



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

BEATRIZ SANTIAGO GUERRA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA IMUNODETECÇÃO DE
AFLATOXINA B1 EM ALIMENTOS.**

Recife
2021

BEATRIZ SANTIAGO GUERRA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA IMUNODETECÇÃO DE
AFLATOXINA B1 EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador: Prof^o. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Prof^o. Dr^o. César Augusto Souza de Andrade

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Guerra, Beatriz Santiago

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de óxido de zinco para imunodeteção de aflatoxina B1 em alimentos / Beatriz Santiago Guerra– 2021.

84 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: César Augusto Souza de Andrade

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndice.

1. Nanotecnologia 2. Aflatoxinas 3. Micotoxinas I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orient.) II. Andrade, César Augusto Souza de (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -045

BEATRIZ SANTIAGO GUERRA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA IMUNODETECÇÃO DE
AFLATOXINA B1 EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em:30/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a Maria Danielly Lima de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, que me criou de forma bem criativa, a quem pude me segurar nesses anos, me dando coragem e fôlego, e me mostrando que posso ir além.

AGRADECIMENTOS

À Trindade Santa, por ter intercedido em tantos momentos durante a essa jornada, por me permitir a realização deste sonho, por me guardar, proteger e iluminar.

A mainha e painho pelo apoio incondicional, pelo socorro nas horas difíceis, por acreditarem em mim, por me mostrar que os estudos sempre vão valer a pena, sem vocês eu não teria chego até aqui, a gratidão e o amor que sinto por vocês é maior que tudo.

Às minhas avós Lena e Lala, que tanto sou apaixonada, que mesmo sem entender nada disso, me incentivam todos os dias a construir o meu sonho e por todos os carinhos.

Aos meus irmãos Fabinho e Ryan, pela paciência, amor e companheirismo; a Rô, Cabeça e Dudu, da infância para toda a eternidade; a nossa ligação é muito especial, vocês são os melhores que eu pude ter.

Ao meu namorado Emanuel, que acreditou e se jogou de cabeça comigo nesse sonho, pelo apoio, por me trazer tranquilidade quando eu estava um caos, obrigada por ser tão meu parceiro.

Aos meus tios e tias, Liliu, Ana, Guerra e Fábio (*in memoriam*), eu não poderia ter outros em minha vida, obrigada por cada conselho e nossa tão grande amizade.

Às minhas amigas, Mandão e Gabiu, por estarem em toda e qualquer circunstância, trazendo leveza para o caminho.

Aos meus orientadores Prof^a Maria Danielly e o Prof^o César Augusto, pela confiança, perseverança, dedicação, inteligência e paciência, e por cada ensinamento. Vocês representam a ciência e são inspiração.

À todos os meus companheiros de luta do laboratório Biodispositivos Nanoestruturados (BioNano), que estiveram comigo em todos os momentos e pelo apoio e aprendizado. Vocês são demais, e esse é o melhor grupo de cientistas que eu conheço, e em especial a Raí, Karen e Estefani, que me auxiliaram em todo o processo.

A todos os meus professores das disciplinas do mestrado, que foram fundamentais para essa formação.

A todos os meus colegas de disciplinas.

À Universidade Federal de Pernambuco e toda a sua equipe técnico-administrativa, que colaboraram para esta realização.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ora e vigia.

Mateus 26:41.

RESUMO

Aflatoxina B1 (AFB1), é uma micotoxina proveniente de metabolismo fúngico, sendo considerada potente agente carcinogênico. Os imunossensores nanoestruturados são alternativas para a detecção de toxinas alimentares baseado na formação do complexo anticorpo-antígeno. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um imunossensor para detecção de AFB1 em alimentos, processo este caracterizado por meio das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Para o desenvolvimento deste sensor foi utilizado o aminoácido cisteína (Cys), 1-[3-(dimetilamino) propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), anticorpo anti-AFB1 e o soro de albumina bovina (BSA). A plataforma imunossensora foi construída sobre a superfície de um eletrodo de ouro. Nas primeiras etapas da montagem, foram realizadas a adsorção do aminoácido cisteína e imobilização das nanopartículas de óxido de zinco (NPsZnO), que se destacam pelas suas propriedades físico-químicas. Posteriormente, o anticorpo monoclonal anti-aflatoxina B1 (anti-AFLA B1) foi imobilizado quimicamente sobre o eletrodo por meio de acoplamento químico e a seguir, foram realizados ensaios de seletividade e sensibilidade com amostras de AFB1 (0,01 ng.Ml⁻¹ a 100µg/mL⁻¹). Por meio das alterações no perfil voltamétrico e impedimétrico, foi possível avaliar o comportamento eletroquímico do imunossensor. Inicialmente o eletrodo de ouro limpo demonstrou um comportamento eletroquímico limitado por difusão apresentando picos anódico (ipa) e catódico (ipc) bem definidos. Após a modificação do eletrodo com cisteína houve uma discreta diminuição das ipa e ipc. No entanto, a imobilização das NPsZnO, demonstraram um aumento na condutividade do eletrodo. A imobilização de anti-AFLAB1 e a interação do sistema sensor Cys-NPsZnO-anti-AFLAB1 com diferentes concentrações de AFB1 revelou aumento do diâmetro do semicírculo com consequente incremento na resistência à transferência de carga. Em adição, houve uma diminuição na magnitude da resposta amperométrica total do sistema, indicando, que o imunossensor foi capaz de bioreconhecer o analito alvo. O imunossensor desenvolvido demonstrou ser uma ferramenta sensível e seletiva que pode favorecer a detecção de aflatoxina B1 em alimentos contaminados.

Palavras-chave: Imunossensor; NPsZnO, eletroquímica ; aflatoxina B1.

ABSTRACT

Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin originating from fungal metabolism and is considered a potent carcinogenic agent. Nanostructured immunosensors are alternatives for detecting food toxins based on complex-antigen formation. The aim of the study was the development of an immunosensor for the detection of AFB1 in food, a process characterized by the electrochemical techniques of cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). For the development of this sensor, the amino acid cysteine (Cys), 1-[3-(dimethylamino) propyl] -3-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), anti-AFB1 and bovine albumin serum (BSA) were used. The immunosensor platform was formed on the surface of a gold electrode. In the first stages of assembly, the adsorption of the amino acid cysteine and immobilization of zinc oxide nanoparticles (NPsZnO), which stand out for their physical-active properties, were carried out. Subsequently, the anti-aflatoxin B1 monoclonal antibody (anti-AFLA B1) was chemically immobilized on the electrode by chemical coupling and then selectivity and sensitivity assays were performed with AFB1 (0.01 ng.mL⁻¹ to 100 µg/mL⁻¹). Through changes in the voltammetric and impedimetric profile, it was possible to assess the electrochemical behavior of the immunosensor. Initially, the clean gold electrode has a diffusion limited electrochemical behavior demonstrated by well-defined anode (ipa) and cathodic (ipc) peaks. After modification of the electrode with cysteine, there was a slight decrease in ipa and ipc. However, an immobilization of NPsZnO, demonstrated an increase in electrode conductivity. The immobilization of anti-AFLAB1 and interaction of the Cys-NPsZnO-anti-AFLAB1 sensor system with different AFB1 concentrations revealed an increase in the semicircle diameter with a consequent increase in the charge transfer resistance. In addition, there was a decrease in the magnitude of the total amperometric response of the system, indicating that the immunosensor was able to biorecognise the target analyte. The developed immunosensor is a sensitive and selective tool that can favor the detection of aflatoxin B1 in contaminated food.

Keywords: Immunosensor; NPsZnO, eletrochemistry and aflatoxin B1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química do bisfurano de cumarina.....	27
Figura 2 –	Esta toxina foi preliminarmente classificada pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer), como potente agente carcinogênico do grupo 2B, atualmente diante de seus efeitos tóxicos foi reclassificada para o grupo 1, sendo de baixo peso molecular e hidrossolubilidade.....	28
Figura 3 –	Metabolismo hepático da aflatoxina B1 e efeitos moleculares dos metabólitos.....	29
Figura 4 –	Para detecção do analito (A), vai acontecer a partir do componente biológico (B), estando associado ao transdutor (C), sendo esta responsável pela conversão bioquímica em sinal mensurável (D) ao qual será processado por um software computacional, (E) por fim, os dados serão apresentados em formato de gráficos.....	33
Figura 5 –	Esquema representativo dos diferentes tipos de biossensores.....	34
Figura 6 –	Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos utilizada para avaliação de modificação de superfícies modificadas: (1) Contra- eletrodo, (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo de trabalho, submersos na sonda redox.....	35
Figura 7 –	Representação da estrutura química de anticorpo, e a formação do complexo antígeno- anticorpo na superfície do eletrodo. O antígeno liga-se ao anticorpo através de ligações não-covalente	37
Figura 8 –	Voltamograma cíclico realizado em eletrodo de ouro. Epc: potencial de pico catódico; Epa: potencial de pico anódico; Ipc: corrente de pico catódico; Ipa: corrente de pico anódico.....	43

Figura 9 –	Representação esquemática do diagrama da impedância de Nyquist, no qual é avaliado a real e imaginária, sendo dados importantes para construção do sistema sensor e a avaliação do biorreconhecimento dos componentes.....	45
Figura 10 –	Circuito equivalente de Randles, onde: Z_w : impedância de Warburg, R_{ct} : resistência da transferência de carga, R_s : resistência da solução eletrolítica e C_{dl} : Capacitância da dupla camada resultante da distribuição de cargas que acontece na superfície do eletrodo/solução.....	47
Figura 11 –	Representação esquemática do sistema de microscopia de força atômica.....	49
Figura 12 –	Representação esquemática do imunossensor.....	52
Figura 13 –	Imagens topográficas obtidas do eletrodo de ouro modificado por (a) Cys, (b) Cys- NpsZnO, (c) Cys-NpsZnO-Ac-BSA, (d) Cys-NpsZnO-Ac-BSA-AFB1.....	55
Figura 14 -	Voltamograma cíclico (a) e espectro de impedância (b) referentes ao estudo de tempo de adsorção da Cys, na concentração fixa de 50 mM, na quantidade de 4 μ l.....	56
Tabela 1 -	Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de tempo da cisteína.....	64
Figura 15 –	Voltamograma Cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B), dos respectivos tempos de adsorção da Nanopartícula de óxido de zinco.....	58
Tabela 2 -	Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo de nanopartícula de óxido de zinco.....	66
Figura 16 -	Espectro de voltametria (A), diagrama de Nyquist (b), característicos do estudo de tempo do anti AFB1.....	60

Tabela 3 -	Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo do anticorpo anti AFB1.....	68
Figura 17 -	Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de montagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1.....	62
Figura 18 -	Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 para diferentes concentrações da aflatoxina.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do bisfurano de cumarina.....	32
Figura 2 –	Esta toxina foi preliminarmente classificada pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer), como potente agente carcinogênico do grupo 2B, atualmente diante de seus efeitos tóxicos foi reclassificada para o grupo 1, sendo de baixo peso molecular e hidrossolubilidade.....	33
Figura 3 –	Metabolismo hepático da aflatoxina B1 e efeitos moleculares dos metabólitos.....	34
Figura 4 –	Para detecção do analito (A), vai acontecer a partir do componente biológico (B), estando associado ao transdutor (C), sendo esta responsável pela conversão bioquímica em sinal mensurável (D) ao qual será processado por um software computacional, (E) por fim, os dados serão apresentados em formato de gráficos.....	37
Figura 5 –	Esquema representativo dos diferentes tipos de biossensores.....	39
Figura 6 –	Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos utilizada para avaliação de modificação de superfícies modificadas: (1) Contra- eletrodo, (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo de trabalho, submersos na sonda redox.....	40
Figura 7 –	Representação da estrutura química de anticorpo, e a formação do complexo antígeno- anticorpo na superfície do eletrodo. O antígeno liga-se ao anticorpo através de ligações não-covalente	42
Figura 8 –	Voltamograma cíclico realizado em eletrodo de ouro. Epc: potencial de pico catódico; Epa: potencial de pico anódico; Ipc: corrente de pico catódico; Ipa: corrente de pico anódico.....	48

Figura 9 –	Representação esquemática do diagrama da impedância de Nyquist, no qual é avaliado a real e imaginária, sendo dados importantes para construção do sistema sensor e a avaliação do biorreconhecimento dos componentes.....	50
Figura 10 –	Circuito equivalente de Randles, onde: Z_w : impedância de Warburg, R_{ct} : resistência da transferência de carga, R_s : resistência da solução eletrolítica e C_{dl} : Capacitância da dupla camada resultante da distribuição de cargas que acontece na superfície do eletrodo/solução.....	52
Figura 11 –	Representação esquemática do sistema de microscopia de força atômica.....	54
Figura 12 –	Representação esquemática do imunossensor.....	58
Figura 13 –	Imagens topográficas obtidas do eletrodo de ouro modificado por (a) Cys, (b) Cys- NpsZnO, (c) Cys-NpsZnO-Ac-BSA, (d) Cys-NpsZnO-Ac-BSA-AFB1.....	62
Figura 14 -	Voltamograma cíclico (a) e espectro de impedância (b) referentes ao estudo de tempo de adsorção da Cys, na concentração fixa de 50 mM, na quantidade de 4 μ l.....	63
Figura 15 –	Voltamograma Cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B), dos respectivos tempos de adsorção da Nanopartícula de óxido de zinco.....	65
Figura 16 -	Espectro de voltametria (A), diagrama de Nyquist (b), característicos do estudo de tempo do anti AFB1.....	67
Figura 17 -	Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de montagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1.....	69
Figura 18 -	Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 para diferentes concentrações da aflatoxina.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de tempo da cisteína.....	57
Tabela 2 -	Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo de nanopartícula de óxido de zinco.....	59
Tabela 3 -	Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo do anticorpo anti AFB1.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
AFB1	Aflatoxina B1
AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês Atomic Force Microscopy)
AFTs	Aflatoxinas
Ag	Antígeno
Ag	Antígeno
BSA	Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia de camada delgada
Cdl	Capacitância de dupla camada elétrica
CL- EM	Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia em massa
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	1- [3- (dimetilamino) propil] -3-etilcarbodiimida
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
Fab	Porção variável
Fc	Porção cristalizável
FIA	Imunoensaio de fluorescência
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
Ig	Imunoglobulinas
Ipa	Corrente de pico anódico
Ipa	Corrente de pico anódico
Ipc	Corrente de pico catódico
Ipc	Corrente de pico catódico
Mab	Anticorpos Monoclonais

