESSICA; WISE, PHILIP; MICHIELLI, RITA A.; SHEN, FU-MIN; EVANS, ALISON A.; LONDON, W. THOMAS; BUETOW, KENNETH H. Susceptibility to aflatoxin B₁-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. **Cancer Research**. v. 63, p. 4594-4601, 2003.

MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**. v. 77, p. 237-256, 2002.

MENGUI, U.A. **Crescimento por BEM e caracterização de filmes SnTe e heteroestruturas de SnTe/Sn_{1-x}EuxTe sobre BaF₂**. 117f. 2006.Dissertação

(Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais) Instituto nacional de pesquisas espaciais, São José dos campos, 2006.

MICHOTA, A.; BUKOWSKA, J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. **Journal of Raman Spectroscopy**. v. 34, p. 21–25, 2003.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical chemistry**. v. 47, p.1882-1886, 1975.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**. v. 7, p. 51-65, 2006.

NECAS, D.; KLAPETEK, P.; ANDERSON, C. Gwyddion <http://www.gwyddion.net>., 2008.

NIKNEJAD, F.; ZAINI, F.; FARAMARZI, M.; AMINI, M.; KORDBACHEH, P.; MAHMOUDI, M.; SAFARA, M. **Candida parapsilosis as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by aspergillus species**. Iranian Journal of Public Health. v.42, p. 72–80, 2012.

NUNES, E. O. **População de fungos filamentosos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de santa catarina**. 2008. 200 f. Tese. Florianópolis.

OGIDO, R.. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B1 e fumonisina B1 em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos**. Pirassununga, 2003. 109 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.

PAIVA, E. C. **Estudo do processo de nucleação de cdte crescido sobre si(111) por epitaxia de paredes quentes (hwe)**. 2003. 58 f. Tese. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

PATEL P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 21, p. 96-115, 2002.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**. v. 155, p. 507-513, 2004.

PEREIRA, R.A.; FILHO, A.V.M; ARAÚJO, F.G.S. Influência do lantânio nas propriedades elétricas do titanato de bário obtido por síntese hidrotérmica. *Metalurgia & Materiais*. v. 59, p. 207-212, 2006.

PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**. v. 96, p. 424-444, 2005.

PRADO, G; MATTOS, S.V.M.; PEREIRA, EC. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. v.9, p.138-147, 1989.

PRADO, R.J.; LASCALEA, G.E.; FIGUEIREDO, L.P.; IBIAPINO, A.L. Síntese e caracterização de CaZrO_3 e BaZrO_3 nanoestruturados. **Química Nova**. v. 36, n. 6, p. 762-767, 2013.

POHANKA, M. Monoclonal and polyclonal antibodies production - preparation of potent biorecognition element. **Journal of Applied Biomedicine**. v. 7, p. 115-121, 2009.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S.S. Lectin-based: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology**. v. 9, p. 428-443, 2010.

RAWAL, S.; COULOMBE, R. A. Jr. Metabolism of aflatoxin B1 in turkey liver microsomes: the relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 254, p. 349-354, 2011.

RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE, R. A. Jr. Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. **Research Veterinary Science**. v. 89, p. 325-331, 2010.

RICHARD, J.L., Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **International Journal of Food Microbiology**. v. 119, p. 3-10, 2007.

ROGERS, K.R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**. v. 568, p. 222–231, 2006.

RONKAINEN, N.J.; OKON, S.L. Nanomaterial-Based Electrochemical Immunosensors for Clinically Significant Biomarkers. **Materials**. v.7, p. 4669-4709, 2014.

RUMAYOR, V.G.; IGLESIAS, E.G.; GALÁN, O.R.; CABEZAS, L.G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Fundación para el conocimiento madrid. Informe de Vigilancia Tecnológica 119 p.2005.

SANTELLA, R.M. AFLATOXIN B1: MECHANISM OF MUTAGENESIS. **Iatreia Revista médica Universidad de Antioquia**. v. 20, S.38-39, 2007.

SANTOS, Liana Rita Marques. **Estudo da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica na análise dos copolímeros de enxerto**. 1994. 66 f. Dissertação. UNICAMP. Campinas.

SHARMA, A.; MATHARU, Z.; SUMANA, G.; SOLANKI, P.R.; KIM, C.G.; MALHOTRA, B.D. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**. v. 519, p.1213-1218, 2010.

SENGUL, U. Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 24, p 56-62, 2016.

SHARMA, R.P. Immunotoxicity of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 892-897, 1993.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants**. v. 25, p. 146-151, 2008.

SILVA, G.J.L.; ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, I.S.; DE MELO, C.P.; OLIVEIRA, M.D.L. Impedimetric sensor for toxigenic *Penicillium sclerotigenum* detection in yam based on magnetite-poly(allylaminehydrochloride) composite. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 396, p. 258-263, 2013.

SILVA, G.J.L. **Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção de *Penicillium sclerotigenum* baseado no compósito Fe₃O₄-hidrocloro de poli(alilamina)**. 2013, 114 f. Dissertação. Curso de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, J.O.; **Ocorrência de aflatoxina B1 em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias. Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

SLUYTERS-REHBECH, M. Impedances of electrochemical systems: terminology, nomenclature and representation. **Pure Applied Chemistry**. v. 66, p. 1831-1891, 1994.

SOUZA, M.F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**. v. 20, p. 191-197, 1997.

SOUZA, M.F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química nova**. v. 20, p. 191-195, 1997.

STEYN P.S, STANDER M.A. Mycotoxins as causal factors of disease in humans. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**. v.18, p. 229-243, 1999.

STROKA, J.; ANKLAM, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. **TrACTrends in Analytical Chemistry**. v. 21 p. 90-95, 2002.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**. v. 175, p. 149-163, 1999.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT J. Progress in Food Contaminants Analysis. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.65-146.

TAN, Y.; CHU, X.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B-1 determination in rice. **Analytical Biochemistry**. v. 387, p. 82-86, 2009.

TANIWAKI, M.; HANADA, T.; SAKURAI, N. Device for acoustic measurement of food texture using a piezoelectric sensor. **Food Research International**. v.39, p. 1099-1105, 2006.

TARTAJ, P.; MORALES, M.P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., GONZALEZ-CARRENO, T.; SERNA, C.J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 36, R182-197, 2003.

TEDESCHI, L.; DOMENICI, C., AHLUWALIA, A.; BALDINI, F.; MENCAGLIA, A. Antibody immobilisation on fibre optic TIRF sensors. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 85-89, 2003.

TUSSET, A. M; BALTHAZAR, J. M. **Microscopia de força atômica: controle de uma microviga modelada matematicamente com comportamento não-linear e sob ação de amortecimento hidrodinâmico**. Proceedings of the 9th Brazilian Conference on Dynamics Control and their Applications. ISSN: 2178-3667 p.363-370 Serra Negra, SP.

VÄLIMAA, A.; KIVISTÖ, A.T.; LESKINEN, P.I.; KARP, M. A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk. **Journal of Microbiological Methods**. v. 80, p.44-48, 2010.

VELASCO-GARCIA, M.N.; MOTTRAM, T. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. **Biosystems Engineering**. v. 84, p. 1-12, 2003.

WANG, H.; OHNUKI, H.; ENDO, H.; IZUMI, M. Preparation of Amperometric Glucose Biosensor Based on 4-Mercaptobenzoic Acid. **Physics Procedia**. v. 14, p. 2-6, 2011.

WANG, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**. v. 130, p. 421–426, 2005.

WANGIKAR, P.B; DWIVEDI, P.; SINHA, N.; SHARMA, A.K.; TELANG, A.G. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effects. **Toxicology**. v. 215, p. 37-47, 2005.

WILD, C.P.; TURNER, P.C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, Oxford, v.17, p.471-481, 2002.

YANG, L.J.; LI, Y.B. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of Escherichia coli O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 20, p. 1407-1416, 2005.

YANG,L.; REN, X.; TANG, F.; ZHANG, L. A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafioncomposite film **Biosensors and Bioelectronics**. v. 25 p. 889-895, 2009.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**. v. 15, p. 129-144, 2011.

ZAMBORINI, F.P.; LEOPOLD, M.C.; HICKS, J.F.; KULESZA, P.J.; MALIK, M.A.; MURRAY, R.W. Electron hopping conductivity and vapor sensing properties of flexible networkpolymer films of metal nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**. v. 124, p. 8958–8964, 2002.

ZHANG, S.; SHEN, Y.; SHEN, G.; WANG, S.; SHEN, G.; YU, R. Electrochemical immunosensor based on Pd–Au nanoparticles supported on functionalized PDDA-MWCNT nanocomposites for aflatoxin B1 detection. **Analytical Biochemistry**. v. 494, p. 10-15, 2016.

ZHOU, Y.; ZHAO, H.; HE, Y.; DING, N.; CAO, Q. Colorimetric detection of Cu^{2+} using 4-mercaptobenzoic acid modified silver nanoparticles **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**. v. 391, p. 179– 183, 2011.

APÊNDICE

Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B₁ in Rice

Estéfani P. Simão,^a Gilcelia J. L. S. Barbieri,^b Cesar A. S. Andrade^{a,b} and Maria D. L. Oliveira^{*,a}

^aDepartamento de Bioquímica and ^bPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brazil

An electrochemical immunosensor for detection of aflatoxin B₁ (AFB₁) in food samples was developed. The sensor is composed by cysteine monolayer immobilized on gold electrode surface with subsequent bind to monoclonal antibody (MAb-Cys-modified electrode). The AFB₁ detection was evaluated by cyclic voltammetry and impedance spectroscopy in the frequency range of 100 mHz-100 kHz. Samples of rice were spiked with AFB₁ to evaluate the sensitivity of the sensor. Impedance spectra could be fitted to a Randles equivalent circuit containing a constant phase element. Atomic force microscope (AFM) images showed MAb-AFB₁ complex immobilized across the electrode surface. The electron transfer resistance (R_{ct}) increase was attributed to a decrease in the charge permeability of the MAb-AFB₁-Au surface to a redox probe $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$. The surface coverage exhibited a linear relationship as function of toxin concentration and is found to be 0.75 at 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The obtained sensor is a promising candidate for detection of AFB₁ in rice with sensitivity and specificity.

Keywords: biosensor, impedance, cyclic voltammetry, aflatoxin

Introduction

Toxins are substances produced by plants, animals and microorganisms that cause adverse effects in human being. Also, toxins are a serious problem for food industry and affect the economy of many countries by interfering with production and exportation of foods.^{1,2} Mycotoxins are toxic compounds synthesized by fungi and easily found throughout the food chain and causing harm to human health.³

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a secondary metabolite produced mainly by fungus *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with capability to colonize food and feed during harvesting, storage and processing.⁴ AFB₁ is considered the most toxic of all aflatoxins due to the carcinogenic, teratogenic, mutagenic and immunosuppressive properties.⁵ European legislation establishes 2 mg kg⁻¹ as the maximum amount of AFB₁ in food, which above of this level toxic manifestations may arise, leading to liver cancer.⁶ Therefore, a previous identification of the contaminated samples is important to ensure quality and safety in the food chain.

Diverse methods, such as liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), have been used in order to identify AFB₁ in diverse samples.⁷⁻¹² In spite of these methods have high sensitivity and specificity, they are time-consuming, require experienced technicians, extensive sample pre-treatment and, in some cases, are expensive equipments.^{13,14} Thus, there is an urgent need for the development of new sensor strategies applied for AFB₁ screening in food industry and inspection agencies. Immunosensors represent an alternative as a screening tool due to the specificity, sensitivity and in-field detection of AFB₁ in foodstuffs.¹⁵

In recent years, electrochemical immunosensors have been developed for specific detection of toxic small molecules using monoclonal antibodies (MAbs).¹⁶⁻¹⁸ In addition, cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) are useful techniques for the development of immunosensors due to their high sensitivity, low cost and possibility of instrument miniaturization.¹⁹ EIS is based on the application of a small alternating current (AC) potential as a function of time to measure the current

*e-mail: m_danielly@yahoo.com.br

generated. CV technique is used to acquire qualitative information about electrochemical processes relating the magnitude of the current generated by electron transfer during the redox process with the amount of analyte present in the electrode-solution interface.^{20,21}

Self-assembled monolayers (SAM) have been used to obtain a well-ordered ultrathin layer to the development of bio-devices with high sensitivity and reproducibility.^{22,23} In this study, we modified the bare gold electrode (BGE) surface with a SAM of cysteine (Cys), an amino acid formed by three functional groups ($-\text{SH}$, $-\text{COOH}$ and $-\text{NH}_2$) in its structure.²⁴ Subsequently, SAM of Cys were chemically activated using 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) for antibody immobilization. The fabrication process of the biosensor is shown in Figure 1. Atomic force microscopy (AFM), CV and EIS techniques were used to study the process of the electrode modification and detection of AFB₁ in samples of rice contaminated with AFB₁.