Mtx	Micotoxinas
NHS	N-hidroxissuccinimida
Nps	Nanopartículas
NpsZno	Nanopartícula de óxido de zinco
PCR	Reação em cadeia polimerase
Rc	Resistência a transferência de carga das diferentes concentrações de AFB1 após a interação com o imunossensor
RcT	Resistência a transferência de carga
Rct	Resistência á transferência de carga
RNA	Ácido ribonucleico
R Ω	Resistência da solução
SAM	Monocamadas automontadas
SAM	Monocamadas auto-organizadas
VC	Voltametria Cíclica
M	Mol
ml	Mililitro
Mv	Milivolt
Zw	Impedância de Warburg
ΔRct	Variação Relativa do Rct
Ω	Ohm

LISTA DE SIGLAS

Cdl	Capacitância da dupla camada
I _{pa}	Corrente de pico anódica
i _{pc}	Corrente de pico catódica
O	Forma oxidada
R	Forma reduzida
R _{ct}	Resistência à transferência de carga (do inglês resistance to charge transfer)
R _s	Resistência da solução
Z _w	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Materiais	51
4.2	Isolamento e detecção de micotoxinas produzidas por cepas fúngicas em alimentos contaminados.....	51
4.3	Modificação da superfície do eletrodo	51
4.4	Caracterização eletroquímica	52
4.5	Funcionalização da Nanopartícula de óxido de zinco.....	53
4.6	Simulação da Espectroscopia de impedância eletroquímica por meio do circuito elétrico equivalente.....	53
4.7	Caraterização topográfica por meio da Microscopia de força atômica	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	ARTIGO –PLATAFORMA NANOESTRUTURADA BASEADA EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA IMUNODETECÇÃO DE AFLATOXINA B1...	54
5.2	Caracterização topográfica	55
5.1.1	Medidas eletroquímicas do imunossensor	55
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	PERSPECTIVAS.....	76
APÊNDICE A –	ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO – BRAZILIAN JOURNALS OF DEVELOPMENT	77

1 INTRODUÇÃO

As micotoxicoses são doenças causadas pelos fungos (Bennett e Klich, 2003) e acontecem pela inalação dos esporos como também pela ingestão de alimentos contaminados (Calderone e Cihlar, 2002). Uma vez presente no organismo, as micotoxinas (MTX) estimulam a inibição de síntese de algumas proteínas, lipídios, ácidos nucleicos entre outros, induzindo ao estresse oxidativo nas células como também a inibição do ciclo celular (Creppy *et. al.*, 2004). As micotoxinas desenvolvem-se em condições de transporte, campo ou até no decorrer do tempo de estocagem de alimentos (Fink-Gremmels, 2008). Os principais gêneros fúngicos que produzem as MTX são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Ashiq, 2014).

Segundo Bennett e colaboradores as micotoxinas (MTX) são compostos de baixo peso molecular, que são produzidas por fungos filamentosos. Estima-se que existe mais de 300 compostos conhecidos como MTX, porém uma pequena quantidade apresenta riscos significativos à contaminação na alimentação humana e animal (Bennett; Klich, 2003), desenvolvem-se em condições de transporte, campo ou até no decorrer do tempo de estocagem de alimentos (Fink-Gremmels, 2008).

Os métodos baseados em imunoenaios são ferramentas muito importantes para investigação das aflatoxinas (AFTs), o ensaio imunoenzimático ELISA (Turner *et.al.*, 2009), outros métodos como cromatografia líquida de espectrometria em massa (LC/MS), o LC- MS acoplado ao ELISA (Pallaroni e Von Holst, 2003), o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (González- Osnaya *et.al.*, 2008), cromatografia em camada fina (TLC), são métodos que já são utilizados para a identificação de AFB1(Pallaroni e Von Holst, 2003), ensaios de reação em cadeia polimerase em tempo real (PCR) (Morelo *et. al.*, 2007) e cromatografia em camada delgada (CCD) (Pallaroni; Von Holst, 2003); diante de todas estas técnicas a HPLC é a mais empregada e validada para a detecção das MTXs, entretanto nesta técnica há uma demanda elevada de reagentes como também, necessita de um alto grau de pureza para a análise cromatográfica, e o alto custo de instrumentação e manutenção, impossibilita uma análise rápida e concomitante ao baixo custo, estabelecendo de forma clara que há uma necessidade de desenvolver novas ferramentas para detecção e diagnóstico custo (González- Osnaya *et. al.*, 2008).

Os biossensores apresentam respostas mensuráveis para fins diagnósticos e/ ou terapêuticos fundamentado em materiais de origem biológica, quando a interação com o seu transdutor. Os crescentes estudos relacionados aos biossensores iniciaram-se com a comercialização dos monitores de glicose e outros que visavam a redução de custos para os pacientes (Shanmugam *et.al.*,2017), sua principal característica é a capacidade de associação entre o reconhecimento sensível do elemento biológico, que vai acontecer pelo o transdutor que irá converter o sinal que é biológico em um sinal elétrico mensurável, tornando possível a detecção do analito por meio das variações de massa, temperatura ou estado de oxidação, entre outros ; além do mais podem ser utilizados para detecção de qualquer tipo de elemento que tenha a capacidade de ligar-se a um substrato, apresentando uma maior estabilidade (Li *et.al.*, 2007).

O desenvolvimento de dispositivos sensores apresenta como premissa a viabilidade de amplificar as detecções de micotoxinas, representando assim uma tecnologia que pode ser empregada nos mais variados setores da indústria alimentícia configurando uma melhora relacionada aos processos de produção, armazenamento, proteção e segurança dos alimentos; sendo mecanismos sensíveis, simples, que realizam uma rápida análise reprodutiva, baixo custo, e com a possibilidade de miniaturização (Oliveira *et. al.*, 2019).

Com a utilização de técnicas eletroquímicas torna-se possível a obtenção de informações relacionadas aos parâmetros elétricos, como: potencial, condutividade e corrente elétrica, das determinadas substância, visto que a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e a voltametria cíclica (VC), são altamente sensíveis e aplicáveis para estudos de interfaces em transdutores, quando em soluções associadas em eletrodos, quaisquer alterações resultarão em deslocamentos de corrente de picos em ambas, sendo importantes para compreensão das propriedades de cada componente (Elgrishi *et.al.*, 2017; (Tanimoto e Ichimura., 2013).

As modificações vão acontecer na superfície do eletrodo de ouro, e designarão a sua capacidade de detecção específica, deste modo as monocamadas automontadas são empregadas para obtenção de uma camada ordenada que compõe o biodispositivo proporcionando a ele uma alta sensibilidade e reprodutibilidade (Mukdasai *et al.*, 2016).

Os imunossensores são biossensores que são muito utilizados para detecção de agentes microbianos, por apresentarem uma resposta precoce, com alta sensibilidade e especificidade, as interações acontecem quando o anticorpo é imobilizado na superfície do eletrodo (Skladál *et al.*, 2013). A maior parte destes imunossensores baseia-se no ensaio competitivo ou sanduíche, podem existir duas formas de abordagem para estes imunossensores: a primeira os antígenos que serão imobilizados competirão com os antígenos livres para anticorpos livres que são marcados, já a outra, os anticorpos serão primeiro imobilizados e reagirão com os antígenos livres (Ricci *et. al.*, 2007).

As aflatoxinas (AFTs) são consideradas potentes agentes cancerígenos (Fink-Gremmels, 2008), teratogênicos, mutagênicos e imunossupressor. É frequentemente encontrada em rações e alimentos e tem sido associada a algumas doenças em humanos em todo o mundo. As AFTs exibem uma grande família composta por vários gêneros incluindo B1, B2, G1 e G2, porém outros três tipos de micotoxinas pertencentes a família AFTs, foram detectados: M1, M2 e B1 (Marin *et. al.*, 2013), que contaminam principalmente milho, amendoim, cereais antes ou pós colheita, tendo como temperatura ideal para replicação e desenvolvimento 24 a 35° C (Paniel *et. al.*, 2010).

A aflatoxina B1 é que apresenta maior toxicidade quando comparada a todas as outras de sua família exibindo efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos, além disto elas são bastantes estáveis em temperaturas altas configurada a partir de sua organização química podendo, portanto, resistir a processos de cozimento (Binder *et.al.*, 2007). Para que exista um tratamento mais rápido e eficaz contra as micotoxicoses, como também identificar as fontes de contaminação deve-se utilizar de ensaios que apresentem maior seletividade e sensibilidade, e capacidade de miniaturização como no caso dos biossensores (Magliulo *et. al.*, 2005).

Segundo Perez e colaboradores a nanociência baseia-se nos fenômenos e na manipulação de materiais a nível molecular e atômico, a nanotecnologia é a sua capacidade de desenvolvimento de novos materiais, vem sendo amplamente utilizada a biossensores, principalmente pela capacidade de processamento em micro e nanoescala. Os nanomateriais são definidos por apresentarem uma ou mais dimensões (Perez *et.al.*, 2012).

Na literatura podemos encontrar inúmeras aplicações de aminoácidos para a biotecnologia, e uma das suas principais vantagens é a de manter a estabilidade das proteínas empregadas a biossensores (Arakawa *et.al.*, 2007). Desta forma, o aminoácido que foi aplicado a este sistema é a cisteína que apresenta três agrupamentos funcionais: tiol, carboxila e amino; que se ligam aos outros componentes do sistema para construção das SAMs, como por exemplo: o agrupamento tiol que se liga ao ouro da superfície do eletrodo, configurando um sistema livre de interferências, sensível e estável (Mukdasai *et al.*, 2016).

As pesquisas voltadas para síntese, desenvolvimento e utilização de nanopartículas vem crescendo devido às suas ótimas propriedades físico-químicas: escala nanométrica, condutividade elétrica elevada e biocompatibilidade. As nanopartículas de óxido de zinco são um importante nanomaterial multifuncional utilizado em vários métodos de detecção analítica como em biossensores pizeletricos, eletroquímicos e ópticos. Os biossensores eletroquímicos à base de NpsZno são efetivamente usados para detectar uma grande variedade de analitos, como glicose, ácido úrico, colesterol, DNA e dopamina. (Gagliardi *et.al.*, 2007).

Em adição, NpsZno tem sido reconhecido como um bom candidato para aplicações de biossensores devido ao seu alto ponto isoelétrico (PI), custo-benefício, não toxicidade e estabilidade química. Um alto valor de PI permite um melhor processo de absorção de enzimas, DNA e proteínas por interações eletrostáticas (Porto *et.al.*, 2018).

As micotoxinas são produzidas exclusivamente por fungos filamentosos, desencadeando efeitos nocivos em seres humanos e animais, que diante do exposto entendemos que a AFB1, apresenta-se como um grande problema de saúde, a partir de seus efeitos deletérios como também para a indústria alimentícia, o que afeta diretamente a economia de inúmeros países, de maneira que os imunossensores entram como ótima estratégia tornando possível a detecção em de AFB1 devido ao fato de que o contato com o analito vai acontecer a partir de interação eletrostática, o que caracteriza um sistema sensível e específico, facilitando a quantificação em escala de picograma nos mais variados alimentos (Binder *et.al.*, 2007). No presente trabalho foi realizado a modificação na superfície do eletrodo de ouro, com aminoácido da cisteína e anticorpo monoclonal específico para detecção de AFB1 em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada em nanopartículas de óxido de zinco para a biodetecção de micotoxinas alimentares, especificamente a Aflatoxina B1 de interesse clínico através de técnicas eletroquímicas e análise topográfica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização físico-química dos parâmetros relacionados às etapas de modificação da superfície do eletrodo metálico;
- Determinação das propriedades bioeletroquímicas da modificação covalente das NPsZnO e anti-AFB1;
- Avaliação os fenômenos interfaciais do sistema Cys-NPsZnO- anti-AFB1 e sua utilização para fabricação de biodispositivos;
- Caracterização a interação do sistema Cys-NPsZnO- anti-AFB1 com a micotoxina AFB1 através das técnicas de EIE e VC;
- Análise da técnica de EIE para caracterização impedimétrica da interação de Cys-NPsZnO- anti-AFB1 com às MTXs;
- Avaliação da resistência à transferência de carga (R_{ct}) através de circuitos equivalentes;
- Determinação as correntes de pico anódicas (i_{pa}) e catódicas (i_{pc}) dos voltamogramas cíclicos;
- Realização da análise morfológica e estrutural da superfície dos eletrodos metálicos através de microscopia de força atômica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são compostos de metabólitos secundários tóxicos originizados por fungos filamentosos de baixo peso molecular (Sakata *et.al.*, 2011) que também podem ser sintetizados em condições laboratoriais, de maneira que são biossintetizados e excretados ao longo das vias secundárias metabólicas, de modo que o termo micotoxina é descrito por Serra, 2015 como: “*metabólitos secundários produzidos por fungos que ocorrem naturalmente como contaminantes de produtos agrícolas, e que demonstram toxicidade quando administrado por uma via natural, essencialmente por via oral*” além de ser considerada um contaminante natural (Serra., 2015), possuindo assim a capacidade de se desenvolver em diversos tipos de alimentos, como por exemplo: amendoim, trigo, feijão, arroz entre outros (Sakata *et.al.*, 2011).