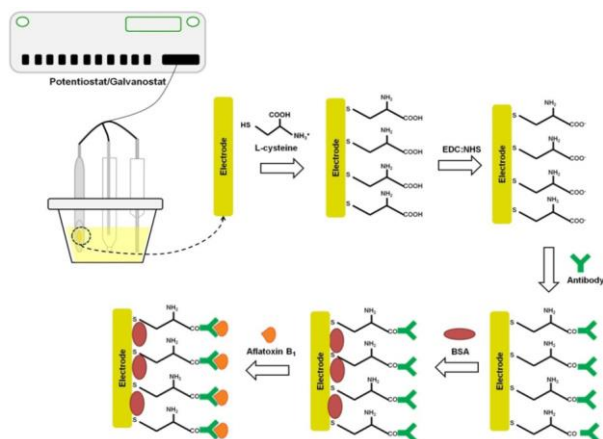


Figure 1. Schematic representation of the immunosensor fabrication. Steps of electrode modification consisting in cysteine (Cys) adsorption, COOH activation, antibody immobilization, remaining binding sites blockage by bovine serum albumin (BSA) and sample evaluation.

Experimental

Materials

Bovine serum albumin (BSA), L-cysteine, AFB₁ and anti-AFB₁ rabbit monoclonal antibody (MAb-AFB₁), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Potassium ferri- and ferrocyanide were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus treatment (Millipore, Billerica, MA, USA).

Preparation of the biosensor system

Initially, BGE was cleaned using piranha solution rinsed thoroughly with ultrapure water, and dried at room temperature (r.t.). SAM formation was preceded by adding a small volume of Cys (1 μL , 25 mM) diluted in phosphate buffer (PB) on BGE surface and allowed to dry for 10 min. Then, the electrode was washed with PB to remove any unbound Cys molecules. Subsequently, 1 μL of 0.4 mol L⁻¹ EDC and 0.1 mol L⁻¹ NHS at a ratio of 1:1 (v/v) was dropwise on the Cys-modified BGE surface and waiting for 10 min. After that, 1 μL of MAb-AFB₁ solution (25 mg mL⁻¹) was dropped on the Cys-EDC-NHS-modified BGE surface and incubated for 10 min at r.t.; in order to block the remaining active sites, it was added 1 μL BSA (10%, m/v) to the BGE surface for 10 min.

Sample preparation

Uncontaminated rice used in this study was obtained from a local market. Initially, the rice was ground in a household blender. Subsequently, 1 mg of ground rice sample was spiked with AFB₁ (150 mg mL⁻¹) and mixed in a vortex mixer. After that, 5 mL of methanol (80%, v/v) was added to the sample, followed by shaking during 45 min and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was carefully removed and diluted in PB to obtain different concentrations of AFB₁ (0.5 and 1 ng mL⁻¹; 1, 5, 10, 20 and 30 mg mL⁻¹).¹⁶

Biorecognition experiments

The experiments of biorecognition were carried out by the addition of 1 μL AFB₁ at different concentrations (0.5 and 1 ng mL⁻¹; 1, 5, 10, 20 and 30 mg mL⁻¹) on the sensor surface for 10 min. Finally, experiments using samples of rice containing different concentrations of AFB₁ were performed.

Electrochemical measurements

Electrochemical measurements were carried out on a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands). An electrochemical cell containing three electrodes, platinum wire as auxiliary electrode, Ag/AgCl (saturated with KCl) electrode as reference electrode, and gold disk electrode as working electrode was used. The analysis were performed in the presence of a 10 mmol L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) redox pair solution in 10 mmol L⁻¹ PB (pH 7.4). Nyquist plots were obtained in a frequency range varying between

100 mHz to 100 kHz with amplitude of the applied sine wave potential of 10 mV and CV plots were obtained at a potential range between -0.2 and $+0.7$ V in a scan rate of 50 mV s^{-1} .

Atomic force microscopy analysis

Atomic force microscopy measurements were performed using a PicoSPM II microscope (Molecular Imaging, Tempe, AZ, USA). Cantilevers with a silicon AFM probe (Multi 75 Al, resonant frequency = 75 KHz, force constant = 3 N m^{-1}) were used for the noncontact mode AFM in air at r.t. (ca. 25°C). Lateral resolution was set at 512×512 pixels in a scan area of $5 \times 5 \mu\text{m}$. Images were obtained from at least three macroscopically separated areas to ensure a good distribution and analyzed using AFM Gwyddion software.²⁵

Results and Discussion

Morphological characterization

The topographical and morphological analyses were performed by means of AFM. Atomic force microscopy is an excellent complementary technique to evaluate biosensors, since the electrochemical response depends

on the morphology, such as surface roughness, porosity of films and defects.²⁶ Typical topographical (2D) and 3D AFM images of the substrates surfaces containing Cys, Cys-MAb and Cys-MAb-AFB₁ obtained by contact mode are shown in Figure 2. Figure 2a shows the topography of the electrode surface after Cys modification. Our results for Cys height are in accordance with a previous work.²⁷ Of note, it can be seen a complete and homogeneous layer of the surface without the presence of aggregates or defects. After obtaining the Cys-MAb sensor system, it is visualized an increase in the surface roughness (Figure 2b). Cys-MAb sensor system shows a surface roughness of $24 \pm 2 \text{ nm}$. Immobilized MAb has a more globular looking (Figure 2c), demonstrating its protein nature.²⁸ Some authors found a typical height for antibody layer ranging from 6 to 12 nm.^{28,29} When comparing the AFM images of the sensor system before and after AFB₁ recognition, an obvious difference could be observed, indicating that the AFB₁ was successfully recognized.

Electrochemical characterization of the immunosensor

A previous study varying the concentration of Cys ($10, 15, 20, 25$ and 30 mmol L^{-1}) was performed aiming to determine its optimal concentration for electrode modification (data not shown). At a fixed adsorption time

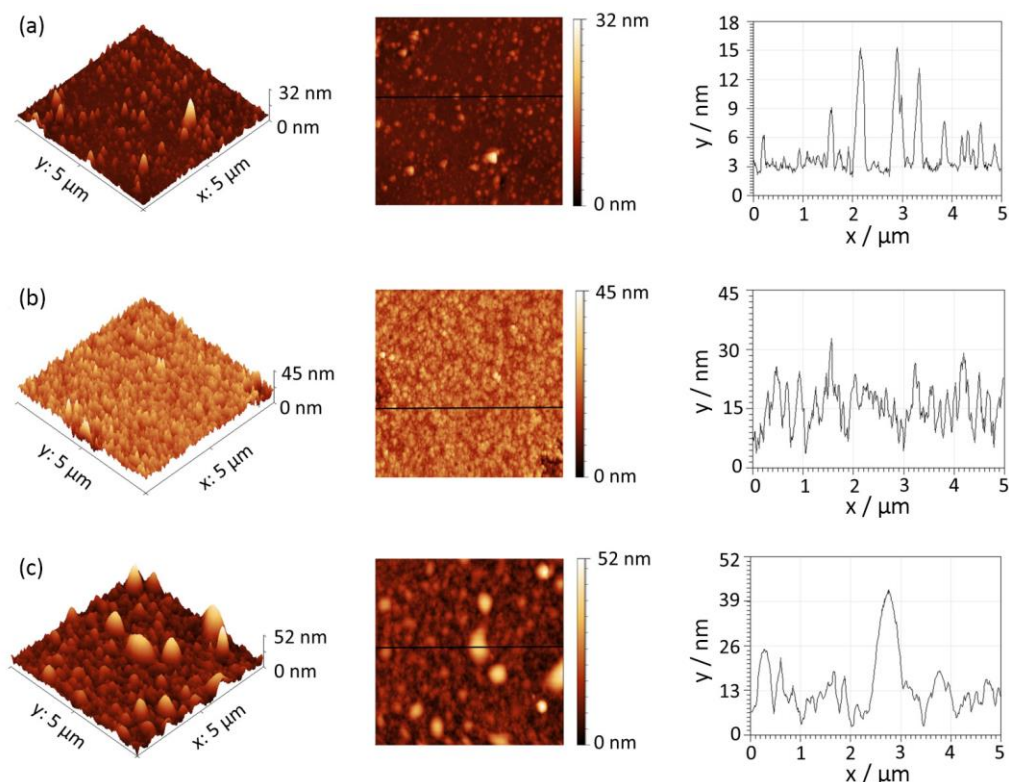


Figure 2. (a) Atomic force microscope (AFM) images of the substrate surfaces containing Cys; (b) Cys-MAb; and (c) Cys-MAb-AFB₁ using contact mode. Scan area of $5 \times 5 \mu\text{m}$.

(10 min), it was observed that after 25 mmol L⁻¹ of Cys, the electrode surface saturation occurred. In addition, we performed a study varying the MAb-AFB₁ concentration (18, 25, 50 and 75 mg mL⁻¹) adsorbed on the electrode surface using an incubation time of 10 min. We observed a saturation behavior of the electrode surface at 25 mg mL⁻¹ of MAb-AFB₁.

The coefficients of variation of the stepwise assembly immunosensor are shown in Figure 3a. The redox reaction of K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ exhibits a reversible CVs for BGE. Cys is used to modify the electrode surface through a sulfhydryl group. The adsorption of the Cys on the electrode surface promoted a reduction in peak currents. Cys molecule can increase the resistance due to electrostatic repulsion between the carboxylic group of the Cys and negative charges of the probe redox Fe(CN)₆^{3-/4-}. After the co-addition of NHS and EDC coupling agents, the activated negatively charged terminal carboxylic group of Cys was replaced by NHS ester on the electrode surface. Therefore, an increase of amperometric response was observed due to an electrostatic attraction. The neutrally/positively charged NHS ester promoted the transfer of the negative redox probe to the electrode surface.³¹ EDC-NHS coupling agents are important to facilitate binding of the antibody to the sensor system. Then, MAb-AFB₁ was added to the sensor system to form a sensing layer. The MAb-AFB₁ immobilization on the sensor system promotes a decrease in the anodic and cathodic peak current of K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻. Subsequently, 10% BSA was added to block any nonspecific response, increasing the specificity of the sensor.¹⁴

Figure 3b shows the Nyquist diagram corresponding to the modification of the BGE for obtaining the sensor electrode layer. The curve obtained for BGE reveals a small semicircle associated to a very low electron transfer resistance (R_{ct}). The assemblage of Cys on the electrode surface induced an increase in the R_{ct} as an indication of the electron transfer blockage. The modification of the Cys monolayer using EDC-NHS coupling agents resulted in a decrease of the R_{ct} . Coupling agents causes a decrease in resistance due to the attraction between the positively charged groups NHS and negative charge of the redox probe.³² After immobilization of the MAb-AFB₁ on Cys-modified electrode, it was obtained an increase in the R_{ct} . As expected, with the addition of BSA on MAb-AFB₁-Cys-modified electrode, a new R_{ct} increase was observed. The impedimetric response is increased after complete assembly of the system proportionally to the quantity of material immobilized on the electrode surface, demonstrating that the sensing layer was successfully obtained.

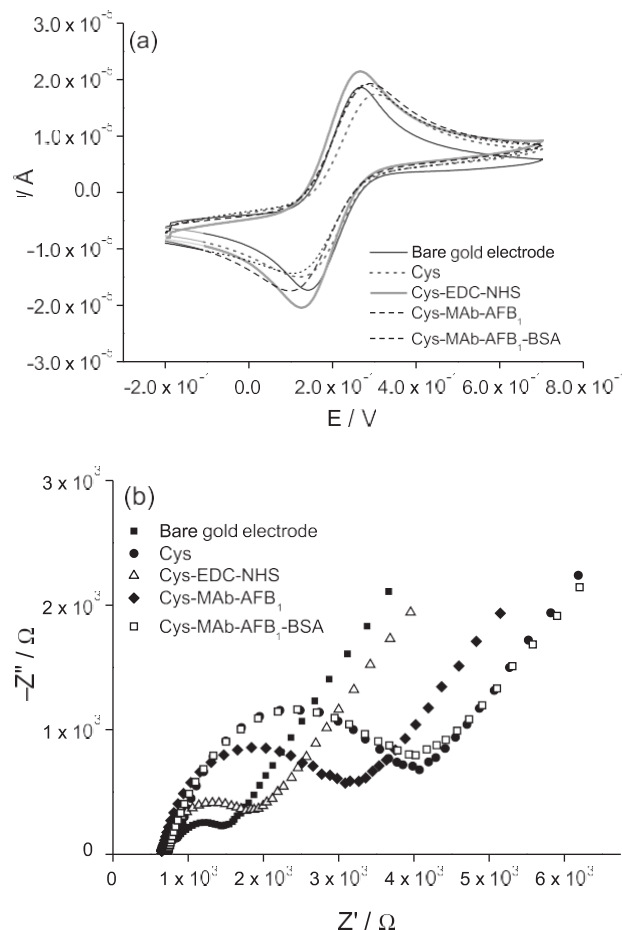


Figure 3. (a) Cyclic voltammograms and (b) Nyquist plots of the stepwise immobilization of Cys, Cys-EDC-NHS, Cys-MAb-AFB₁ and Cys-MAb-AFB₁-BSA. The impedance spectra were taken for 10 mM K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz. All electrochemical measurements were performed in triplicate using three different samples.

Aflatoxin B₁ detection

Figure 4a shows the biorecognition process of the immunosensor for five different concentrations of AFB₁ (0.5 and 1 ng mL⁻¹; 1, 5, 10, 20 and 30 mg mL⁻¹) and negative control. The CVs of different concentrations of AFB₁ reveal a gradual decrease of the peak current and an increase in the peak-to-peak separation with increasing AFB₁ concentration. The calibration curve is shown in Figure 4b. The curve exhibits a toxin detection ranging from 0.5 ng mL⁻¹ to 30 mg mL⁻¹. Based on this, we found that the calibration result is aligned with clinical reference range and can be applicable for identification of toxins in food. In addition, the coefficient of variation from this assay was found approximately within 2%, supporting the applicability of this method for real field analysis.

To evaluate the specificity of the immunosensor, it was used a mycotoxin ochratoxin A as negative control.

Viewing curve b (negative control) it is observed non-significant variations in the anodic and cathodic peaks of the voltammogram, demonstrating the specificity of the biosensor.

Figure 4c shows a successive increase in the R_{ct} values with increasing of AFB₁ concentration. EIS results are in accordance with coefficient of variation analysis. The reduction of the amperometric response and gradual increase in the R_{ct} values (Figures 4a, 4b and 4c, respectively) results from a progressive blockage of the electron passage in the electrode/solution interface. This blockage is related to the amount of the antibody-antigen complex (Mab-AFB₁) formed on the electrode surface. In Figure 4c, we observed an insignificant R_{ct} value due to the interaction of the immunosensor with negative control, demonstrating the specificity of the immunosensor.

Additionally, the Nyquist plots were submitted to analysis of data through EQUIVCRT program.³³ The experimental data were fitted using a modified Randles equivalent circuit (insert of Figure 4c), which allowed to obtain theoretical curves (Figure 4c). Warburg impedance (W) represents the impedance of semi-infinite diffusion of the redox probe to the electrode. The ohmic resistance of the solution (R_{Ω}) is associated with the bulk properties of the electrolyte solution. Constant-phase element (Q) represents the behavior of a double layer for a non-homogeneous system. The phase angle of the Q element is related to n parameter, where n is related to the dispersion of relaxation time through the surface due to a non-homogeneity in the capacitance.³⁴ Electron transfer resistance controls the electron transfer kinetics of the redox-probe at the electrode/electrolyte interface.

Table 1 shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves for the immunosensor preparation followed by antibody interaction with different concentrations of AFB₁ in samples.

The performance of the immunosensor for aflatoxin detection was evaluated through the relative variation of the R_{ct} (ΔR_{ct}), according to the equation 1:

$$\Delta R_{ct} = \left(\frac{R_{ct(\text{toxin})} - R_{ct(\text{Mab-AFB}_1)}}{R_{ct(\text{Mab-AFB}_1)}} \right) \times 100$$

where $R_{ct(\text{toxin})}$ is the value of the electron transfer resistance after recognition of the toxin and $R_{ct(\text{Mab-AFB}_1)}$ corresponds to the R_{ct} value of the sensor layer. ΔR_{ct} increases as function of toxin concentration (Figure 5a), indicating an interaction between antibody and AFB₁. Thus, our results demonstrated that the modified electrode is effective on AFB₁ detection. The filling of the recognition sites by toxin surface coverage (θ) can be calculated by (equation 2):

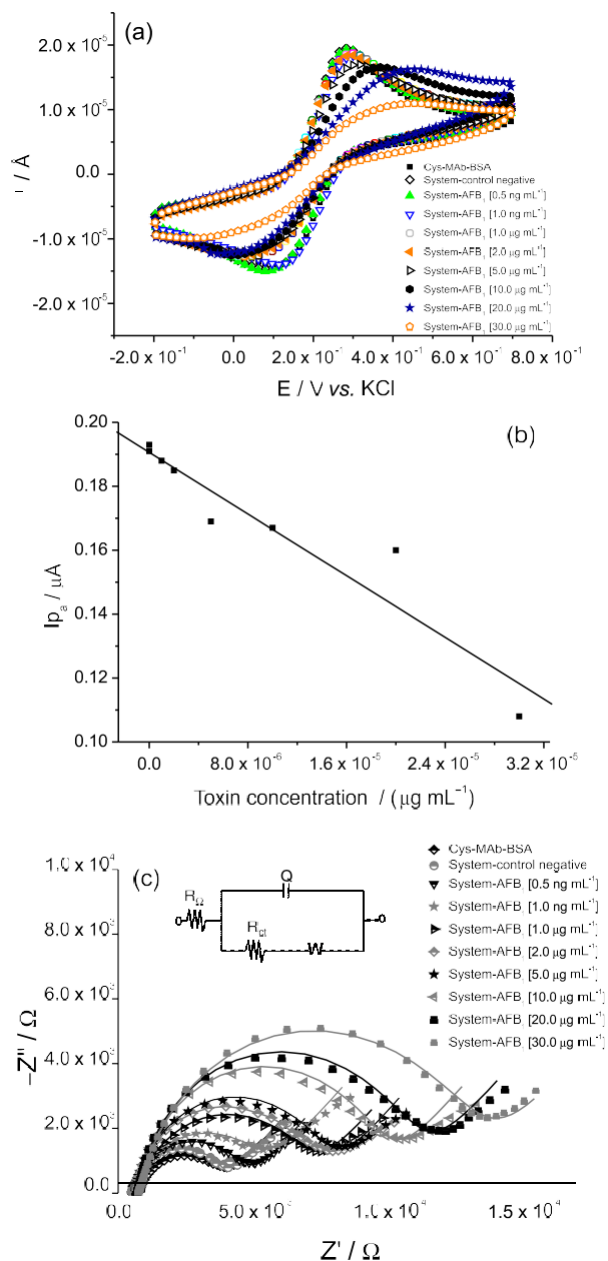


Figure 4. (a) Cyclic voltammograms; (b) calibration curve obtained from cyclic voltammetry (CV); and (c) Nyquist plots of the Cys-MAB-AFB₁-BSA, system-control negative and system-AFB₁ in the concentrations of 0.5 and 1 ng mL⁻¹, 1, 2, 5, 10, 20 and 30 mg mL⁻¹. Insert in (c) represents the equivalent circuit adopted to fit the impedance data, where R_{Ω} is the ohmic resistance of the electrolyte solution, Q the phase constant element, W the

Warburg impedance and R_{ct} the electron-transfer resistance. Supporting electrolyte: 10 mM K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) in phosphate buffer 10 mM, pH 7.4 solution; scan rate of 50 mV s⁻¹.

$$\theta = 1 - \left(\frac{R_B}{R_C} \right)$$

(1) where R_B is the charge transfer resistance for Cys-Mab-AFB₁ biosystem and R_C is the charge transfer resistance obtained for different concentrations of the AFB₁ after interaction

Table 1. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results

Modified electrode	$R_a^a / k\Omega$	$Q^b / \mu F$	n^c
Bare gold electrode	0.75	8.15	0.68
Cysteine	2.99	3.34	0.81
Cysteine-EDC-NHS	1.22	7.19	0.72
Cysteine-EDC-NHS-MAb	2.40	3.78	0.77
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA	3.20	5.27	0.76
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 0.5 ng mL ⁻¹	4.20	2.78	0.80
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 1 ng mL ⁻¹	4.74	4.30	0.80
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 1 mg mL ⁻¹	6.42	2.98	0.80
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 2 mg mL ⁻¹	6.75	1.69	0.86
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 5 mg mL ⁻¹	7.00	1.74	0.87
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 10 mg mL ⁻¹	8.99	1.41	0.89
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 20 mg mL ⁻¹	10.10	1.53	0.88
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-toxin 30 mg mL ⁻¹	12.40	3.03	0.84
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 0.5 ng mL ⁻¹	3.70	3.50	0.85
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 1 ng mL ⁻¹	4.04	3.91	0.83
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 1 mg mL ⁻¹	5.06	7.50	0.76
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 2 mg mL ⁻¹	6.21	5.12	0.80
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 5 mg mL ⁻¹	6.76	4.00	0.83
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 10 mg mL ⁻¹	9.81	4.88	0.81
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 20 mg mL ⁻¹	10.84	4.60	0.81
Cysteine-EDC-NHS-MAb-BSA-rice 30 mg mL ⁻¹	14.70	3.87	0.82

^aElectron transfer resistance; ^bconstant-phase element; ^crelated to the dispersion of relaxation time through the surface due to a non-homogeneity in the capacitance dispersion of relaxation time through the surface due to a non-homogeneity in the capacitance. EDC: 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; NHS: *N*-hydroxysuccinimide; MAb: monoclonal antibody; BSA: bovine serum albumin.

with the immunosensor. Figure 5b shows a plot of θ as a function of concentration of toxin linkage to the immunosensor. The values of θ exhibit a linear relationship with toxin concentration and is found to be 75% for 30 mg mL⁻¹ of toxin.