Alguns fatores tornam-se favoráveis para a sua produção, sendo estes: fatores extrínsecos (ambientais), a própria fisiologia e bioquímica fúngica toxigênica, e outros; alimentos que apresentam um grande teor de carboidrato, umidade relativa intermediária, o clima tropical de nosso país também torna o processo de produção de micotoxinas ainda mais facilitada; a maior parte dos alimentos contaminados por micotoxinas podem ser monitorados, porém outros como o leite e queijos pode haver uma detecção durante o processo de manufatura, mas posteriormente com seu processo de deterioração, não torna-se possível a avaliação; quando comparadas a toxinas bacterianas são um tanto quando simples, de modo que as circunstâncias que levam a sua produção podem resultar em sua prevenção (Iamanaka; Oliveira; Taniwaki., 2010).

Estas apresentam uma grande variedade de estruturas químicas que serão responsáveis por perturbar o metabolismo dos lipídios e carboidratos em humanos, podendo modificar a estrutura de DNA e RNA célula, por intermédio de ligações covalentes irreversíveis ou reversíveis, podendo causar a morte em seres humanos e animais (Sakata *et.al.*, 2011), outro ponto importante das micotoxinas é a sua temperatura ideal de crescimento e biossíntese ficando entre 20° e 35° (Bennett; Klich., 2003).

O termo surgiu em meados de 1960 no Reino Unido, com uma doença aparentemente de natureza aviária no qual houve a morte de inúmeros perus, sendo denominada primariamente de doença X, a partir deste acontecimento deu-se início a uma série de investigações onde se descobriu que a mesma estava relacionada ao alimento oferecido aos perus, especificamente a farinha de amendoim que estava contaminada com um metabólito produzido pelo *Aspergillus flavus*, partindo daí inúmeros estudos para descoberta de vários outros tipos de micotoxinas, configurando os anos de 1960 á 1975 como a “corrida das micotoxinas”, valendo salientar que nem todas as substâncias que são derivadas/produzidas por fungos são micotoxinas (Bennett; Klich; 2003).

As micotoxinas são conhecidas por apresentarem algumas características, como por exemplo: termo-estabilidade, baixo peso molecular e não-imunogenicidade, de forma que quando consumida ou inalados mesmo que em pequenas quantidades penetra órgãos, sendo capaz de desencadear processos patológicos, como: hepatocarcinoma, necrose, cirrose, entre outras (Bok, Keller; 2004), daí derivou-se toda a preocupação por também haver uma associação a intoxicações agudas e cronicidade (Serra; 2005). Estas causam alterações consideráveis no metabolismo, inibindo a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e lipídios, ativando o stress oxidativo que interrompe assim o ciclo celular (Sakata *et.al.*, 2011).

Segundo Bennett e colaborador estas também são classificadas em micotoxinas potencialmente, teratogênicas, mutagênicas, alérgenas e carcinogênicas. (Bennett; Klich., 2003)

A sua contaminação varia de acordo com as condições que os alimentos estão sendo expostos podendo desta forma serem produzidas desde o cultivo, processamento dos alimentos, produção e armazenamento dos mesmos; caracterizando-se como fatores indispensáveis para esta produção: temperatura alta, atividade de água e a umidade (Ashiq, 2014), de forma que torna-se improvável o estabelecimento de únicas condições que beneficia o crescimento e a sua produção pelos fungos em um aspecto epidemiológico estima-se que inúmeros alimentos mundiais estejam contaminados com micotoxinas (Serra; 2005), visto que a contaminação não pode ser vista a olho “nú” (Sakata *et.al.*, 2011), desta forma e sabível que uma grande quantidade da população está exposta a mesma (Bennett; Klich., 2003).

Existem atualmente algumas micotoxinas que são consideradas as mais toxigênicas: ocratoxinas, patulinas, deoxinivalenol, fumonisinas, zearalenonas (Serra., 2005) e as aflatoxinas que podem ser produzidas pelos gêneros fúngicos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (Sakata *et.al.*, 2011).

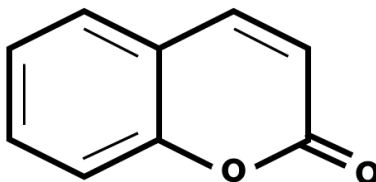
3.2 AFLATOXINAS

O termo “toxina” tem por conceito uma substância venenosa, que podem ser produzidos por diversos tipos de microrganismos, especialmente por fungos (Oliveira *et.al.*, 2019).

As aflatoxinas são metabólitos fúngicos originados durante o processo de esporulação que acontece em fungos filamentosos (Serra, 2005), podendo colonizarem vários tipos de alimentos, em especial os grãos como, amendoim, feijão, arroz, milho e amêndoa, porém há relatos também da presença de alguns dos subtipos de aflatoxinas em número reduzido de frutas, alguns produtos lácteos também atuam como contaminantes de maneira indireta, em virtude de que os animais podem realizar o consumo dos produtos contaminados (Sakata *et.al.*, 2011).

São precedentes do bisfurano cumarina que é um composto metabólico sendo obtidas assim por uma via denominada de policetídeo, como mostra a imagem abaixo, existente nos fungos dos gêneros: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A.bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* e *A. pseudotamari*. Doenças causadas por aflatoxina são chamadas de aflatoxicose, e a sua agudização pode acarretar em morte, já a sua cronicidade em supressão imunológica, câncer e outros tipos de patologias Bennett; Klich., 2003), havendo uma grande incidência em países sub- desenvolvidos, pelo fato de que nestes países não dispõem de uma regulamentação vigente, que realize monitoramento dos níveis de aflatoxina (Bok e Keller., 2004), sendo visada como um circunspecto problema a economia destes, dificultando a exportação alimentícia, além de maiores agravos a saúde pela ingesta continuada (Simão *et.al.*, 2016), podendo ser consideradas como potenciais agentes de guerra, em função de alto poder carcinogênico (Monsiello; Lamberti., 2011).

Figura 1 - Estrutura química do bisfurano de cumarina



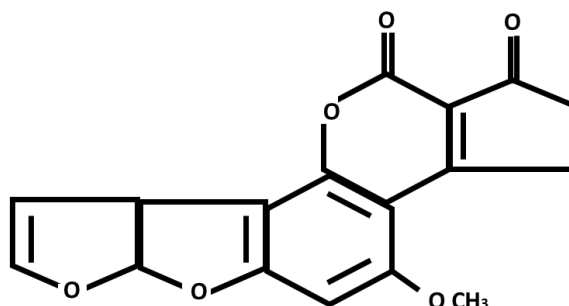
Fonte: autor próprio.

Atualmente, encontram-se isolados 9 tipos de aflatoxinas e existem vários estudos voltados para a melhor compreensão dos seus mecanismos de patogenia, toxicidade, controle, prevenção, detecção e tratamento destas, é importante salientar que entre elas existem consideráveis diferenças qualitativas e quantitativas, o que as fazem diferenciar-se umas das outras, caracterizando as suas aptidões toxigênicas (Sakata; Sabbag; Maia., 2011), equiparando-se assim como potentes carcinógenos humanos, sendo responsáveis por desencadear processos de biotransformação no organismo humano (Bennett; Klich., 2003).

Como abordado, existe um grande conjunto de aflatoxinas produzidos por diversas espécies fúngicas, entretanto as da família “B”, apresentam uma maior toxicidade quando comparadas as outras, ainda dentro desta família a aflatoxina B₁, decorrendo dos gêneros fúngicos, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (Paniel et.al.,2010), apresenta um maior destaque, em virtude que ela é a mais tóxica de todas as aflatoxinas, sendo capaz de exercer uma multiplicidade de efeitos adversos, e em casos mais graves ser letal (Iamanaka et.al, 2010).

A seguir podemos visualizar a estrutura química da aflatoxina B1:

Figura 2 - Esta toxina foi preliminarmente classificada pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer), como potente agente carcinogênico do grupo 2B, atualmente diante de seus efeitos tóxicos foi reclassificada para o grupo 1, sendo de baixo peso molecular e hidrossolubilidade.



Fonte: autor próprio.

Vista como potente agente mutagênico, teratogênico e carcinogênico, os seus efeitos estão diretamente associados a lesões hepáticas, (Iamanaka et.al., 2010), sendo considerada um pró- cancerígeno devido ao fato de que para desencadeamento de seus efeitos tóxicos é necessária que haja uma ativação metabólica, visto que a sua absorção acontece no trato gastrointestinal, transcorrendo uma biotransformação por enzimas hepáticas, desempenhando assim suas funções tóxicas quando associa-se a guaninas das molécula de DNA, inviabilizando a sua atividade biológica; tornando assim comum o câncer hepatocelular, devido a sua toxicidade (Sakata et.al., 2011).

Figura 3 - Metabolismo hepático da aflatoxina B1 e efeitos moleculares dos metabólitos.



Fonte: autor próprio.

No Brasil existe a legislação de número 7, de 18 de Novembro de 2011, que **“Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos”**, para que as empresas possam produzir, distribuir e comercializar, dentro dos padrões de segurança, aos quais podemos observar que para alimentos como: feijão e outro cereais a quantidade máxima permitida é de 5 µg/kg (Ministério da Saúde., 2011), estando dentro dos padrões de valores máximos estabelecidos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) que é de 5 µg/kg (Paniel *et.al*, 2010), já a legislação europeia estabelece que a quantidade máxima de AFTs é de 2 ug (Ashiq, 2014).

3.3 MICOTOXICOSES

O reconhecimento dos potenciais perigos desencadeados por micotoxinas em alimentos é eminente (Serra., 2005). As micotoxicoses implicam em grandes gastos a economia sanitária e comercial, no entanto o seu maior problema está associado a sua patogênese; de maneira que as manifestações agudas podem acontecer quando os indivíduos entram em contato com doses moderadas a altas destas, apresentando sinais clínicos e sintomas mais sérios, visto que o tipo de lesão vai transcorrer a partir de cada tipo de micotoxina, variando efeitos como: hepatites, nefrites, câncer, necrose de mucosa digestiva e em casos graves até a morte, logo a micotoxicose quando caracterizada crônica, ocorre quando a exposição varia de baixa a moderada (Dilkin., 2002).

As micotoxicoses são doenças causadas pelos fungos produtores de micotoxinas, seus sinais e sintomas podem variar de acordo com o sexo do indivíduo exposto, a quantidade de micotoxina, duração da exposição, idade e situação imunológica, genética, estado de dieta, entre outros; segundo Bennett e colaborador foi verificado que a micotoxicose aumenta a vulnerabilidade do indivíduo para o acometimento de outras infecções microbianas. É importante ressaltar que a doença, não acontece apenas com a ingestão das mesmas, ela pode ser desencadeada partindo do contato com a pele e a inalação, classificadas como importantes fontes de exposição (Bennett e Klich, 2003).

Para que exista um tratamento mais rápido e eficaz contra as micotoxicoses, como também identificar as fontes de contaminação deve-se utilizar de ensaios que apresentem maior seletividade e sensibilidade, e capacidade de miniaturização como no caso dos biossensores, no entanto alguns outros métodos são empregados para a identificação, sendo descritos no tópico adiante (Magliulo *et. al.*, 2005).

3.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS

É importante salientar que para a escolha do método de detecção de AFB1 deve ser levado em consideração algumas variáveis, como: o estado vegetativo fúngico e do seu estado reprodutivo, ou seja, se há ou não a formação de esporos ou outra estrutura de resistência, que podem interferir nas análises quantitativas (Serra, 2005).

Os métodos baseados em imunoenaios são ferramentas muito importantes para investigação das AFTs, o ensaio imunoenzimático ELISA, sendo mais utilizado o método sanduíche, no qual é realizado uma captura dos antígenos através de anticorpos já imobilizados na placa, com a inserção de um conjugado de anticorpo mais enzima em um substrato colorimétrico o que facilitará nas análises dos resultados, que serão lidos em espectrofotômetro (Turner *et.al.*, 2009).

Outros métodos como cromatografia líquida de espectrometria em massa (LC/MS), como também o LC- MS acoplado ao ELISA (o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), consiste na numa detecção UV ou por fluorescência, sendo o analito separado por afinidade relativa (González- Osnaya *et.al.*, 2008), cromatografia em camada fina (TLC) empregada para análise de quimitaxia, são métodos que já são utilizados para a identificação de AFB1(Simão *et.al.*, 2015), ensaios de reação em cadeia polimerase em tempo real (PCR) (Morelo *et. al.*, 2007) e cromatografia em camada delgada (CCD) (Pallaroni e Von Holst, 2003); diante de todas estas técnicas a HPLC é a mais empregada e validada para a detecção das MTXs, entretanto nesta técnica há uma demanda elevada de reagentes como também, necessita de um alto grau de pureza para a análise cromatográfica, e o alto custo de instrumentação e manutenção, impossibilita uma análise rápida e concomitante ao baixo custo, falta de precisão e quantificação limitada (González- Osnaya *et.al.*, 2008).

Os microarray também vem sendo utilizados para a detecção de AFB1 em alimentos, realizando uma análise simultânea em um experimento, e esta detecção irá acontecer por afinidade, podendo serem projetados para uma grande variedade de aplicações analíticas, porém como as outras é uma técnica custosa, é que depende de uma grande quantidade de analito para realização da detecção. O FIA (Imunoensaio de fluorescência) também consiste num método de quantificação de AFB1, mas exibe também de particularidades iguais o método de microarray (Monsiello; Laberti., 2011).

Por estas razões torna-se necessário a utilização de dispositivos analíticos, como os biossensores, pelo fato de que fornecem especificidade, otimização e rapidez nos resultados favorecendo assim a terapêutica rápida, com regressão de sequelas (Castillo *et. al.*, 2015).

3.5 BIOSSENSORES

Nos últimos anos muitos estudos viabilizaram ferramentas para a criação e desenvolvimento de biossensores, que melhoraram de forma expressiva os processos de especificidade, sensibilidade e a sua capacidade de multiplexação; segundo a IUPAC o biossensor é definido como dispositivo independente com transdutor acoplado capaz de fornecer repostas analíticas quali e quantitativas, sobre determinados elementos biológicos (Perumal e Hashim, 2014).