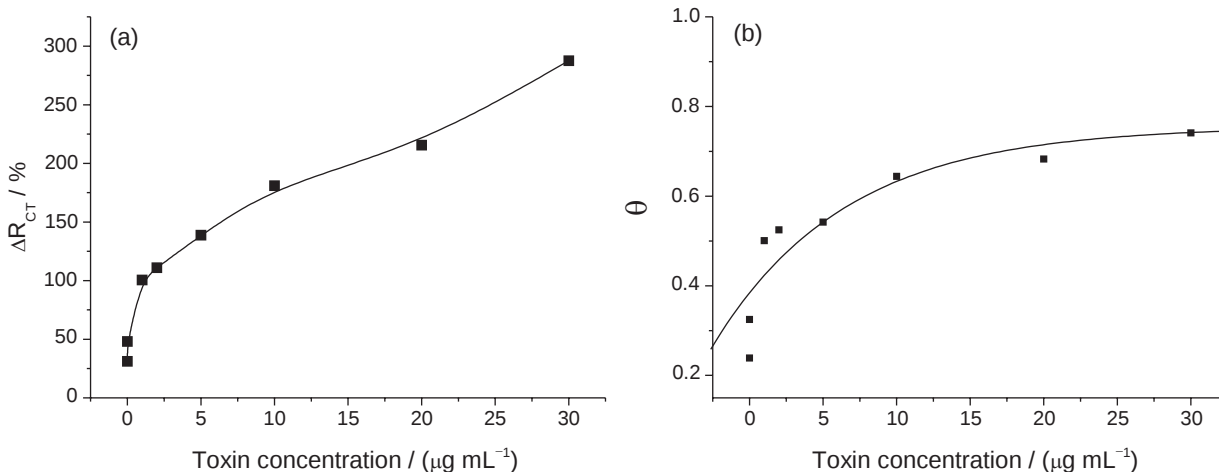


Figure 5. (a) Variation of electron transfer resistance (ΔR_{CT}); and (b) toxin surface coverage (θ) as a function of aflatoxin B₁ (AFB₁) concentration. The experimental data used to calculate θ is shown in Table 1, including the standard deviation. All experiments were performed in triplicate using three different samples.

Sample analysis

After the initial analysis, the proposed immunosensor was applied to the determination of AFB₁ in rice to test its performance in food samples. Figure 6 shows the

electrochemical behavior of the immunosensor using samples. In Figure 6a, we showed the CVs of the biosystem at different concentrations of AFB₁ in rice. After the assemblage of the system on the electrode surface and the process of linkage between the antibody and AFB₁ present in rice, it is possible to observe a decrease in the peaks current of the redox probe followed by an increase in the peak-to-peak separation. A more detailed study of the sensitivity of the immunosensor was conducted by EIS. Distinct concentrations of AFB₁ in rice were

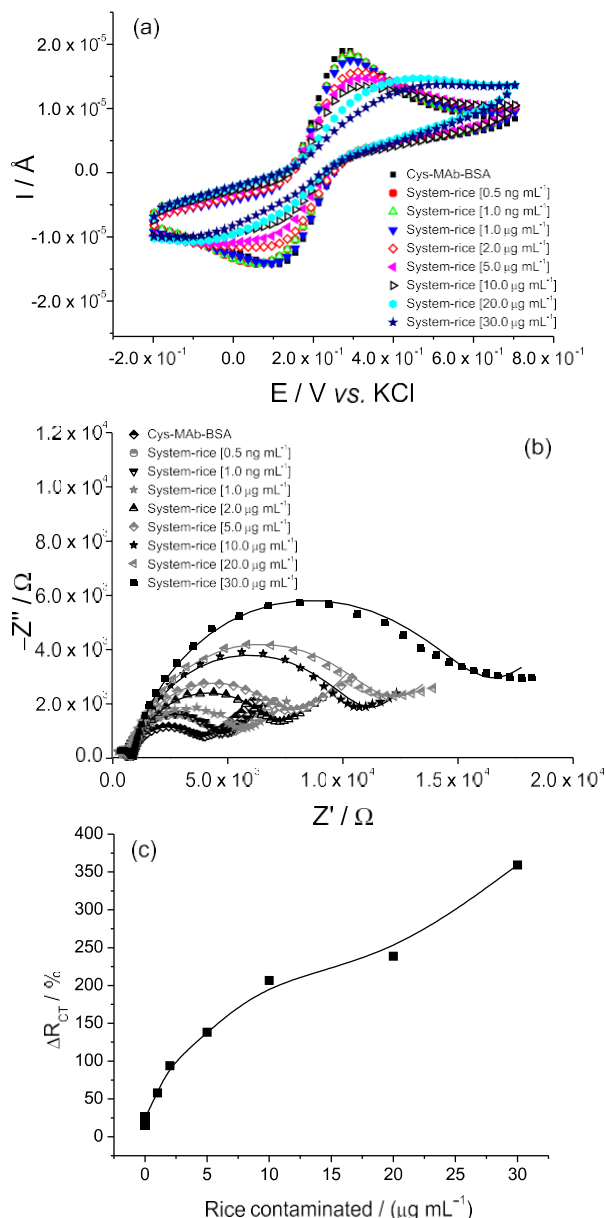


Figure 6. (a) Cyclic voltammograms; (b) Nyquist plots; and (c) variation of electron transfer resistance (ΔR_{ct}) of the immunosensor before and after interaction with aflatoxin B₁ (AFB₁) in rice at different concentrations. Cys-Mab-AFB₁-BSA; system-control negative; and system-AFB₁ at concentrations of 0.5 and 1 ng mL⁻¹; 1, 2, 5, 10, 20 and 30 mg mL⁻¹. Supporting electrolyte: 10 mM K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) solution; scan rate of 50 mV s⁻¹.

analyzed (0.5 and 1 ng mL⁻¹; 1, 5, 10, 20 and 30 mg mL⁻¹) and the impedance spectra reveals an increase in the R_{ct} proportional to AFB₁ concentration (Figure 6b). At higher concentration, it can be observed an increased R_{ct} value after recognition process of AFB₁. In Figure 6c we observed a positive linear relationship between the ΔR_{ct} and AFB₁ concentration available in contaminated rice. Therefore, our data indicates that the proposed sensor could detect AFB₁ in spiked rice samples in small concentrations (1 mg mL⁻¹), demonstrating that the established biosensing system could be applied for AFB₁ determination in real agriculture products.

Conclusions

A highly selective label-free impedimetric immunosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for AFB₁ detection in rice was obtained. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance techniques were used to investigate the immobilization of MAb on cysteine layer. EDC-NHS system was useful to immobilize MAb without lost in the protein function. The biorecognition process was revealed by the blockage of the charge transfer. Obtained results demonstrated a good filling of the recognition sites by toxin surface coverage. The resulting device exhibited good sensitivity and reproducibility and could be used to detect toxins in food.

Acknowledgments

The authors are grateful for support from the Rede de Nanobiotecnologia/CAPES, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF), CNPq (grant No. 310305/2012-8 and 310361/2012-5) and FACEPE.

References

1. Leung, M. C. K.; Diaz-Llano, G.; Smith, T. K.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9623.
2. Bhat, R.; Rai, R. V.; Karim, A. A.; *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 57.
3. Rai, M. K.; Bonde, S. R.; Ingle, A. P.; Gade, A. K.; *J. Pharm. Educ. Res.* **2012**, *3*, 22.
4. Ding, X. X.; Li, P. W.; Bai, Y. Z.; Zhou, H. Y.; *Food Control* **2012**, *23*, 143.
5. Awad, W. A.; Ghareeb, K.; Böhm, J.; *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2010**, *94*, 486.
6. Anklam, E.; Stroka, J.; Boenke, A.; *Food Control* **2002**, *13*, 173.
7. Nonaka, Y.; Saito, K.; Hanioka, N.; Narimatsu, S.; Kataoka, H.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4416.

8. Bacaloni, A.; Cavaliere, C.; Cucci, F.; Foglia, P.; Samperi, R.; Lagana, A.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1179, 182.
 9. Li, P. W.; Zhang, Q.; Zhang, W.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 1115.
 10. Otta, K. H.; Papp, E.; Bagocsi, B.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 882, 11.
 11. Fernandez, A.; Belio, R.; Ramos, J. J.; Sanz, M. C.; Saez, T.; *J. Sci. Food Agric.* **1997**, 74, 161.
 12. Jaimez, J.; Fente, C. A.; Vazquez, B. I.; Franco, C. M.; Cepeda, A.; Mahuzier, G.; Prognon, P.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 882, 1.
 13. Stroka, J.; Anklam, E.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, 21, 90.
 14. Sharma, A.; Matharu, Z.; Sumana, G.; Solanki, P. R.; Kim, C. G.; Malhotra, B. D.; *Thin Solid Films* **2010**, 519, 1213.
 15. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 605, 111.
 16. Tan, Y.; Chu, X.; Shen, G. L.; Yu, R. Q.; *Anal. Biochem.* **2009**, 387, 82.
 17. Bacher, G.; Pal, S.; Kanungo, L.; Bhand, S.; *Sens. Actuators, B* **2012**, 168, 223.
 18. Perrotta, P. R.; Arevalo, F. J.; Vettorazzi, N. R.; Non, M. A.; Fernandez, H.; *Sens. Actuators, B* **2012**, 162, 327.
 19. Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R.; *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1747.
 20. Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*; Oxford University Press: Oxford, 1993.
 21. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Oxford, 2000.
 22. Subramanian, A.; Irudayaraj, J.; Ryan, T.; *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 998.
 23. Arya, S. K.; Solanki, P. R.; Datta, M.; Malhotra, B. D.; *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2810.
 24. Jiang, D.; Ji, J.; An, L.; Sun, X. L.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Tang, L.; *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 50, 150.
 25. Nečas, D.; Klapetek, P.; *Cent. Eur. J. Phys.* **2012**, 10, 181.
 26. Galal, A.; Atta, N. F.; El-Ads, E. H.; *Talanta* **2012**, 93, 264.
 27. Huayhuas-Chipana, B. C.; Gomero, J. C. M.; Sotomayor, M. D. P. T.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, 25, 1737.
 28. Yang, L. J.; Li, Y. B.; *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 1407.
 29. Hao, C.; Yan, F.; Ding, L.; Xue, Y. D.; Ju, H. X.; *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, 1359.
 30. Luna, D. M. N.; Avelino, K. Y. P. S.; Cordeiro, M. T.; Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L.; *Sens. Actuators, B* **2015**, 220, 565.
 31. Geng, P.; Zhang, X.; Meng, W.; Wang, Q.; Zhang, W.; Jin, L.; Feng, Z.; Wu, Z.; *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 4663.
 32. Ding, L.; Bond, A. M.; Zhai, J.; Zhang, J.; *Anal. Chim. Acta* **2013**, 797, 1.
 33. Boukamp, B. A.; *Sol. St. Ionics* **1996**, 18, 136.
 34. Silva, D. J. R.; Diniz, F. B.; *Electrochim. Acta* **2014**, 119, 99.
- Submitted: September 30, 2015
Published online: December 21, 2015

IMPEDIMETRIC NANOIMUNOSENSOR FOR AFLATOXIN B1 DETECTION IN PEANUT

Gilcelia, J.L. S. Barbieri¹, Estéfani P. Simão², Cesar A.S. Andrade^{1,2}, Maria D.L.

Oliveira^{2,*}

*¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil*

*²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil*

*To whom correspondence should be addressed.

M.D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

In this paper an electrochemical immunosensor for specific detection of aflatoxin B1 was developed. Amino-functionalized iron oxide nanoparticles (NPsFe₃O₄-NH₂) were obtained. NPsFe₃O₄-NH₂ were chemically bound on self-assembly monolayers (SAM) of mercaptobenzoic acid (MBA). Finally, monoclonal antibodies were immobilized on NPsFe₃O₄-NH₂-MBA. The sensor system was evaluated through atomic force microscopy (AFM), cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Topographical analysis showed the formation of the antigen-antibody complex on the electrode surface. A reduction in the anodic and cathodic peak currents was observed after assembly of the sensor platform. The impedimetric results demonstrated a reduction in the charge transfer resistance (R_{ct}) due to electrically insulating bioconjugates. Then, the specific interaction between the sensor platform and aflatoxin B1 (AFB1) blocks the electron transfer of the [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redox pair. The proposed immunosensor represents a simple alternative applied with success to AFB1 detection in peanuts, representing a useful tool for ensuring food safety.

Keywords: Biosensor; Nanoparticles; self-assembled monolayer; aflatoxin B1; electrochemical impedance spectroscopy; cyclic voltammetry.

1. Introduction

Mycotoxins (Mtxs) represent a worldwide significant problem in health and economy, since they have been found as a contaminant in food and agricultural products (SMEEESTERS et al., 2015). Some species of fungi, such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, are known to produce a group of chemically similar toxic fungal metabolites named as aflatoxins (SHIM et al., 2014).