O desenvolvimento de dispositivos sensores apresenta como premissa a viabilidade de amplificar as detecções representando assim uma tecnologia que pode ser empregada nos mais variados setores da indústria alimentícia configurando uma melhora relacionada aos processos de produção, armazenamento, proteção e segurança dos alimentos; sendo mecanismos sensíveis, simples, que realizam uma rápida análise reprodutiva, baixo custo, e com a possibilidade de miniaturização (Oliveira *et. al.*, 2019).

Segundo Perumal e Hashim, um biossensor tem importantes funções para as áreas de agricultura, medicina, segurança a alimentar entre outros, tem por principal objetivo obter informações precisas, rápidas e em tempo real sobre o analito de interesse, com um retorno contínuo reversível e sem perturbação, é importante salientar que de uma forma geral este sistema é dividido em dois meios: o transdutor responsável pela conversão de sinal e a interação entre o analito e o bioreceptor que resulta em modificações físico-químicas, sendo este por fim enviado a um processador eletrônico de dado que será convertido em dados estatísticos interpretáveis (Perumal e Hashim., 2014).

Figura 4- Para detecção do analito (A), vai acontecer a partir do componente biológico (B), estando associado ao transdutor (C), sendo esta responsável pela conversão bioquímica em sinal mensurável (D) ao qual será processado por um software computacional, (E) por fim, os dados serão apresentados em formato de gráficos.



Fonte: autor próprio.

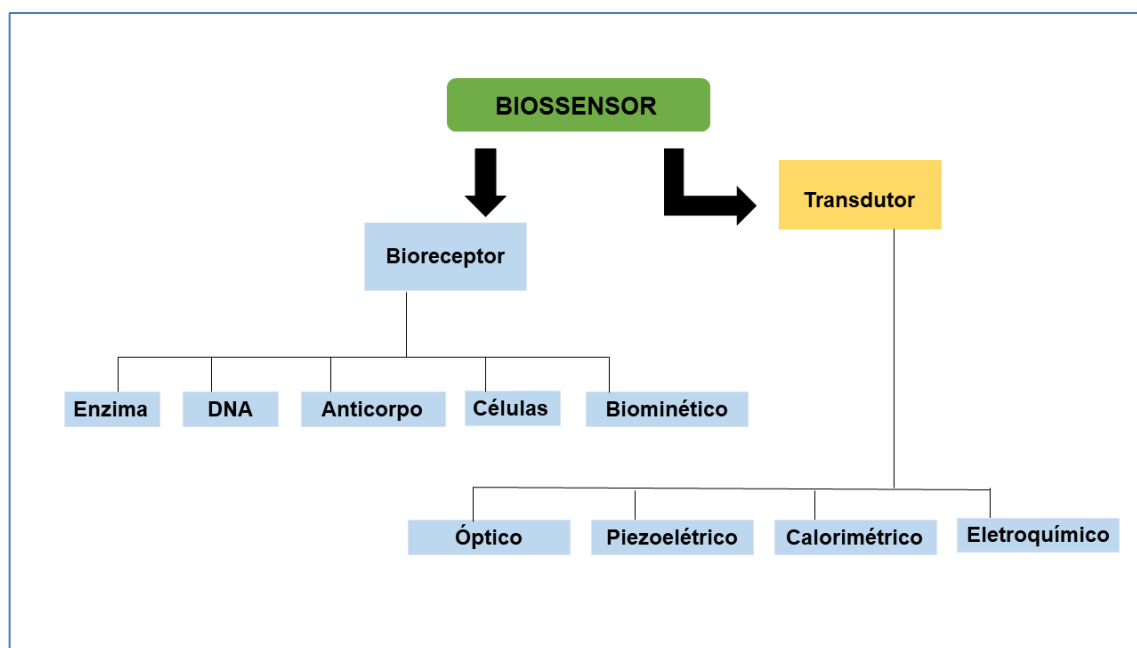
Como abordado anteriormente o desenvolvimento de elementos de reconhecimento biológico sensíveis e estáveis é uma tarefa chave para os biossensores (Wang *et.al.*, 2013). A composição do biossensor é fundamentada na comunicação de duas partes, ou seja, o componente biológico sendo o reconhecedor e o transdutor, que vão interagir de forma específica com o analito, e o transdutor converterá o evento em um sinal aceitável, gerando uma variação na concentração de prótons, de modo que aconteça a mensuração, através de uma energia potencial exercida (Oliveira *et.al.*, 2019).

O conhecimento acerca dos biossensores foram aperfeiçoando-se com o passar dos anos, de maneira que os imunossensores foram categorizando-se em dois principais grupos baseando-se em seu processo de detecção: são os que apresentam princípios de competição e não competição (Chaunan *et.al.*, 2016). Os biossensores recorrem a uma aplicação associada a nanomateriais que sirvam como sondas para a ampliação de sinal melhorando ainda mais a sensibilidade, alguns estudos já relataram ótimos resultados quando á a associação dos biossensores a nanotubos e nanofibras (Oliveira *et. al.*, 2019).

Os biossensores apresentam-se como dispositivos definidos como sensor químico, ao fato que os materiais de origem biológica ativos, como enzimas, anticorpos, ácidos nucléicos, lectinas, proteínas, dentre outros, podem ser imobilizados junto ao um transdutor adequado (Hosu *et. al.*, 2018), sendo uma das suas principais formas de classificação (Perumal e Hashim, 2014).

A partir do transdutor que está sendo utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, elipsometria, entre outros) e os piezoelétricos (relaciona-se a oscilação da frequência de cristais piezoelétricos com a variação de massa) (Hosu *et.al.*, 2018), como demonstra o esquema representado na figura 4:

Figura 5 - Esquema representativo dos diferentes tipos de biossensores.



Fonte: autor próprio.

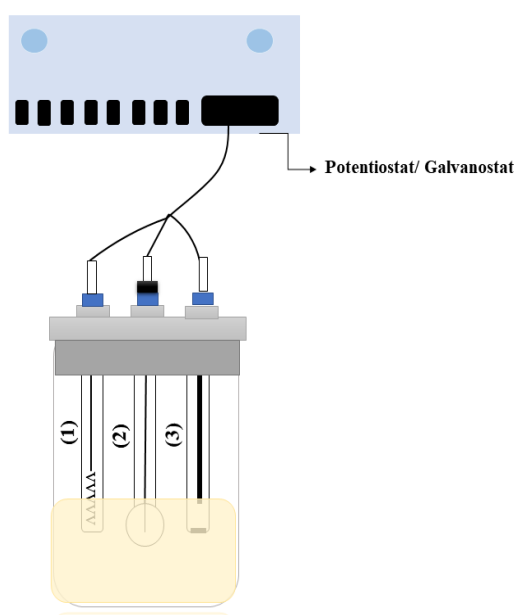
Os biossensores apresentam como vantagens quando comparados aos métodos analíticos tradicionais a: detecção e resposta rápida, alta sensibilidade e seletividade, tendo o método de preparação e operacionalização fácil, além de serem reutilizáveis dependendo do modelo construído (Gagliardi *et.al.*, 2007). Deste modo, durante a concepção de um biossensor, alguns fatores devem ser levados em consideração, por exemplo: a concepção da superfície, caracterização dos componentes biológicos e sua uniformidade, a construção da curva de calibração e a sua curva padrão (Piermarini, *et. al.*, 2007).

Nos sistemas sensores podemos encontrar “células” eletroquímicas que nos auxiliaram na obtenção de resultados, são de compostas por dois, três ou quatro eletrodos e uma única célula eletroquímica, porém os mais utilizados comumente são os sistemas de dois e três eletrodos. Os sistemas de dois eletrodos empregam o

eletrodo trabalho e o de referência; um potencial será aplicado ao eletrodo de trabalho, fazendo com que ele se polarize, porém, essa técnica exhibe alguns despropósitos, tendo como exemplo: a resistência quando aumentada, levará ao aumento também da corrente, que passará pelos eletrodos provocando distorções nos dados obtidos, o que pode tornar o método inexecutável (Pacheco *et.al.*, 2013).

Logo os sistemas compostos por três eletrodos: o eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (Damos *et.al.*, 2004), são os mais utilizados e exibem-se como mantenedores da função potenciostática, uma vez que nestes sistemas o eletrodo auxiliar ou contra eletrodo atuam para certificar essa função, como mostrado a seguir:

Figura 6 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos utilizada para avaliação de modificação de superfícies modificadas: (1) Contra- eletrodo, (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo de trabalho, submersos na sonda redox.



Fonte: autor próprio.

Os eletrodos são ligados a um amplificador operacional, que ajustará a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência, levando ao aumento da resistência do eletrodo de referência e limitando a do eletrodo auxiliar, ou seja, as correntes aplicadas transpassarão todos os eletrodos, tornando este sistema mais apropriado para soluções que disponibilizem alta resistência e que sejam mais diluídas (Pacheco *et. al.*, 2013).

A etapa essencial para realização do imunoensaio neste sistema é a funcionalização da superfície do eletrodo, nos quais os componentes serão imobilizados, a esta etapa envolve a limpeza da superfície, imobilização das nanopartículas e anticorpos (Moreira *et.al.*, 2010).

À medida que novos dispositivos semicondutores e novos recursos de imobilização são desenvolvidos, as dificuldades técnicas para desenvolvimento de biossensores são superadas, ao passo que o crescente prosseguimento tecnológico aliado a geração de novos dispositivos sensoriais pode ser explanado pelo grande interesse industrial ao qual estes dispositivos vêm ocasionando, devendo-se principalmente, ao baixo custo atrelado, facilidade de operação e rapidez nas respostas (Wang *et. al.*, 2013).

3.6 IMUNOSSENSORES

A finalidade de um biossensor é o fornecimento de informações em tempo real e rápidas, confiáveis e precisas, com uma resposta contínua e reversível (Perumal; Hashim., 2014).

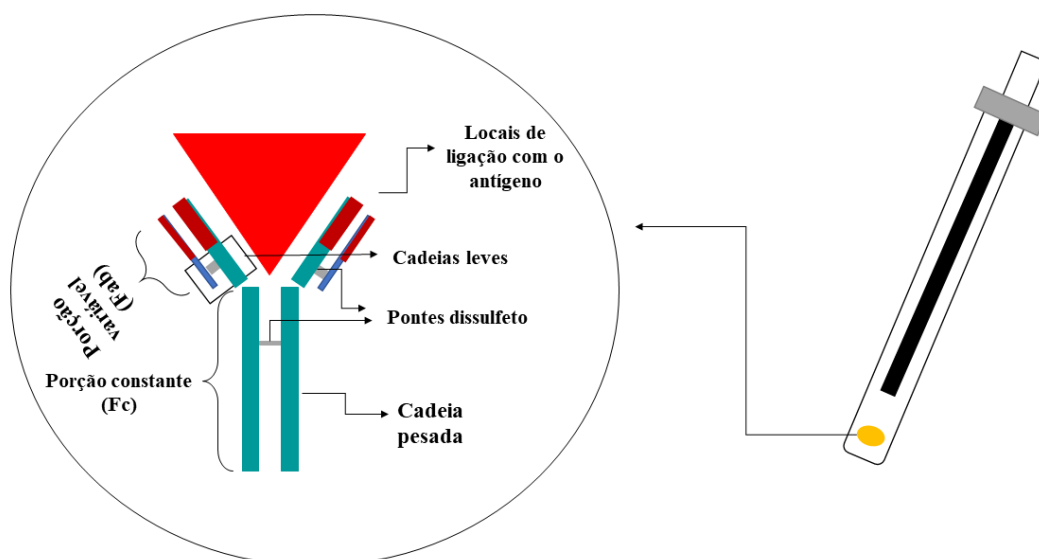
Existem vários tipos de biossensores que englobam sistemas de detecção genética, enzimática, imune, entre outros (Balkenhohl e Lisdat, 2007), e vão ser classificados de acordo com o seu tipo de mecanismo de sinalização biológica (Perumal; Hashim., 2014), de forma que os imunossensores, são biossensores muito utilizados para detecção de agentes microbianos, por apresentarem uma resposta precoce, com alta sensibilidade e especificidade, as interações acontecem quando o anticorpo é imobilizado na superfície do eletrodo (Skládal *et al.*, 2013).

O primeiro imunossensor foi aplicado em 1950, visando um melhoramento da saúde pública, sendo este fundamentado em reações que acontecem entre antígenos e anticorpos, que serão imobilizados na superfície do transdutor (Riccardi *et.al.*, 2001), a sua finalidade é para que atuem como POCT (pont-of- care), ou seja, detectando de substâncias tóxicas e realizando o diagnóstico de doenças, mediante a atualização de dispositivo portátil (Lima *et.al.*, 2016).

É importante lembrar que os anticorpos são glicoproteínas denominadas de imunoglobulinas (Ig) produzidos pelos animais e seres humanos em resposta à os imunógenos que também são chamados de antígenos, dessa maneira os

imunossensores utilizam dos anticorpos específicos para reconhecimento da analito em questão (Riccardi *et.al.*, 2001), à vista disso os anticorpos utilizados para a construção das monocamadas do biossensor são da classe IgM ou IgG, devendo ser imobilizados na superfície do eletrodo realizando uma ligação covalente através da ligação tiol do ouro com os seus do seu agrupamentos carboxílico e amino, ficando a sua fração Fc livre para interagir com o antígeno (Skládal *et al.*, 2013), seguindo a ilustração abaixo:

Figura 7 - Representação da estrutura química de anticorpo, e a formação do complexo antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo. O antígeno liga-se ao anticorpo através de ligações não-covalente.



Fonte: autor próprio.

Existem dois tipos de imunossensores que podem ser empregados para detecção de micotoxinas, sendo eles: os imunossensores marcados e não marcados; os marcados se baseiam na concentração do conjugado analito-proteína marcados, e a inserção do anticorpo; já o método não marcado de modo geral, consiste na interação de anticorpos imobilizados previamente e posteriormente a disposição ao analito (Chauhan *et.al.*, 2016).

Para os imunossensores pode-se ser utilizados diferentes tipos de transdutores, sendo estes: *eletroquímicos*, onde o sinal elétrico será mensurado a a

partir da formação do complexo antígeno anticorpo; *ópticos*, onde as medições acontecem através da emissão de um sinal óptico que utiliza de fluorescência e os *piezoelétricos*, a mensuração acontecerá através de um aumento de massa, medido pela balança de cristal de quartzo (Moina e Ybarra., 2012).

Uma etapa importante para determinação do imunossensores, além da escolha do tipo de eletrodo que será aplicado (platina, ouro, carbono, grafeno ou carbono vítreo), é o procedimento utilizado para imobilização de modo que as medições ocorrem na fase heterogênea, ou seja, interface solução/ eletrodo, sendo o ideal que a superfície do eletrodo seja recoberta pelo elemento de reconhecimento, caracterizando o emprego do eletrodo de ouro por apresentar uma maior reprodutibilidade, porém este método também apresenta limitações que são: a necessidade de uma superfície de ouro, o que afeta diretamente os custos (Lima *et.al.*, 2016).

A detecção de um analito de interesse via formação de complexo anticorpo-antígeno tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico e quantificação de patógenos em alimentos (Simão *et. al.* 2015), de modo que os imunossensores eletroquímicos, destacam-se por apresentarem boa sensibilidade, resposta rápida, e a possibilidade de realização de monitoramento contínuo, e em alguns casos não demanda de extração prévia do material que será analisado e denotam uma construção simples, em comparação aos outros métodos (Skládal; 2013), com uma ótima capacidade sensora baseada em afinidades (La Escosura Muniz; Merkoçi, 2009).

3.7 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS DE ANÁLISE

Os estudos em eletroquímica iniciaram por meados do século XVIII por Luigi Galvani, ao dessecar um sapo e acidentalmente ao encostar placas metálicas em terminações nervosas, estas contraíam, sendo este uma das principais evidências para os desenvolvimentos de inúmeros estudos que mais tarde culminaram na definição e descoberta da corrente elétrica (Pacheco *et.al.*, 2013).

A eletroquímica é uma ciência ampla incorporada a química e multidisciplinar, com um a função de desenvolver a ciência e melhorar a qualidade de vida, sendo definida como; a parte da química que lida com as reações químicas envolvendo corrente e potencial elétrico, ou seja, sendo a ciência que estuda as reações químicas que

acontecem na interface de um condutor de elétrons e um condutor iônico (Zanoni et.al., 2017), estudando os fenômenos que compreendem a produção da corrente elétrica, partindo da transferência de elétrons e na sua utilização para reações de óxido- redução que estão apresentando assim um grande interesse da comunidade científica (Freire et.al., 2003).

As medidas eletroquímicas usam das propriedades elétricas mensuráveis como: diferença de potencial e corrente elétrica, com base na espécie redox interagindo química e fisicamente, com os componentes do meio. A partir disto começou a surgir as primeiras aplicabilidades, aos quais os parâmetros elétricos, como: potencial, condutividade e corrente elétrica, de determinadas substâncias podem ser mensuradas, contudo, apresentam-se como imprescindíveis, pois favorecem a obtenção destes resultados como os métodos eletroanalítico, potenciométrico e condutimétrico (Medeiros; Rocha- Filho; Fatibellio-Filho, 2010).

Há uma diferença entre a eletroquímica e eletroanalítica, que engloba a caracterização, desenvolvimento e aplicabilidade dos métodos de análise química associados aos fenômenos eletroquímicos (Zanoni et.al., 2017), de maneira que quando sendo a eletroquímica vão acontecer reações com base numa sonda redox que interage química e fisicamente com os outros constituintes do meio e suas interfaces e utilizam de domínios relacionados a propriedades elétricas mensuráveis, possibilitando muitas vantagens, visto que: exibem grande sensibilidade de baixíssimos limites de detecção e especificidade que são produtos da oxirredução do analito com base no potencial aplicado (Pacheco et.al., 2013)

Além do mais as técnicas eletroquímicas têm se mostrado extremamente úteis quando se trata na investigação de diferentes microorganismos (Perumal e Hashim, 2014).

Neste contexto ressalta-se a utilização de outras técnicas que auxiliam na obtenção de resultados a partir das análises realizadas do analito, que são a voltametria cíclica (VC) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).

3.7.1 Voltametria Cíclica

A técnica de voltametria fundamenta-se nos fenômenos que acontecem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução

adjacente, ou seja, a interação que acontece entre eles, sendo estabelecida como uma técnica altamente dinâmica, pela atividade que acontece através da corrente elétrica, que é aplicada e controlada de acordo com um potencial, fornecendo informações sobre o analito de interesse, sendo medidos a magnitude da corrente elétrica que atravessa o eletrodo de trabalho e o auxiliar, de maneira que a diferença de potencial será medida entre o eletrodo de trabalho e o de referência (Pacheco et.al., 2013).

Deriva do termo “voltamperometria”, ou seja, baseia-se na corrente medida em função do seu potencial, sendo suas curvas “voltamograma”, originalizadas por esta determinação; a qualidade e a afinidade do analito são pontos chaves para a determinação dos voltamogramas, de maneira que a interação do analito com o eletrodo, irá direcionar a escolha da técnica voltamétrica ideal para a aplicação (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Pacheco et.al., 2013).

Os experimentos voltamétricos vão acontecer em uma célula eletroquímica composta de três eletrodos, sendo estes: o eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar (contra- eletrodo) e o eletrodo de referência, de maneira que a corrente estabelecida no sistema é mensurada entre o eletrodo de trabalho e referência (Avelino, 2017).

Existem algumas técnicas voltamétricas sendo estas: voltametria de varredura linear, onde o potencial será empregado no eletrodo de trabalho e vai variando linearmente de acordo com o tempo, porém não é muito sensível; outra técnica empregada são as de pulso que são caracterizadas com aplicação de “degraus” com potenciais fixos ou variáveis; a voltametria da redissolução, é baseada na reação eletroquímica entre o analito e o eletrodo de trabalho, processa-se através da varredura e aquisição de um sinal inicial; a voltametria adsortiva de redissolução (ADSV), fundamenta-se na habilidade dos compostos inorgânicos e orgânicos de se adsorverem facilmente na superfície do material eletródico; por fim mas não menos importante a técnica de voltametria cíclica (VC), técnica qualitativa a mais empregada para obtenção de informações sobre os processos eletroquímicos, a competência da VC transcorre de suas particularidades, como por exemplo: a obtenção de informações termodinâmicas dos processos redox de forma rápida, da sua cinética de reação e sua transferência de elétrons, como também as reações químicas que vem acontecendo proveniente dos processos de adsorção (Pacheco et al., 2013).

Como citado anteriormente a técnica de VC consiste nos fenômenos ocorridos entre as superfícies dos eletrodos, é altamente dinâmica porque trabalha a partir de

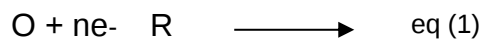
uma corrente elétrica aplicada controlada por um potencial, sendo assim, os resultados serão obtidos mediante a medição da magnitude da corrente elétrica, existente entre o eletrodo auxiliar e o de trabalho (Agostinho *et.al.*, 2004), esta técnica expõe informações sobre os processos redox, cinética das reações de transferência de elétrons e reações químicas desenvolvidas a partir do analito, sendo o potencial ajustado, obtendo-se assim a corrente resultante, de maneira que os resultados da VC serão conseguidos através da representação gráfica de voltamogramas cíclicos de corrente vs o potencial do sistema (Wang *et. al.*, 2000).

A técnica de VC, acontece diretamente nas interfaces dos eletrodos de trabalho e referência associados a uma solução eletrolítica. Os sinais obtidos pela voltametria estão intimamente ligados a eletroquímica de modo que aconteça as reações de oxirredução, bem característico desta técnica, ou seja, fornecendo os elétrons necessários para que ocorra a passagem mediada por uma corrente elétrica (Ribeiro *et.al.*, 2015).

Além do mais, a VC dispõe de uma avaliação relativamente simples da reversibilidade do processo ao qual o eletrodo é submetido, sendo assim uma comparação de uma reação anódica e catódica, facilitando também o entendimento sobre a proporção de elétrons que estão sendo transferidos, realizando uma estimativa da área de superfície, ponderando se há uma falta de eletrólitos na interface do eletrodo, determinando assim a natureza dos processos químicos realizados concomitantemente a transferência dos elétrons (Tanimoto e Ichimura., 2013).

Os eletrodos serão conectados a um potenciostato, e todos os parâmetros serão ajustados por meio de um software, onde poderão ser modificados a taxa de varredura e o quantidade das mesmas que deverão ser realizadas; sendo dois pontos analisados que relatam os dados obtidos pela voltametria cíclica; de maneira que quando o potencial for aplicado acontecerá a varredura negativa (inicial), conhecida assim como pico catódico, para a segunda varredura a direção é invertida e o potencial neste caso será positivo (volta), referindo assim ao pico anódico, estes picos são determinados pela equação de Nernst, onde obtemos o potencial eletroquímico da célula, o potencial padrão de uma espécie e as atividades particulares do analito oxidado e reduzido neste sistema, tornando-se assim uma importante ferramenta para uma predição do funcionamento do sistema, dadas as mudanças de concentrações das espécies em solução (Elgrishi *et.al.*, 2017). A maneira de perturbação que acontece na superfície do eletrodo, é comandada por diferentes potenciais, o que

define a natureza de toda a técnica, deste modo é obtido uma função do potencial, ou seja, a magnitude da corrente que devido a transferência de elétrons durante a oxirredução (Elgrishi *et.al.*, 2017).



A aplicação do potencial leva a polarização da superfície eletródica com formação da dupla camada. Os analitos de carga oposta são atraídos à interface por migração e os analitos neutros são atraídos por difusão podendo ser também por adsorção. O transporte de massa pode ser por migração que sofre influência de um campo elétrico dependente do tamanho da carga e do nível de polarização. O processo também pode ocorrer através de processos mecânicos que ocorrem espontaneamente, mas que sofre influência do gradiente de concentração e da difusão (Wang 2001; Skoog *et al.*, 2002).

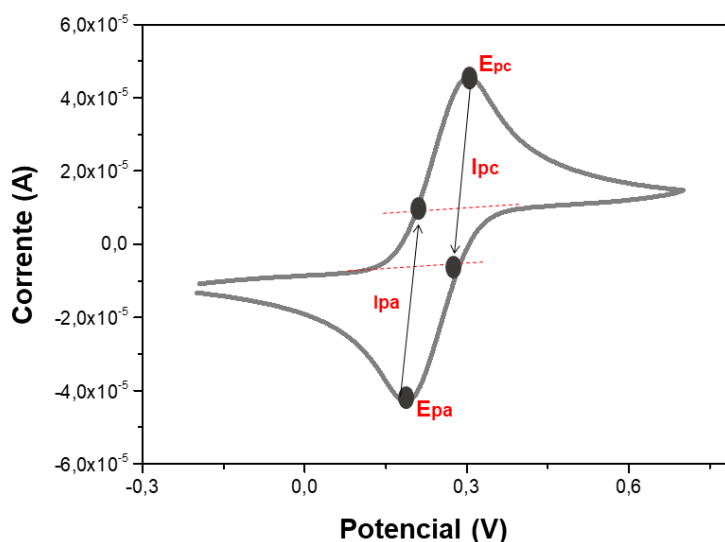
A maneira pela qual é formada o voltamograma para o tal determinado composto, depende unicamente taxa de varredura e da superfície do eletrodo, que pode variar a partir de cada etapa da adsorção e da concentração destes compostos, de maneira que o aumento da concentração resulta em um corrente alta em comparando a uma reação não catalisada, ou seja a modificação do voltamograma vai acontecer pela lenta transferência de elétrons, podendo assim fornecer informações, visto que quando estas transferências estão associadas a reações químicas a VC pode proporcionar informações mecanistas e cinéticas (Grieshaber *et.al.*, 2008; Elgrishi *et.al.*, 2017).

Está técnica apresenta um enorme destaque visto a sua reprodutibilidade, como também a oportunização de informações necessárias sobre a cinética de transferência de carga, potencial redox, utilizadas na elaboração de imunossensores, possibilitando também a caracterização dos fenômenos físicos- químicos, que vão estar atrelados a imobilização das moléculas sobre o eletrodo de trabalho e a todos os seus processos funcionais de biorreconhecimento (Skoog *et al.*, 2002).

É importante salientar que esta técnica consegue especificar rapidamente a termodinâmica dos processos redox e a cinética das reações heterogêneas que acontecem na transferência de elétrons, na figura a seguir visualizaremos todos os parâmetros determinantes da técnica, como: corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) e o potencial de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), sendo estes relevantes, ao

fato de que nos fornece informações sobre a interface modificada (Ribeiro *et.al.*, 2015):

Figura 8 - Voltamograma cíclico realizado em eletrodo de ouro. Epc: potencial de pico catódico; Epa: potencial de pico anódico; Ipc: corrente de pico catódico; Ipa: corrente de pico anódico.



Fonte: autor próprio.

A técnica tem capacidade de determinar de forma rápida a termodinâmica de processos redox e a cinética de reações heterogêneas na transferência de elétrons. Na figura 9 podemos observar os parâmetros que determina a VC são: potencial de pico anódico (Epa) e catódico (Epc), e a corrente de pico anódica (Ipa) e catódica (Ipc) (Wang,2001; Skoog *et al.*, 2002)

3.7.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Segundo Damos e colaboradores o conceito de impedância resume-se a descrição de resultados dos sistemas que são constituídos por capacitâncias, resistências e indutâncias, que quando associados a eletroquímica irão contribuir para o entendimento entre a corrente e o potencial do sistema (Damos *et.al.*, 2004).

A Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIS), viabiliza informações sobre as características elétricas da interface entre o eletrodo/solução, caracterizando-se como uma técnica que estuda o comportamento de um sistema ao todo, englobando

estudos sobre o transporte eletrônico e processos cinéticos eletroquímicos de dispositivos; em outras palavras haverá uma perturbação de potencial no sistema de investigação, realizada através a aplicação de um potencial contínuo (Carvalho e Andrade, 2006; Damos, *et.al.*, 2004).

O princípio desta técnica é o estabelecimento de mecanismos que vão envolver as reações, definir os principais parâmetros cinéticos, permitindo uma construção de resultados experimentais rapidamente, tornando possível a investigação dos fenômenos eletroquímicos, lidando com diferentes valores de frequência, de forma que as relações entre o potencial aplicado e a corrente será adquirida a impedância do sistema e o ângulo da fase (Damos *et.al.*, 2004; Ribeiro *et.al.*, 2015).

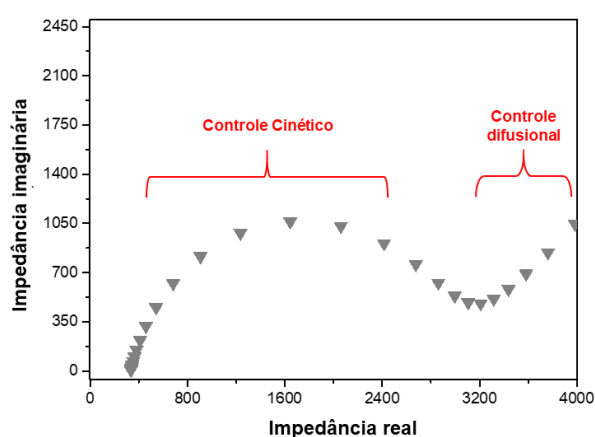
A EIE através da constância do potencial contínuo, possibilita o monitoramento do processo de construção do biossensores, contudo, pode ser utilizada para investigação do processo de reconhecimento biológico, determinando os processos de transporte de carga e a sua velocidade, condutividade de filmes, capacitância redox e da dupla camada, coeficientes de difusão dos portadores de carga, entre outros (Lisdat; Schäfer, 2008); tendo como vantagens a: assistência a evolução do estado, fornecendo informações essenciais sobre a cinética do processo, destacando-se por ser precisa e reprodutiva de alta precisão fornecendo informações sobre o controle eletroquímico do analito (Ribeiro *et.al.*, 2015).

Um experimento que utilize a técnica de EIS realiza a impedância faradaica, associada a uma célula eletroquímica contendo, um par redox, ao qual será aplicado um potencial de trabalho fixo, realizando uma medição em função da frequência, de forma que a impedância do eletrodo é plotada vs a frequência, sendo interpretado assim a resistência equivalente, valores de capacitância (Lisdat; Schäfer, 2008); vale salientar que o eletrodo de trabalho, apresenta um certo valor médio, onde o mesmo será escaneado em função do tempo, as respostas as quais serão medidas as magnitudes vão de acordo com a corrente de frequência estando relacionadas ao componente na superfície do eletrodo de trabalho (Bard *et.al.*, 2001).

Estas reações serão analisadas pelos circuitos elétricos equivalentes, que abrange a relação entre a corrente potencial associada ao processo de transferência de carga, capacitância, dupla camada elétrica e a impedância de Warburg, especificando de modo preciso os processos que ocorrem na região que houve o aumento de frequência, pressupondo assim a corrente faradaica, que é a consequência das transferências eletrônicas na interface (Carvalho e Andrade, 2006),

ou seja, todas as informações da impedância eletroquímica, serão “traduzidas” em diferentes modelos de medidas, como os circuitos equivalentes, que fundamentam-se nas particularidades da célula eletroquímica e o circuito elétrico de resistores e capacitores, isto é uma representação total da distribuição de potencial elétrico em todo o sistema, onde serão avaliados na interface eletrodo, as reações de transferência de carga, polarização e outros (Damos *et.al.*, 2004; Carvalho e Andrade., 2006). Ao passo que, quando a corrente atravessa a interface do eletrodo, será conduzida para a solução, onde será desencadeado o efeito resistivo na pela migração do íons, representado pela resistência (R_w); quando associa-se a elementos capacitivos, transcorrerá um atraso de corrente e potencial, ocorrendo a representação de um diagrama que apresenta um componente real (resistivo) e um imaginário (capacitivo); já componente real (Z') e o imaginário (Z''), onde serão avaliados a resistência da solução (R_Ω), a resistência da transferência de carga (R_{ct}), (C_d) capacitância da dupla camada elétrica e a frequência angular (ω) (Bard *et.al.*, 2001).

Figura 9 - Representação esquemática do diagrama da impedância de Nyquist, no qual é avaliado a real e imaginária, sendo dados importantes para construção do sistema sensor e a avaliação do biorreconhecimento dos componentes.



Fonte: autor próprio.

O cálculo teórico da impedância é o resultante da perturbação que acontece de um circuito elétrico, que no gráfico é representado pelas componentes real (Z') e imaginária do sistema (Z''), que são decorrentes da equação:

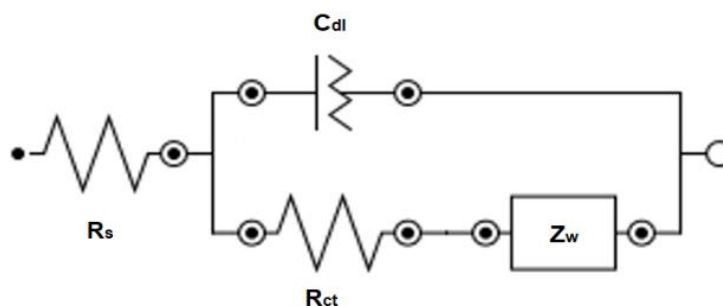
$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{ct}^2 R_{ct}^2} \text{ e } Z'' = \frac{\omega C_{ct} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{ct}^2 R_{ct}^2}$$

Sendo, R_{Ω} (resistência da solução); ω (frequência angular), C_{dl} (capacitância da dupla camada elétrica), R_{ct} (resistência a transferência de carga) (Damos; Mendes e Kubota, 2004).

Segundo Lisdat e Schäfer, 2008, para que aconteça a caracterização de um material biológico, será aplicado uma perturbação no sistema, sendo a corrente destinada a fluir através de todos os eletrodos do sistema de maneira que será fornecido um circuito equivalente, é importante salientar que para a realização da EIS é necessário coordenar todas as situações no eletrodo de trabalho, de modo que ao realizar as medições os compostos denominados redox-ativos são adicionados à solução, ocasionando em uma carga definida chamada de resistência de transferência (R_{ct}) (Lisdat e Schäfer, 2008).

Escolhendo o modelo de circuito elétrico que mais adequa ao seu experimento, é possível a correlação de todas as propriedades físicas/químicas, de todos os elementos do circuito, obtendo valores numéricos, pelas simulações dos dados experimentais (Carvalho e Andrade, 2006), e para a EIE, haverá uma espécie de resistência caracterizada pela lei de Ohm, que diz que, o ângulo formado pelos gráficos conferem o equilíbrio entre todos os componentes capacitivos e resistivos do circuito, sendo este denominado de circuito equivalente de Randles, pois a corrente total pela interface do eletrodo de trabalho, confere a soma dos processos faradâicos e a capacitância da dupla camada, deste modo todas as reações obtidas pela transferência de carga, da dupla camada elétrica, e que a migração de elétrons, serão avaliadas a partir do diagrama de Nyquist e pelas curvas de Bode (Damos *et.al.*, 2004; Bard *et.al.*, 2001; Lisdat; Schäfer, 2008).

Figura 10- Circuito equivalente de Randles, onde: Z_w : impedância de Warburg, R_{ct} : resistência da transferência de carga, R_s : resistência da solução eletrolítica e C_{dl} : Capacitância da dupla camada resultante da distribuição de cargas que acontece na superfície do eletrodo/solução.



Fonte: autor próprio.

Vários fatores podem atuar como interferentes para obtenção de dados de impedância de um sistema, com processos faradâicos, adsorção das substâncias, as reações no eletrodo, a heterogeneidade das superfícies e outros, contudo a técnica de EIS, tem sido amplamente empregada como método preferível para caracterização em rotinas diárias (Damos *et.al.*, 2004). Esta técnica vem ganhando muito destaque devido a sua grande sensibilidade, o que eleva o seu espectro de atuação, de modo que podemos observar sua utilização nas mais variadas áreas, como análises clínicas e biomédicas, outro ponto também é que por essa técnica é possível monitorar as propriedades físico-químicas dos elementos (Sharma *et al.*, 2010).

3.8 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

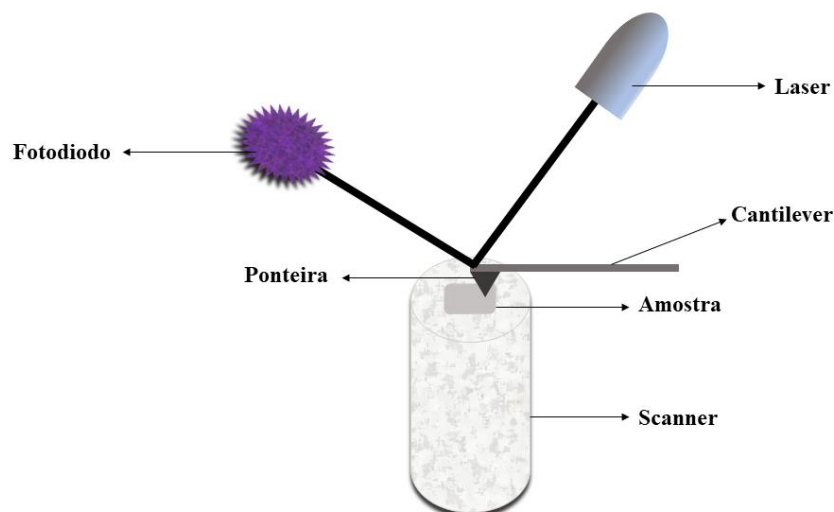
O microscópio de força atômica (Atomic Force Microscope), surgiu no ano de 1986 sendo desenvolvido pelos cientistas Gerd Binnig e Calvin Quate, sendo considerada até hoje como ferramenta importante para caracterização de superfícies a nível atômico, sendo possível a obtenção de imagens das mais variadas superfícies, sendo estas condutoras, semi-condutoras e dieléticas, nanoestruturas e biomoléculas, entre outros; onde realiza-se uma varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) que tem aproximadamente de 100 a 200 μm , correspondendo a 20 nanômetros de diâmetro, estando acoplada ao cantiléver flexível (Ferreira e Yamanaka; 2006), ou seja, o seu componente essencial é esta ponta que detecta as

mudanças no relevo pelas grandezas físicas, é importante salientar que está também não utiliza a corrente de tunelamento, mas forças da interação atômica para produção das imagens. As suas principais vantagens são: não necessitar do recobrimento de amostra por um material condutor, maior resolução, a obtenção de imagens em terceira dimensão, permite uma quantificação direta, e mede a espessura de filmes, além de possibilitar a sua aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento como: ciência dos materiais, nanobiotecnologia e engenharia de macromoléculas (Pinto et.al., 2015).

A definição do modo da imagem pode variar de acordo com a aplicação específica a qual se quer obter, deste modo este equipamento fornece inúmeras possibilidades para obtenção de imagens com os vários diferentes tipos de amostras, e consequentemente gerando informações; sendo as amostras obtidas da seguinte forma: a ponteira vai se aproximando da amostra, que será atraída pela superfície através das forças atrativas como a de Van der Waals, e com isso haverá um aumento de visão da área fazendo com que os átomos que estão presentes, comecem a se repelir, o que resulta num anulamento de forças, sendo a imagem obtida quando finalmente as forças repulsivas dominam (Galal *et al.*, 2012).

Os componentes básicos de um microscópio de força atômica, são: scanner piezoelétrico, cantiléver, laser e um detector de fotodiodo e eletrônico, de maneira que as imagens referentes a amostra vão sendo digitalizadas em eixos x e y, sendo estas montadas em um scanner piezoelétrico, que vai garantir a obtenção da imagem no formato tridimensional e com alta resolução, a força será medida pelo cantilever que atua como uma “mola” sobre a amostra; então um feixe de laser é focado na extremidade do cantiléver e os feixes são detectados pelo fotodiodo (figura 11) (Dufrêne., 2002; Whiter; Park., 2014).

Figura 11 - Representação esquemática do sistema de microscopia de força atômica.



Fonte: autor próprio.

Alguns modos de imagem podem ser realizados utilizando o AFM, dentre estes, destacam-se: o modo contato, caracterizado pela medição da topografia da mostra, segundo a sua altura constante, o que evita modificações na amostra, o modo de deflexão constante onde a altura da amostra será ajustada para manter a sua deflexão entre outros (Dufrêne., 2002).

A técnica de AFM, pode ser manuseada de três maneiras diferentes, que são: não-contato, contato e contato intermitente também chamada de “*tapping*”, no modo contato, acontece uma interação da ponta com amostra, fornecendo assim as imagens, contudo, por outro lado, pode ocasionar em danos diretamente as amostras; já o modo não-contato caracteriza-se não haverá contato com a amostra, porém não é aplicável a todo e qualquer tipo de amostra, justamente pela instabilidade; e o modo tapping que assemelha-se ao modo não-contato, mas haverá um contato intermitente através da ponta vibrante, o que de certa forma contorna as limitações apresentadas pelo modo não- contato (Ferreira; Yamanaka., 2006).