Aflatoxin B1 (AFB1) is the most toxic among the aflatoxins and a powerful liver carcinogen in mammals (WU et al., 2009). Fungi in the field or during the storage of foods produce AFB1. Of note, grains, peanuts and feedstuffs are the most susceptible agricultural products to AFB1 contamination. International Agency for Research on Cancer classifies AFB1 as human carcinogen. In addition, AFB1 is a molecule with teratogenic, mutagenic, immunosuppressive carcinogen properties (PIERMARINI et al., 2007).

Diverse countries have established maximum tolerable limits (e.g., European legislation establishes $2\mu\text{g.kg}^{-1}$ as the limit) for AFB1 due to its high toxicity to human health (MAVRIKOU et al., 2017). AFB1 is a very stable compound and is almost impossible to destroy it through industrial processes. Therefore, the monitoring of their concentrations is mandatory to prevent intake of food contaminated and ensure food security (HRUSKA et al., 2013).

Currently, high-performance liquid chromatography (HPLC) is the gold standard for AFB1 detection (ŞENGÜL, 2016). HPLC can be associated to other methods such as thin-layer chromatography (RAMESH; SARATHCHANDRA; SURESHKUMAR, 2013), liquid chromatography-mass spectrometry (NONAKA et al., 2009), liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry (BACALONI et al., 2008) and enzyme-linked immunosorbant assay (LI; ZHANG; ZHANG, 2009). In spite of high-

tech analytical methods be highly sensitive, some disadvantages are observed as harmful solvents, high cost equipment, trained personnel, time-consuming and others (AMMIDA et al., 2004; SHARMA et al., 2010; STROKA; ANKLAM, 2002).

New devices for specific detection of contaminants in food have been developed associated to nanotechnology. In addition, (nano)immunosensors represent an excellent alternative to detection of mycotoxins in foodstuffs (MAJER-BARANYI et al., 2016; RAI; JOGEE; INGLE, 2015). In this context, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (VC) represent powerful techniques to evaluate changes in the electrode/solution interface that result from the intermolecular toxin-antibody interaction (BACHER et al., 2012; PERROTTA et al., 2012; TAN et al., 2009).

Nanomaterials have been used to interact or modify transducers aiming to improve the response of the sensor (RONKAINEN; OKON, 2014). Magnetite nanoparticles (NPsFe_3O_4) have been extensively used in the development of biosensors since they offer advantages as biocompatibility, large surface-to-volume ratio, high magnetic susceptibility and good dispersibility (CASTREJÓN-PARGA et al., 2015; SILVA et al., 2013).

Self-assembled monolayers (SAM) enable the construction of ultra-thin oriented and organized layers for immobilization of biomolecules (SU; LI, 2004). Some attention has been paid for gold surfaces modified with thiols due to easy preparation, high stability promoted by S-Au bond and van der Waals interactions (LOVE et al., 2005; VERICAT et al., 2010). Mercaptobenzoic acid (MBA) is an aromatic derivative having two functional groups in its structure, -SH which forms a stable bond with the surface of the gold electrode and -COOH available to interact with diverse nanomaterials (WANG et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

In this paper, we describe the development of an immunosensor based on amino-functionalized NPsFe_3O_4 ($\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$) chemically bound to MBA monolayers for AFB1 detection in peanut. Initially, we modified the bare gold electrode (BGE) with MBA to obtain a SAM and subsequently a bound to $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ through a coupling reaction. Finally, the monoclonal antibody (MAb) was immobilized on the $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-MBA}$ via covalent bond. Then, the immunosensor (MAbAFB1- $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-MBA}$ -modified BGE) was used for detection of AFB1 in peanuts. The assembly process of the immunosensor is summarized in Fig. 1. CV, EIS and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the fabrication process and sensor tests.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Ferric chloride, ferrous chloride, potassium ferri- and ferrocyanide were acquired from VETEC (Brazil). 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) and 4-mercaptobenzoic acid (MBA), bovine serum albumin (BSA), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), AFB1 and anti-AFB1 rabbit MAb (MAbAFB1) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received. High-purity water (Milli-Q plus, Billerica, USA) was used in all experiments.

2.2. Synthesis of magnetic nanoparticles

The coprecipitation method was used to obtain magnetic nanoparticles (YANG et al., 2009). The synthesis was performed using a three-necked round-bottom flask

containing 200 mL of 0.1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 0.5 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solutions maintained under intense stirring in a N_2 atmosphere for 30 min. Then, 0.45 M aqueous solution of HCl was mixed to $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ solution until a pH of 1.7 was reached and, subsequently, added a 1.5 M aqueous solution of NH_4OH until the liquid turn to black (pH 8). The mixture was maintained under stirring overnight and the resulting magnetic particles were magnetically separated. After, 0.2 g of NPsFe_3O_4 were transferred into 90 mL of ethanol (50%) solution and dispersed through an ultrasonic treatment process. Finally, 300 μL of APTES and 500 μL of NH_4OH were added to the previous solution to obtain amino-functionalized NPsFe_3O_4 ($\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$) (GAN, NING; JIN, HAIJUAN; LI, TIANHUA; ZHENG, LEI, 2011). Then, the solution was maintained under vigorous agitation and heated at 60°C for 6h under N_2 atmosphere.

2.3. Fabrication of the immunosensor

The first step was to perform the proper cleaning of the gold electrode. Initially, BGE was immersed in a piranha solution, rinsed with Milli-Q water and dried at room temperature. 1 μL of MAB (5%) was dropwise on the BGE until dry to obtain a thin-film. After, MBA-modified BGE surface was activated using 1 μL of 0.4M EDC and 0.1M NHS (1:1, v/v) and waiting for 10 min. Then, 4 μL of $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ was dropped on the surface and waiting for 20 min. Subsequently, EDC:NHS coupling reaction was performed during 10 min to activate the surface of $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-MBA-BGE}$. After, 2 μL of MAbAFB1 solution ($75\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was dropped on the $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-MBA-BGE}$ and incubated for 20 min at room temperature. The remaining active sites were blocked using 1 μL BSA (10% p/v) for 5 min. The experiments of sensibility and specificity were performed using 2 μL of the contaminated peanut at different concentrations $2,5 \times 10^3$, 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 and $3 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) with an

exposition of 15 min at room temperature. Finally, additional experiments were performed with real samples at different concentrations of contaminated peanut (AFB1 ranging from $2,5 \times 10^3$, 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 and 3×10^4 ng.mL⁻¹).

2.4. Peanut contamination

Non-contaminated peanut used in this experimental was obtained from a local market. First, the peanut was triturated in a multiprocessor until obtain a fine powder. Subsequently, triturated peanut sample (1mg) was spiked with AFB1 (150µg.mL⁻¹) and homogenized in a vortex. Then, 5 mL of methanol (80%) was added and shaking for 45 min followed by centrifugation at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was carefully removed and diluted in PBS to obtain different concentrations of AFB1 (TAN et al., 2009).

2.5. Electrochemical measurements

Electrochemical measurements were performed using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, The Netherlands) with a conventional electrochemical cell in the presence of a 10mM K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) solution in PBS. The experiments were performed using a three-electrode configuration consisting of a platinum wire, Ag/AgCl (saturated KCl) and a gold bare electrode (2 mm diameter) as counter, reference and working electrodes, respectively. CV analyses were performed at potential range between -0.2V and +0.7V at a scan rate of 50mV.s⁻¹. EIS experiments were performed at a frequency range from 100 mHz to 100 kHz by applying 10 mV amplitude sine wave.

2.6. Topographical analysis

AFM measurements were performed using a commercial microscope PicoPlus (Molecular Imaging, USA). Cantilevers with a silicon probe (Multi 75 Al, resonance frequency = 75 KHz, constant force = 3 N.m^{-1}) being used in non-contact mode in air at room temperature ($T = 25^\circ \text{C}$). The lateral resolution was fixed at 512×512 pixels in a scan area of $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$. The images were obtained from the analysis of three macroscopically separated areas to ensure a good distribution. The images were analyzed using Gwyddion software.

2.7 X-ray diffraction analysis

X-ray diffraction measurements were performed on a Bruker D8 Advanced Davinci X-ray diffractometer (Bruker). The samples were analyzed using the powder method, using $\text{Cu K}\alpha$ radiation at 40 kV and 40mA. The peaks were identified according to JCPDS No. 19-0629. The crystalline sizes were calculated using Scherrer equation.

3. Results and Discussion

3.1 Topographical analysis

AFM technique is a useful tool to obtain information on the characteristics of the immunosensor topography after each stage of electrode modification (MALVANO et al., 2016). Figure 2 represents the surface architecture of MBA, $\text{MBA-Fe}_3\text{O}_4$, $\text{MBA-Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-MabAFB1}$ and $\text{MBA-Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-MabAFB1-AFB1}$. The analysis were performed by using a non-contact mode. Fig. 2a shows the topography of the electrode surface after modification with the MBA revealing small roughness. Fig. 2b shows the topographic surface after binding of the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ on the MBA surface, which is

significantly different from the previous image. MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ represents an effective platform for MAbAFB1 immobilization, since occurs an increase in the height and modification of the surface roughness (Fig. 2c) In Fig. 2d it is possible to visualize the complete coating of the surface resulting from the formation of the antigen-antibody complex. In addition, the differences in heights confirm the surface modification.

3.2 X-ray diffraction analysis

X-ray diffraction measurements of NpsFe_3O_4 and $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ were performed. In Fig. 2a, we observed a diffractogram characteristic of magnetite according to JCDPS-ICCD 19-0629. The presence of an amorphous material on the particle surface results in variation of the diffractogram with lower intensity peaks (Fig. 2b). Similar data were found in the work of Huang et al., 2010, in which the use of chitosan in the synthesis of a nanocomposite of iron oxide / chitosan nanoparticles produced a reduction of crystallinity. Scherrer equation was used to determine the crystalline size resulting in diameters of NpsFe_3O_4 and $\text{NpsFe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ about 137nm and 165nm, respectively.

3.3. Electrochemical characterization

Fig. 4a shows the behavior of the BGE in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ solution. Reversible CVs with a pair of well-defined redox peaks were observed (Fig. 4a). A decrease in the amperometric response is obtained after surface modification. In fact, this behavior occurred due to repulsion between negative charges present in the MBA monolayer and $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ solution. The chemical modification of the carboxylic group of MBA by positively/neutrally charged NHS ester contributes to the transfer of the negative redox probe (GENG et al., 2008).

NPsFe₃O₄-NH₂ were covalently linked to MBA through EDC:NHS coupling method resulting in a reduction of the peak currents due to the decreased penetration of the redox probe. Previous works showed similar results (COSTA et al., 2014; EMAMI et al., 2014; ESKANDARI et al., 2015). After that, MAbAFB1 was chemically immobilized to NPsFe₃O₄-NH₂-MBA-modified electrode using the same EDC:NHS coupling method. MAbAFB1 immobilization results in decrease of the anodic and cathodic peaks. The current decrease in the sensor response can be attributed to barrier caused by immobilization of the biomolecules, which promotes a blocking of the electron transport at the electrode/electrolyte interface. Finally, BSA was added to avoid any nonspecific response (SHARMA et al., 2010).

The BGE response is associated to a small semicircle domain corresponding to a very low electron transfer resistance ($R_{ct} = 2.79 \times 10^2 \Omega$) (Fig. 4b). MBA monolayer induced an increase in the R_{ct} ($3.77 \times 10^3 \Omega$) indicating a blockage in the electron transfer. The activation of the MBA monolayer using coupling agents resulted in a decrease of the R_{ct} value ($2.95 \times 10^3 \Omega$). The immobilization of the NPsFe₃O₄-NH₂ and MAbAFB1 leads to an increase in the R_{ct} ($4.31 \times 10^3 \Omega$ to $7.95 \times 10^3 \Omega$, respectively). The addition of BSA on modified electrode promotes a further increase in the R_{ct} value ($9.29 \times 10^3 \Omega$). As expected, the increase in the R_{ct} value is proportional to the amount of immobilized material, which retards the electron transfer kinetics between the electrode surface and redox probe.

A previous study varying the concentration of MAbAFB1 (25, 50, 75, 100 and 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was performed (Fig. 5). It is important to note an increase of the R_{ct} proportional to MAbAFB1 concentration. However, a plateau is visualized in Fig. 5 due to the saturation of the sensor surface. Therefore, 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was the antibody concentration used in our experiments.

3.4. Impedimetric detection of AFB1

In Fig. 6a we can observe the detection process of the platform sensor for six different concentrations of AFB1 ($2,5 \times 10^3$, 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 ng.mL⁻¹) and a negative control ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). An increase of the R_{ct} ($8.35 \times 10^3 - 1.69 \times 10^4 \Omega$) proportional to AFB1 concentration is observed in the Nyquist diagrams. AFB1-antibody complex introduces a barrier to electron transfer between the redox pair and the electrode (Ma et al., 2016). The impedimetric results for negative control is insignificant demonstrating the specificity of the biosensor (Fig. 6a, semicircle b).

Theoretical curves (Fig. 6a) were obtained from the impedance data using a Randles equivalent circuit (Fig. 6b). The components analyzed were electrolytic resistance (R_Ω : representing the charge properties of the electrolytic solution), electric double layer capacitance (C_{dl} : depending on the dielectric characteristics of the electrode/solution interface), charge transfer resistance (R_{ct} : controls the transfer kinetics of the redox probe at the interface), and Warburg element (W : impedance representing the diffusion of the redox probe into the electrode). The parameters of the theoretical curves are listed in Table 1. In addition, a detailed information on the impedance data can be obtained through relative variation of the R_{ct} (ΔR_{ct}), according to $\Delta R_{ct}(\%) = [(R_{ct}(\text{AFB1}) - R_{ct}(\text{sensor}))/R_{ct}(\text{sensor})] \times 100$.

$R_{ct}(\text{sensor})$ and $R_{ct}(\text{AFB1})$ represent charge transfer resistance values before and after formation of the antibody-antigen complex, respectively. $\Delta R_{ct}\%$ proportionally increase with toxin concentration confirming the biorecognition process (Fig. 6c). The regression equation shows exponential behavior. In addition, no significant responses were observed when the platform was used to analyze other mycotoxin (ochratoxin A). Our results revealed the effectivity of the sensor layer to the recognition of the AFB1.

3.5 Real Samples Analysis

Additional tests were performed to verify the performance of the immunosensor for AFB1 detection in peanuts. The sensitivity of the immunosensor at different concentrations of AFB1 was evaluated using EIS (Fig. 7a). The biorecognition of the AFB1 resulted in an increase of the R_{ct} proportional to AFB1 concentration. The calibration curve for AFB1 detection demonstrates a liner relationship between ΔR_{ct} and AFB1 concentration (Fig. 7b). The regression equation of the calibration curve is $y = 62.05494 + 6.61056 x$, $R^2 = 0.97039$. Therefore, our data indicated the effectivity of the proposed biodevice for AFB1 detection in peanut.

CONCLUSIONS

In this paper, a simple impedimetric nanoimmunosensor for AFB1 detection in peanut based on Self-assembled monolayers of $NPsFe_3O_4-NH_2-MBA$ was developed. NH_2 -modified $NpsFe_3O_4$ were used to obtained a better immobilization of the monoclonal antibody. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance techniques were used to investigate the modification of the electrode surface and toxin detection. The immunossensor performance was tested against extracts obtained from toxin-spiked peanut samples. The proposed immunossensor demosntrated and demonstrated sensitivity/especificity and can be used as a tool to monitor AFB1 in food and feed.

ACKNOWLEDGMENTS

Oliveira and Andrade would like to CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9) for the financial support.

REFERENCES

AMMIDA, N. H. S. et al. Analysis of erythromycin and tylosin in bovine muscle using disposable screen printed electrodes. **The Analyst**, v. 129, n. 1, p. 15–9, 2004.

BACALONI, A. et al. Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1179, n. 2, p. 182–189, 2008.

BACHER, G. et al. A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M1 in milk. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 168, p. 223–230, 2012.

CASTREJÓN-PARGA, K. Y. et al. Chitosan-starch film reinforced with magnetite-decorated carbon nanotubes. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 615, n. S1, p. S505–S510, 2015.

COSTA, M. P. et al. Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 433, p. 141–148, 2014.

EMAMI, M. et al. An electrochemical immunosensor for detection of a breast cancer biomarker based on antiHER2-iron oxide nanoparticle bioconjugates. **The Analyst**, v. 139, p. 2858–2866, 2014.

ESKANDARI, K. et al. The electrochemical study of glucose oxidase on gold-coated magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 1254–1260, 2015.

GAN, NING; JIN, HAIJUAN; LI, TIANHUA; ZHENG, L. Fe_3O_4 / Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 3259–3269, 2011.

GENG, P. et al. Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 14, p. 4663–4668, 2008.

HRUSKA, Z. et al. Fluorescence imaging spectroscopy (FIS) for comparing spectra from corn ears naturally and artificially infected with aflatoxin producing fungus. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, 2013.

JCPDS card, 19–0629.

LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115–1126, 2009.

LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n.4, p. 1103-1169, 2005.

MAJER-BARANYI, K. et al. Optical waveguide lightmode spectroscopy technique-

based immunosensor development for aflatoxin B1 determination in spice paprika samples. **Food Chemistry**, v. 211, p. 972–977, 2016.

MAVRIKOU, S. et al. Development of a cellular biosensor for the detection of aflatoxin B1, based on the interaction of membrane engineered Vero cells with anti-AFB1 antibodies on the surface of gold nanoparticle screen printed electrodes. **Food Control**, v. 73, p. 64–70, 2017.

NONAKA, Y. et al. Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 20, p. 4416–4422, 2009.

PERROTTA, P. R. et al. Development of a very sensitive electrochemical magneto immunosensor for the direct determination of ochratoxin A in red wine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 327–333, 2012.

PIERMARINI, S. et al. Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1434–1440, 2007.

RAI, M.; JOGEE, P. S.; INGLE, A. P. Emerging nanotechnology for detection of mycotoxins in food and feed. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 363–370, 2015.

RAMESH, J.; SARATHCHANDRA, G.; SURESHKUMAR, V. Analysis of feed

samples for aflatoxin B1 contamination by HPTLC: A validated method. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 5, p. 373–377, 2013.

RONKAINEN, N. J.; OKON, S. L. Nanomaterial-based electrochemical immunosensors for clinically significant biomarkers. **Materials**, v. 7, n. 6, p. 4669–4709, 2014.

ŞENGÜL, Ü. Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 1, p. 56–62, 2016.

SHARMA, A. et al. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1213–1218, 2010.

SHIM, W. B. et al. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 288–294, 2014.

SILVA, G. J. L. et al. Impedimetric sensor for toxigenic *Penicillium sclerotigenum* detection in yam based on magnetite-poly(allylamine hydrochloride) composite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 396, p. 258–263, 2013.

SMEESTERS, L. et al. Optical detection of aflatoxins in maize using one- and two-photon induced fluorescence spectroscopy. **Food Control**, v. 51, p. 408416, 2015.

STROKA, J.; ANKLAM, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 90–95, 2002.

SU, X. L.; LI, Y. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 6, p. 563–574, 2004.

TAN, Y. et al. A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. **Analytical Biochemistry**, v. 387, n. 1, p. 82–86, 2009.

VERICAT, C. et al. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1805, 2010.

WANG, H. et al. Preparation of amperometric glucose biosensor based on 4-mercaptobenzoic acid. **Physics Procedia**, v. 14, p. 2–6, 2011.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug metabolism reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2009.

YANG, L. et al. A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafion composite film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 889–895, 2009.

ZHOU, Y. et al. Colorimetric detection of Cu²⁺ using 4-mercaptobenzoic acid modified

silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 391, n. 1–3, p. 179–183, 2011.

Figure Caption

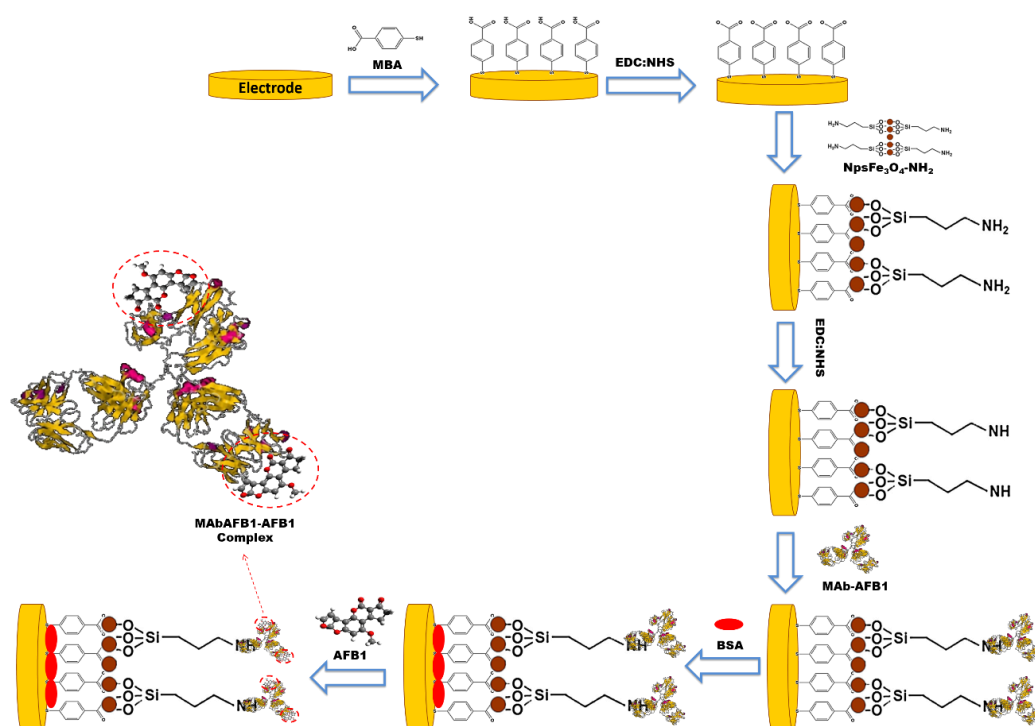


Figure 1. Schematic representation of sensor platform fabrication

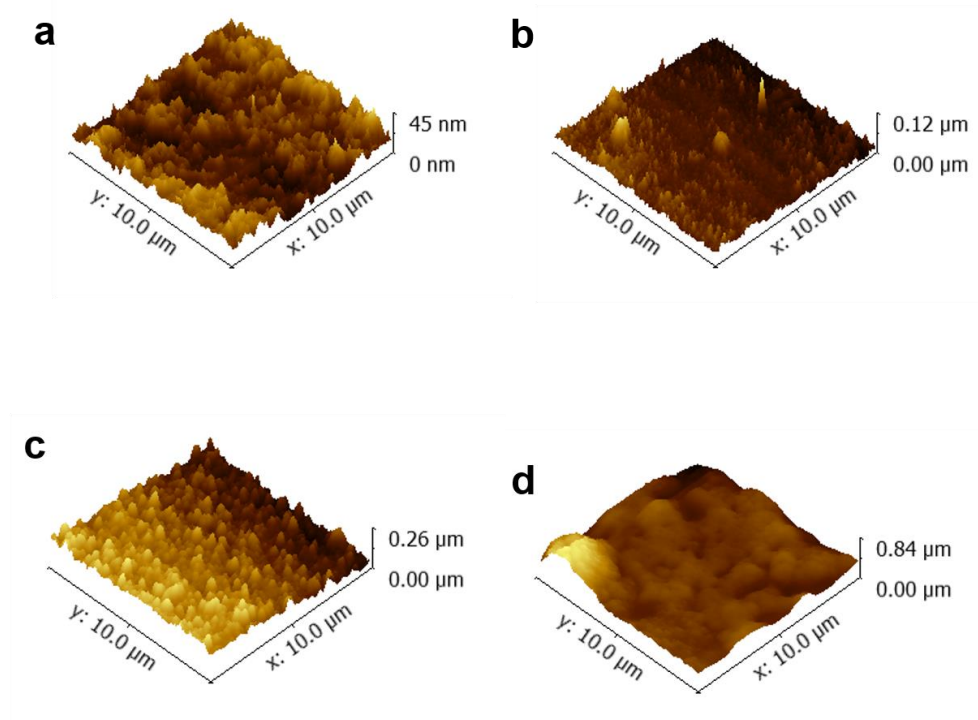


Figure 2. Atomic force microscope (AFM) images of the substrate surfaces containing MBA (a); MBA-Fe₃O₄ (b); MBA-Fe₃O₄-MabAFB1 (c); MBA-Fe₃O₄-MabAFB1-AFB1 (d) using non-contact mode. Scan area of $10 \times 10 \mu\text{m}$.