Para análises em superfícies sensoras, utiliza-se as análises no AFM no modo não contato, devido as modificações que são realizadas para obter as camadas de ligação e biointeração que acontece pelo antígeno-anticorpo, tornando-se assim uma

ótima alternativa para avaliação do processo de modificação das SAMs, (Pinto et.al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Aflatoxina B₁, imunoglobulina para AFB₁, N-hidroxisuccinimida (NHS), hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), soro albumina bovina (BSA), nanopartículas de óxido de zinco serão obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). A imunoglobulina para AFB₁ foi adquirida da Abcam (United Kingdom). A micotoxina foi obtida da Profa. Idjane Santana de Oliveira do Laboratório de Microbiologia do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE. Todos os reagentes e solventes que foram utilizados são de grau analítico.

4.2 Isolamento e detecção da micotoxina produzida por cepa fúngica em alimento contaminado

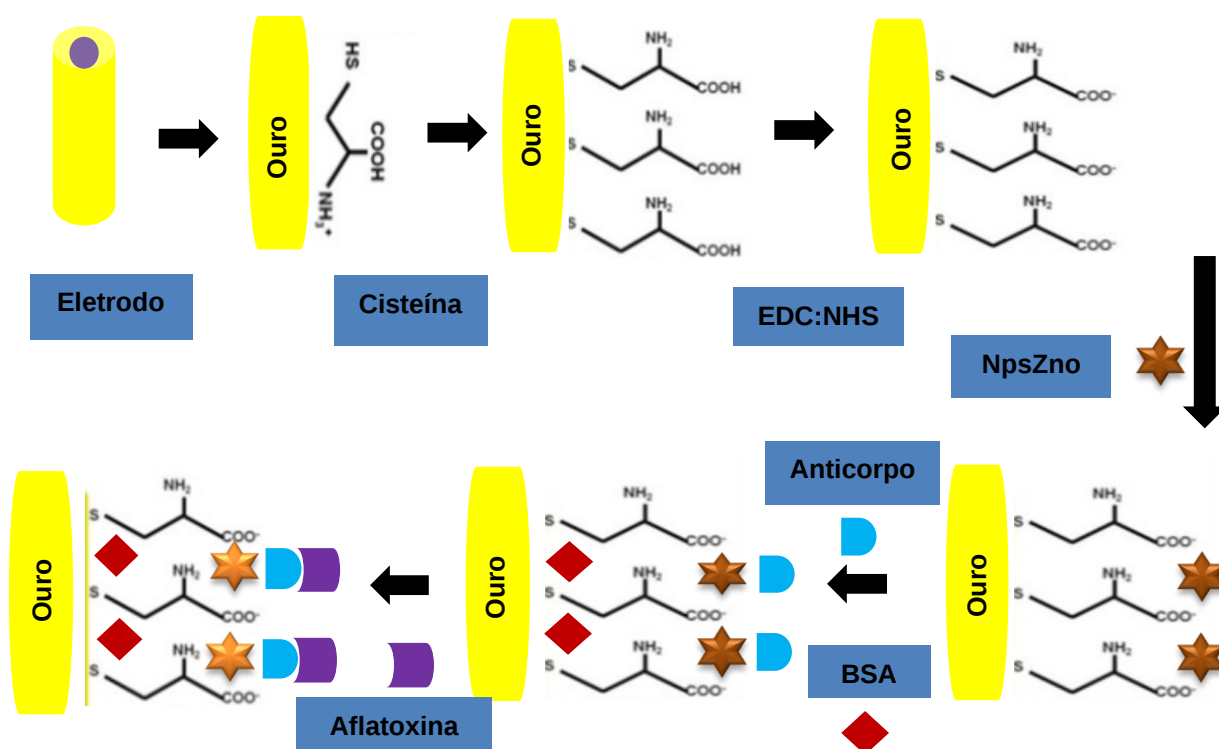
A AFB₁ foi avaliada após o crescimento da cepa fúngica em meio ágar batata dextrose por 15 dias a 25°C. A produção AFB₁ foi avaliada pelo imunoeletrodo piezoelétrico e eletroquímico e comparadas com os dados obtidos com as MTXs comerciais.

4.3 Modificação da superfície do eletrodo

O eletrodo de ouro ($\phi = 2\text{mm}$) foi polido com alumina 0,5 μm e sonicado por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N₂). Em seguida, o eletrodo de ouro foi imerso em tampão fosfato contendo 10mM de Cys por 50 min na quantidade de 4 μL , e deixado secar a temperatura ambiente para a automontagem da Cys. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com água ultra pura, para remoção de quaisquer moléculas não ligadas, após a lavagem o eletrodo modificado foi imerso numa solução aquosa de 0.4M de EDC e 0.1M de NHS numa proporção de 1:1 (v/v) (Safina *et al.*, 2008). Em seguida, o eletrodo foi modificado com NPsZnO incubado a 15 minutos em temperatura ambiente através de drop-coating foi adsorvido 2 μL , ao qual reagiu com o EDC:NHS para a ligação do MAb. Depois disto, 2 μL de solução de MAb foi adsorvido ao eletrodo já modificado com Cys- EDC:NHS- NpsZno, incubado

por 20 minutos a temperatura ambiente. E com a finalidade de bloquear os sítios ativos remanescentes foi adicionado 2 μL BSA (10% p/v) a superfície do eletrodo de ouro. Após obtenção do eletrodo modificado com Cys-NPsZnO-MAb, o sistema foi submetido a incubação com diferentes concentrações da AFB1 de interesse (0.5, 1 ng mL⁻¹, 1, 5, 10, 100 μg mL⁻¹), (Simão et al., 2016), como demonstrado no esquema a seguir.

Figura 12 - Representação esquemática do imunossensor.



Fonte: autor próprio.

4.4 Caracterização Eletroquímica

A análise eletroquímica foi realizada através de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 302N, utilizando uma célula eletroquímica composta por 3 eletrodos, sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro. Como sonda redox, será utilizada uma solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1). As análises de voltametria cíclica (VC) foram realizadas a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V. A espectroscopia de impedância

eletroquímica (EIE) foi obtida numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (Oliveira *et al.*, 2011).

4.5 Funcionalização da Nanopartícula de óxido de zinco.

As nanopartículas foram funcionalizadas com aminopropiltietoxissilano (APTES) de com o método de Grasset *et.al*; onde o APTES foi enxertado na preparação de 1,5 g de óxido de zinco, disperso em água destilada (50ml), pH 6,8, sendo esta suspensão agitada por aproximadamente 1 hora, havendo o aumento do pH para 8,9, o excesso de APTES, foi removido por filtração e lavagem com álcool e acetona (Grasset *et.al.*,2003).

4.6 Simulação da Espectroscopia de impedância eletroquímica por meio do circuito elétrico equivalente

Os dados obtidos na caracterização de EIS foram representados na forma de um diagrama de Nyquist e ajustados utilizando o software NOVA. As curvas obtidas foram analisadas para deduzir e estudar o comportamento interfacial dos componentes do biossensor.

4.7 Caraterização topográfica por meio da Microscopia de força atômica

As modificações nas superfícies do eletrodo foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica SPM-9700 (Shimadzu, Japão) com ponta de prova (“cantilever”) ajustado para o modo não-contato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLATAFORMA NANOESTRUTURADA BASEADA EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA IMUNODETECÇÃO DE AFLATOXINA B1

5.2 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

Foi realizada uma análise morfológica e topográfica da construção do imunossensor por meio do AFM (figura 13), técnica considerada complementar para avaliação das modificações que ocorrem na superfície de eletrodo. As modificações do eletrodo foram avaliadas através da visualização de rugosidades na superfície (Galal *et. al.*, 2012).

Uma cobertura heterogênea da superfície do eletrodo foi obtida para os sistemas Cys- NpsZnO (Fig. 13c) e Cys-NpsZnO-Ac-BSA (Fig. 13b) com altura média de 58 nm e 76 nm, respectivamente.

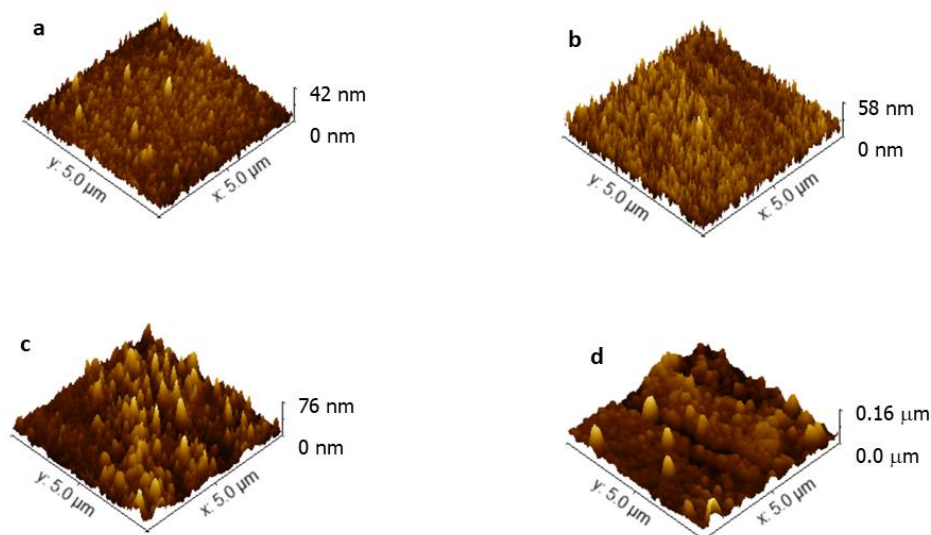
Esses resultados seguem estudos anteriores que determinaram a altura de 30 nm para o anticorpo imobilizado (Costa *et al.*, 2018). Além disso, avaliou-se a associação entre o anticorpo e a aflatoxina B1 (Fig. 13d).

O sistema Cys-ZnONp-Ac-BSA apresentou boa interação com AFB1 (altura média de 0,16 μm) em comparação com a rugosidade da camada sensora (Fig. 13d).

Uma densa camada adsorvida na superfície do sensor foi observada no processo de bioreconhecimento. A diferença observada nos dados de altura é atribuída à formação do imunocomplexo Ac-AFB1 (Costa *et al.*, 2018).

Em adição, a rugosidade exibida na figura 13b denota que o processo de adsorção do sistema sensor Cys-NPsZnO-Ac-BSA foi obtido com sucesso e que a superfície biossensora possui uma topografia que favorece ao processo de bioreconhecimento.

Figura 13 – Imagens topográficas obtidas do eletrodo de ouro modificado por (a) Cys, (b) Cys- NpsZnO, (c) Cys-NpsZnO-Ac-BSA, (d) Cys-NpsZnO-Ac-BSA-AFB1.



Fonte: autor próprio.

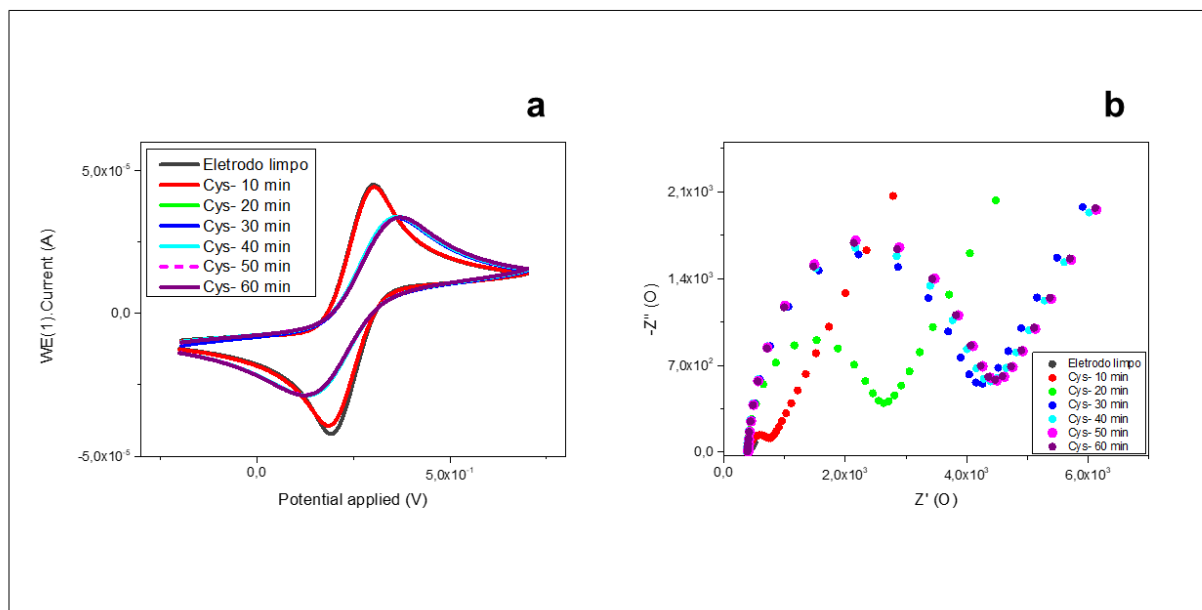
5.1.1 Medidas eletroquímicas do imunossensor.

Por meio das análises de VC e EIE, foram obtidos resultados a respeito da plataforma acima elucidada. Para isso, foi utilizado a solução de ferro-ferricianeto de potássio para a troca de elétrons, do par redox com o eletrodo para cada etapa da modificação da superfície. O que podemos visualizar na literatura é a crescente utilização da cisteína em biossensores para as mais variadas aplicações, como na construção de um biossensor impedimétrico para detecção de bactérias (Silva et al., 2017) e na detecção do vírus da dengue devido as suas propriedades de quimiossorção na superfície de ouro (Avelino *et al.*, 2016).

Ademais, foi feito um estudo de tempo para a cisteína, um aminoácido não essencial, utilizado na plataforma para fazer uma ligação entre a superfície do eletrodo de ouro e seu grupamento tiol, estabelecendo assim a primeira camada do sistema (Simão *et al.*, 2015), sendo possível observar um aumento da resposta impedimétrica com o aumento do tempo de adsorção da cisteína, de forma que foi utilizada a concentração de 50 mM.