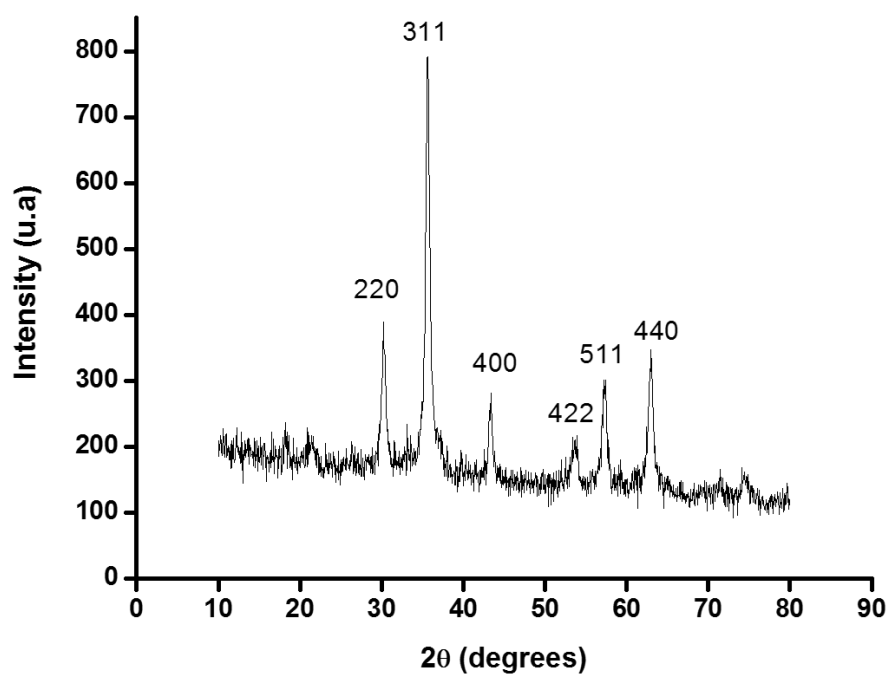
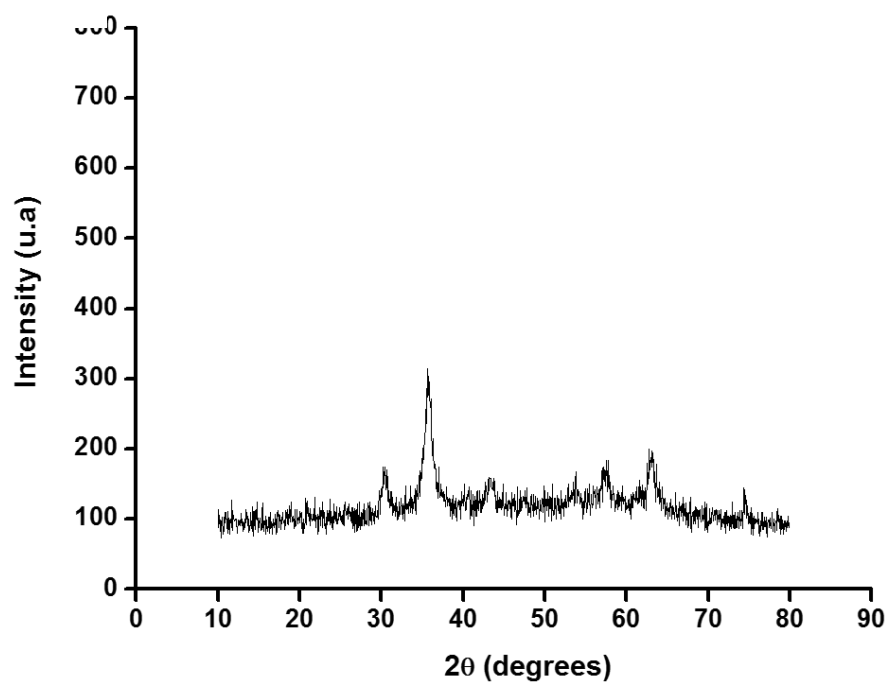
a**b**

Figure 3. Diffractogram of NpsFe₃O₄ (a) and NpsFe₃O₄-NH₂ (b)

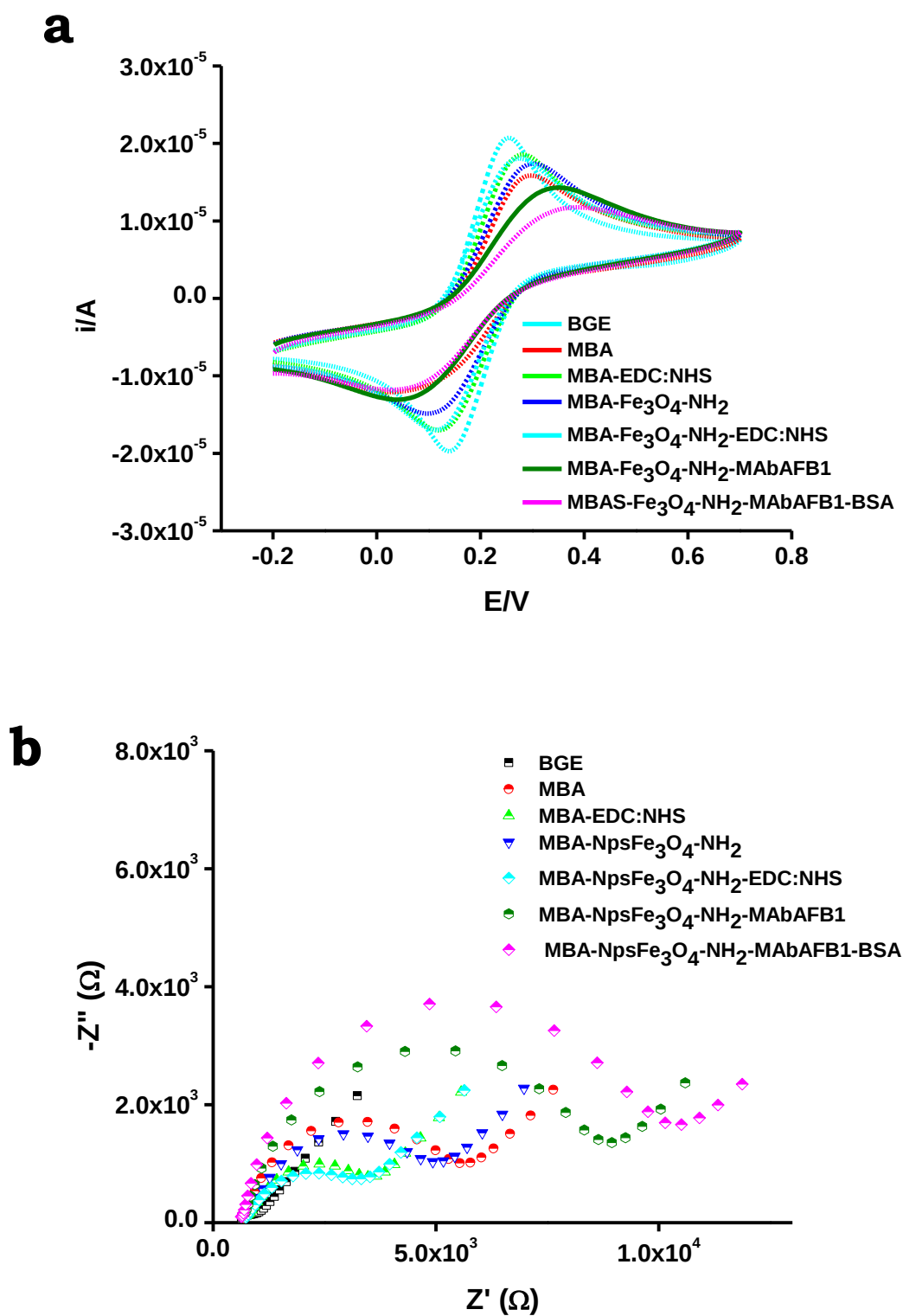


Figure 4. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) of the stepwise immobilization of MBA, MBA-EDC:NHS, MBA-NpsFe₃O₄-NH₂, MBA-NpsFe₃O₄-NH₂-EDC:NHS, MBA-NpsFe₃O₄-NH₂-MAbAFB1 and MBA-NpsFe₃O₄-NH₂-MAbAFB1-BSA.

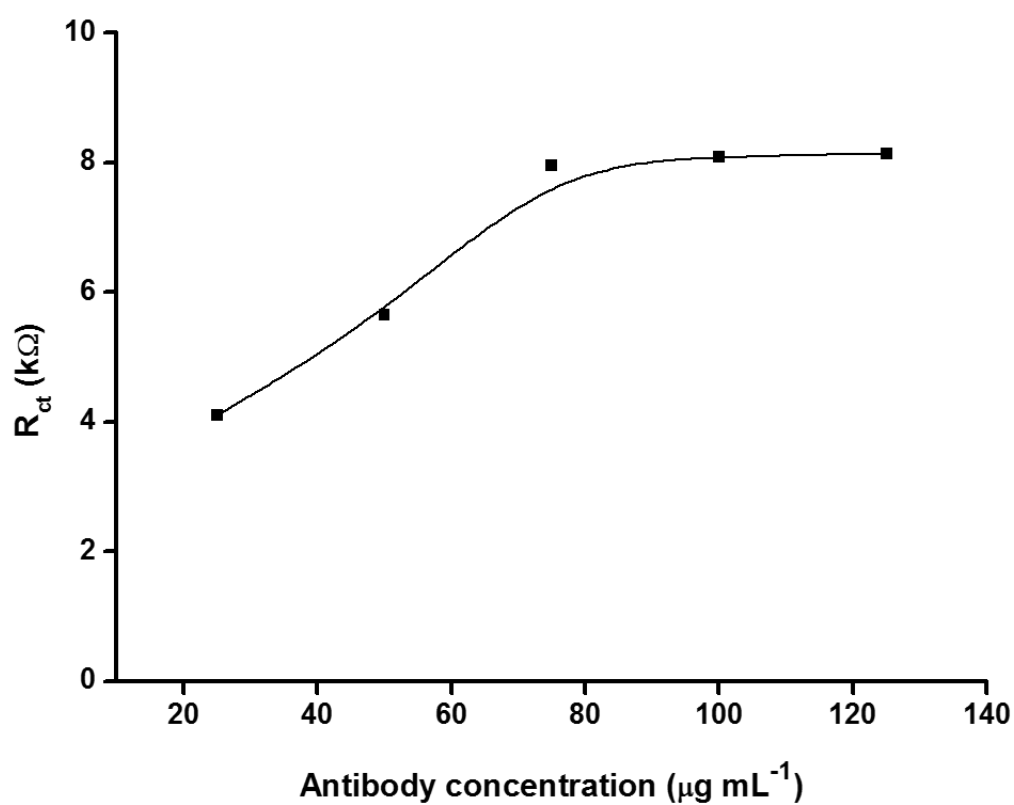
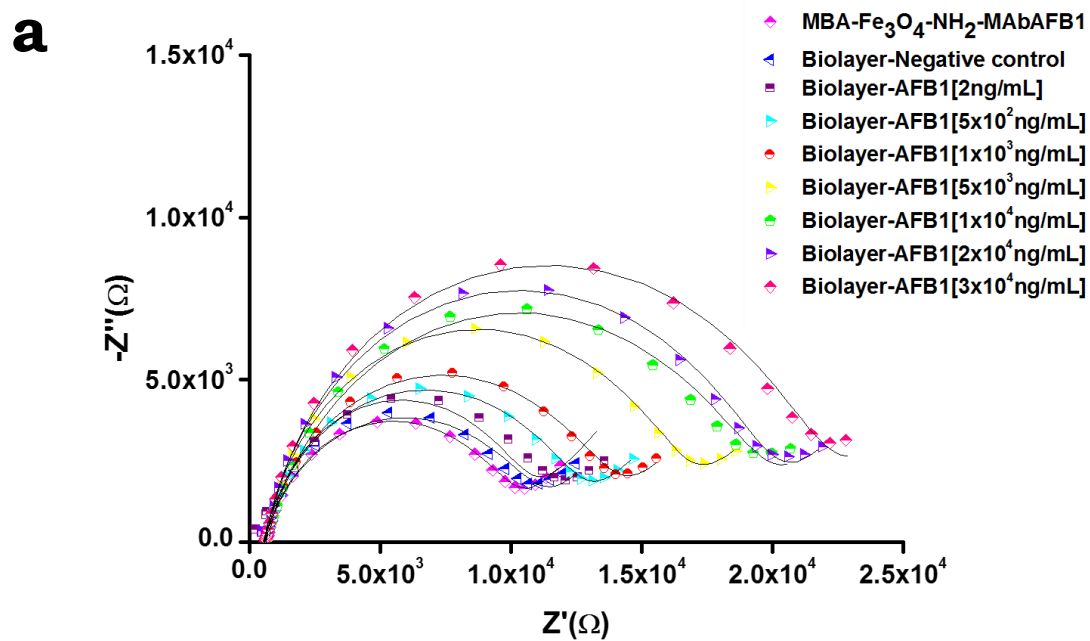


Figure 5. $\Delta R_{ct}\%$ as a function of antibody concentration



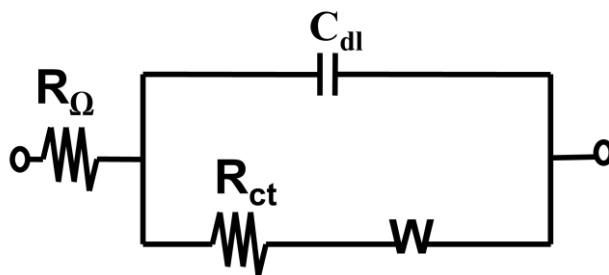
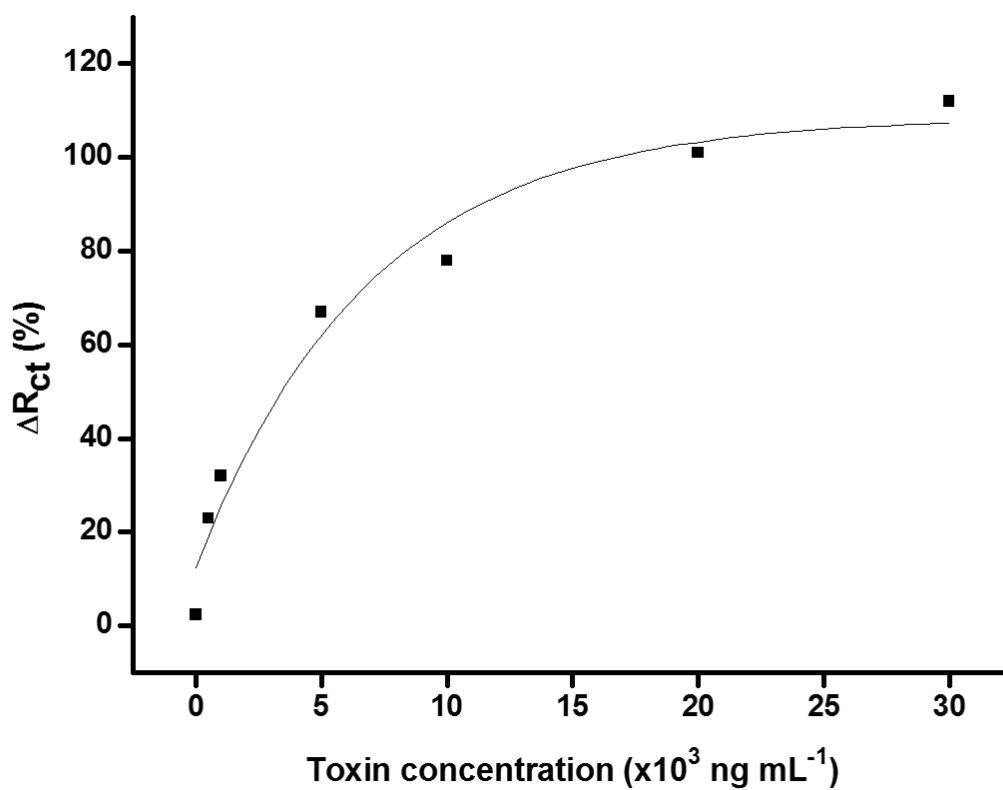
b**c**

Figure 6. Cole-Cole diagrams (a) of the immunosensor after interaction with AFB1 at six different concentrations and negative sample. Equivalent circuit adopted to fit the impedance data (b). $\Delta R_{ct}\%$ as a function of AFB1 concentration (c).

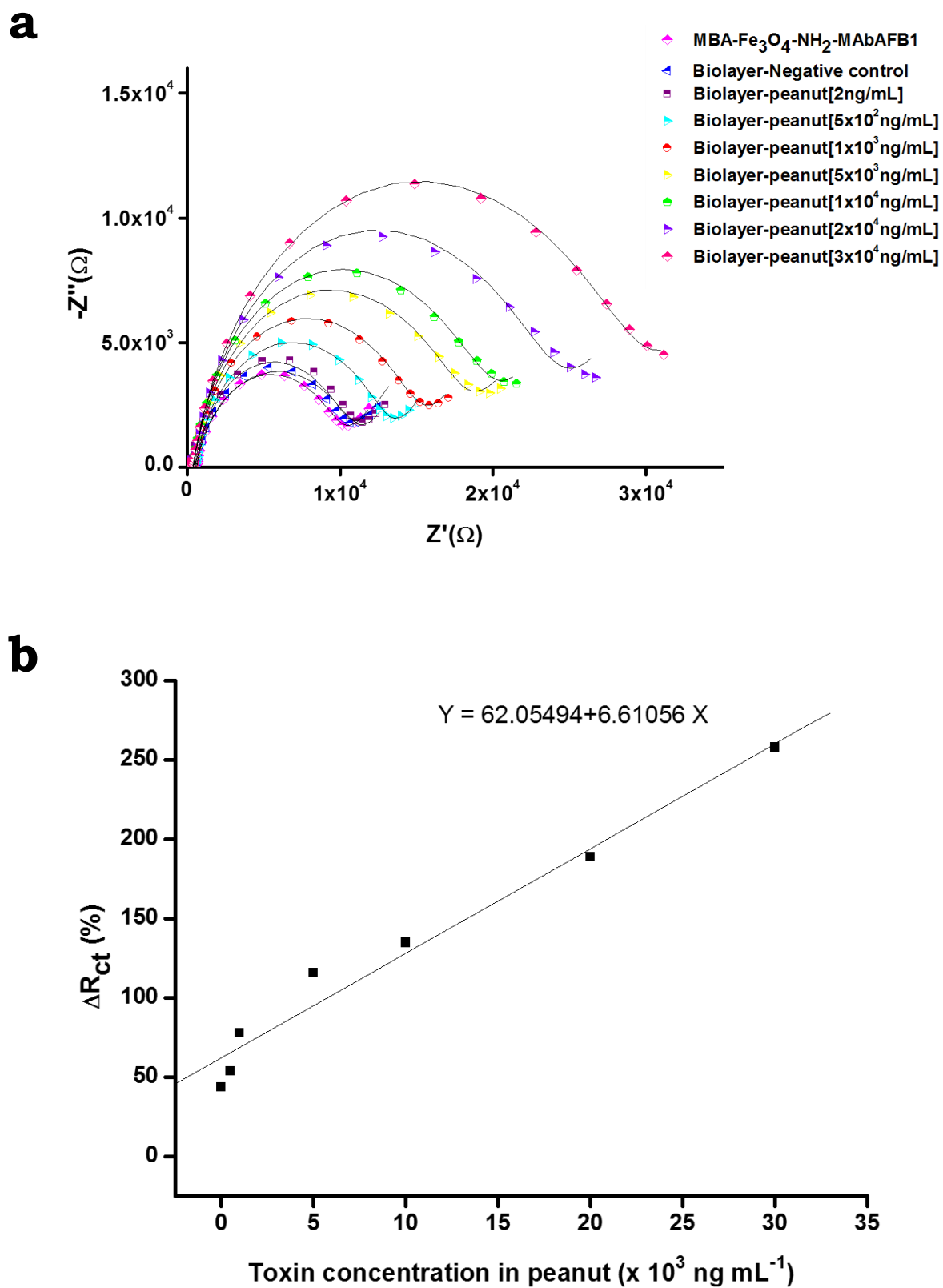


Figure 7. Cole-Cole diagrams (a) and $\Delta R_{ct}\%$ (b) of the immunosensor after interaction with AFB1 in rice at different concentrations.

Table 1

Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Modified electrode	Toxin (ng/mL)	R_{Ω} (Ω)	C_{dl} (F)	R_{ct} (Ω)	W (Ω)
EAu		6,36e+2	9,83e-7	2,79e+2	3,85e-4
MBA		7,33e+2	9,89e-7	3,77e+3	2,95e-4
MBA-EDC-NHS		7,14e+2	1,10e-5	2,95e+3	4,32e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂		7,20e+2	6,91e-6	4,31e+3	4,25e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS		6,86e+2	1,24e-5	2,81e+3	4,06e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA		6,24e+2	3,20e-6	9,29e+3	4,32e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 25µg/mL		6,88e+2	9,07e-6	4,10e+3	4,28e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 50µg/mL		6,41e+2	3,95e-6	5,65e+3	4,29e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 75µg/mL		6,59e+2	3,18e-6	7,95e+3	4,27e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 100µg/mL		6,76e+2	2,87e-6	8,09e+3	4,19e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1 125µg/mL		5,94e+2	3,45e-6	8,14e+3	4,32e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	2	7,05e+2	1,06e-6	8,15e+3	2,17e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	5×10 ²	5,75e+2	8,66e-7	9,80e+3	2,16e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	1×10 ³	5,94e+2	1,08e-6	1,05e+4	2,09e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	5×10 ³	6,20e+2	1,07e-6	1,33e+4	1,99e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	1×10 ⁴	7,02e+2	1,24e-6	1,42e+4	1,67e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	2×10 ⁴	6,27e+2	7,54e-7	1,60e+4	1,79e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Toxin	3×10 ⁴	6,33e+2	1,59e-6	1,69e+4	1,74e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1-Peanut	2	6,23e+2	2,11e-6	1,15e+3	2,40e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1- Peanut	5×10 ³	5,08e+2	2,31e-6	1,23e+4	3,87e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1- Peanut	1×10 ³	4,27e+2	2,84e-6	1,42e+4	3,63e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1- Peanut	5×10 ³	3,96e+2	2,48e-6	1,72e+4	3,02e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1- Peanut	1×10 ⁴	4,04e+2	3,60e-6	1,87e+4	3,36e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1- Peanut	2×10 ⁴	3,99e+2	2,19e-6	2,30e+4	2,57e-4
MBA-EDC-NHS-F ₃ O ₄ -NH ₂ -EDC-NHS-BSA-MAbAFB1- Peanut	3×10 ⁴	3,80e+2	3,03e-6	2,85e+4	3,04e-4