O tempo estabelecido para construção deste sistema sensor foi de 50 minutos, refletido pela saturação da superfície do eletrodo, como demonstrado na figura 14 a, pelo diagrama de Nyquist (Barbieri *et al.*, 2017).

Figura 14- Voltamograma cíclico (a) e espectro de impedância (b) referentes ao estudo de tempo de adsorção da Cys, na concentração fixa de 50 mM, na quantidade de 4 μ L.



Fonte: autor próprio.

No voltamograma cíclico é possível visualizar uma reversibilidade para o eletrodo limpo caracterizado por um processo de transferência de elétrons limitado por difusão. A adsorção de Cys no eletrodo de ouro propiciada pela interação do grupo sulfidril, refletiu num decremento das correntes de pico anódica e catódica. Em adição, o espectro de impedância da figura 14 b demonstrou um aumento da resistência de transferência de carga. Este processo está relacionado à repulsão de cargas que acontece entre o grupo carboxílico da Cys e a carga negativa da sonda redox (Luna *et.al.*, 2015).

Na figura 14 b visualizamos o diagrama de Nyquist para os diferentes tempos de avaliação da adsorção da cisteína sobre o eletrodo de ouro.

As curvas formadas evidenciam o aumento do diâmetro do semi-círculo à medida que se evidencia o incremento no tempo de incubação da cisteína.

A simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância foi realizada por meio do circuito equivalente de Randles, onde obtemos o valor de (R_{CT}), levado em consideração para a construção de imunossensores.

Na tabela 1 podemos observar os valores referentes à resistência de transferência de carga, consequente aumento no valor de R_{CT} , indicando que há um bloqueio a transferência de elétrons, com o aumento de tempo de adsorção.

Tabela 1- Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de tempo da cisteína.

Tempo de Quimiossorção	$R_{CT}(\Omega)$
10 min	0.328 Ω
20 min	2.10 k Ω
30 min	3.55 k Ω
40 min	3.74 k Ω
50 min	3.81 k Ω
60 min	3.79 k Ω

Fonte: autor próprio.

Posteriormente, realizou-se a ativação dos grupos funcionais ativos da cisteína com a solução de EDC:NHS (1:1) que atuou neste sistema como agente acoplador das nanopartículas de óxido de zinco aminadas. As correntes de pico aumentaram com a concentração de NPsZnO aminado. A adsorção de NPsZnO ocorreu através de EDC: NHS. Os agentes de acoplamento ativam o grupo carboxila terminal de carga negativa de Cys que é substituído por NHS éster na superfície do eletrodo. Assim, o acúmulo de cargas positivas na superfície do eletrodo atrai a sonda redox (Geng *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2013).

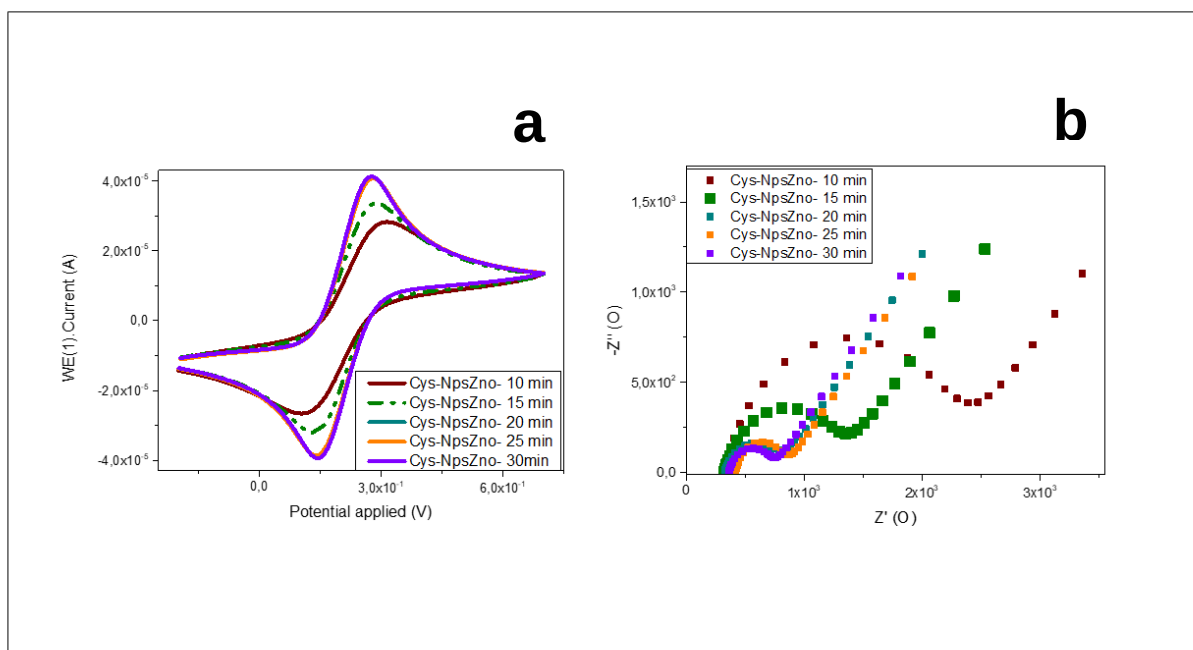
A adsorção da NPsZnO é de fundamental importância para a manutenção da atividade eletroativa do eletrodo de trabalho. Segundo Nai-Feng e colaboradores, 2014, NPsZnO é um tipo de material semi condutor, que apresenta ótimas

propriedades elétricas aplicáveis a biossensores, aumentando a sensibilidade, sinal eletroquímico, e aumento da área superficial (Nai-Feng *et al.*, 2014).

Podemos visualizar em artigos publicados recentemente o emprego das nanopartículas para construção dos sistemas biossensores, de forma a atrelar ainda mais sensibilidade na detecção. Destaca-se o trabalho de Simão *et.al*, o qual utilizou das NpsZno para construção de um nanobiossensor para detecção de arboviroses, com características semelhantes à deste imunossensor (Simão *et.al.*, 2021).

Desta forma, após a imobilização das NPsZno, foi observado um aumento da condutividade do sistema refletido pelo aumento das correntes de pico anódicas e catódicas (figura 15 a) e diminuição da resistência de transferência de carga (figura 15 b). A avaliação do tempo de imobilização de NPsZnO variou de 10 min de incubação até 30 minutos, em intervalos de 5 min para se obter uma resposta capaz de aumentar a migração de elétrons no sistema. Estudo semelhante foi realizado por Simão e colaboradores, 2020.

Figura 15 – Voltamograma Cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b), dos respectivos tempos de adsorção da Nanopartícula de óxido de zinco.



Fonte: autor próprio.

O valor da resistência a transferência de carga é apresentado na tabela 2, para esse estudo em questão ficou elucidado o tempo de 15 min, para garantir a resposta esperada. Esse tempo foi estabelecido para que não houvesse uma grande diminuição na resistência a transferência de carga, favorecendo a avaliação das outras etapas de modificação do eletrodo (Silva *et al.*, 2017).

Alguns autores destacam que a presença das NPsZnO no sistema é de fundamental importância por garantir uma maior adesão do anticorpo, devido a presença de grupos amina livres capazes de promover, como mencionado, uma ligação covalente com o anticorpo. Além disso, por possuir características semicondutoras ele é capaz de reduzir a resistência e como consequência aumentar a sensibilidade do sistema, já que devido a sua alta capacidade oxidativa promove a redução do par redox do sistema e uma melhor troca de elétrons com o meio. Resultando, assim, em uma maior janela de resposta para o sensor, ou seja, maior sensibilidade (Grasset *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014)

Tabela 2- Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo de nanopartícula de óxido de zinco.

Tempo de Quimiossorção	$RCT_{(\Omega)}$
10 min	1.98 Ω
15 min	993 Ω
20 min	448 Ω
25 min	417 Ω
30 min	373 Ω

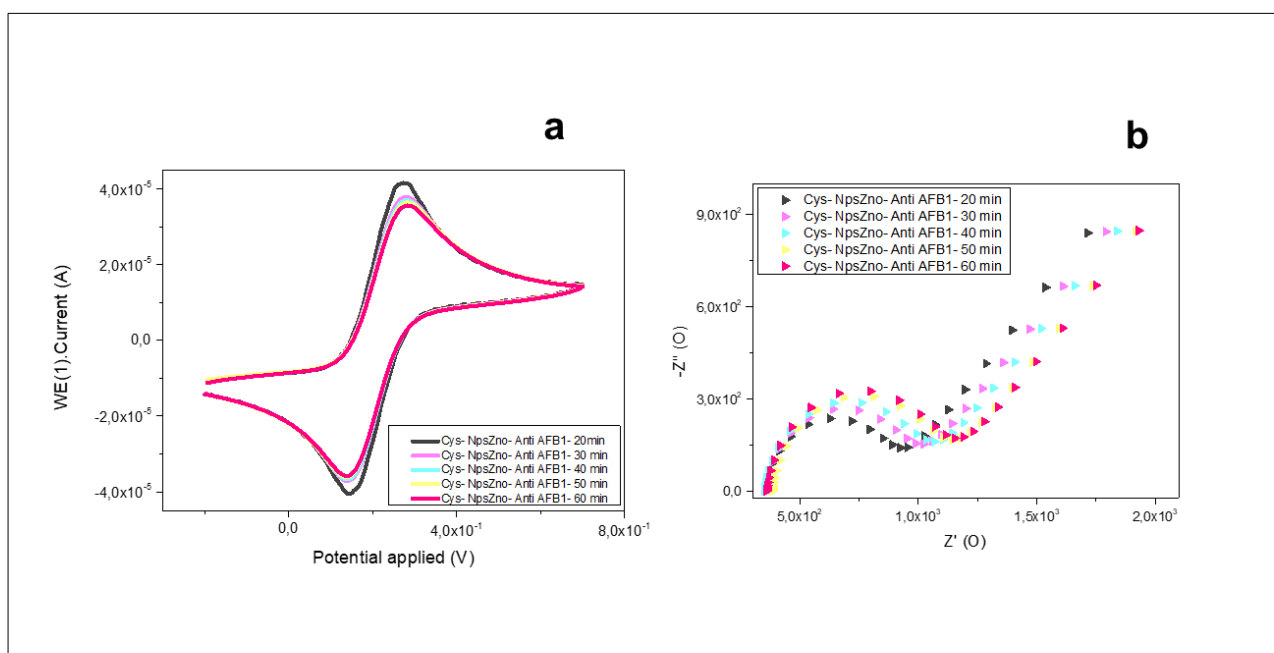
Fonte: autor próprio.

Após a imobilização da Cys-NPsZnO, foi realizado o estudo de tempo do anticorpo monoclonal anti-AFB1. O estudo do processo de imobilização do anticorpo é uma etapa importante, uma vez que a base do funcionamento de um imunossensor sensor é a formação do imunocomplexo. Desta forma, a formação de complexo estável entre o antígeno e anticorpo, reflete diretamente na especificidade do

reconhecimento molecular (Luppa *et al.*, 2001). Ainda em estudo recente publicado no ano de 2017, por Santana e colaboradores, é possível observar as diversas possibilidades de aplicação dos imunossensores (Santana *et.al.*, 2017). Em adição, Balkenhohl e Lisdat (2007), utilizaram do sistema imunossensor para detecção de anticorpos antitransglutaminase em soro humano, e a sua precisão foi superior ao teste ELISA (Balkenhohl e Lisdat ,2007); em outro estudo realizado por (Moreno-Gusmán *et.al.*, 2012), foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico que realiza a detecção de forma rápida do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que demonstrou um ótimo desempenho analítico, com alta sensibilidade e seletividade (Moreno-Gusmán *et.al.*, 2012). Destaca-se que os imunossensores eletroquímicos exibem limites de detecção bem baixos, e são pouco afetados com interferentes quando comparado a outros (Ricci *et.al.*, 2012).

Diante do exposto iniciou-se o estudo de imobilização de anti-AFLAB1 através da incubação na superfície do eletrodo na quantidade fixa de 2 μL , variando-se o tempo de 20 a 60 minutos, para que fosse avaliada uma resposta amperométrica ótima. As análises eletroquímicas são mostradas a seguir:

Figura 16 – Espectro de voltametria (a), diagrama de Nyquist (b), característicos do estudo de tempo do anti AFB1.



Fonte: autor próprio.

Com o aumento do tempo de incubação do anticorpo foi observada um incremento na taxa de imobilização da biomolécula. O incremento do tempo favoreceu a uma diminuição nos valores i_{pa} e i_{pc} do voltamograma, mostrado na figura 16a de maneira bem significativa, sendo confirmado pela espectroscopia de impedância eletroquímica figura 16b. A característica de bloqueio da transferência de elétrons refletido no aumento na resposta impedimétrica é relacionado a natureza proteica do anticorpo (Sharma *et al.*, 2010), uma vez que a acomodação da estrutura polipeptídica é direcionada pelas interações intermoleculares do tipo iônicas e apolares com a superfície de trabalho.

A simulação teórica também dos dados espectroscopia de impedância também foram obtidos, e os dados relativos resistência à transferência de carga estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo do anticorpo anti AFB1.

Tempo de Quimiossorção	$RCT_{(\Omega)}$
10 min	4.77 Ω
20 min	534 Ω
30 min	605 Ω
40 min	656 Ω
50 min	698 Ω
60 min	735 Ω

Fonte: autor próprio.

O tempo de 20 minutos foi adotado para a realização da construção do sistema sensor. A resistência de transferência de carga no valor de 534 ohms denota uma característica condutora essencial para evitar sinais de bloqueio quando seja efetivada a imobilização do anticorpo e avaliação da formação do imunocomplexo.

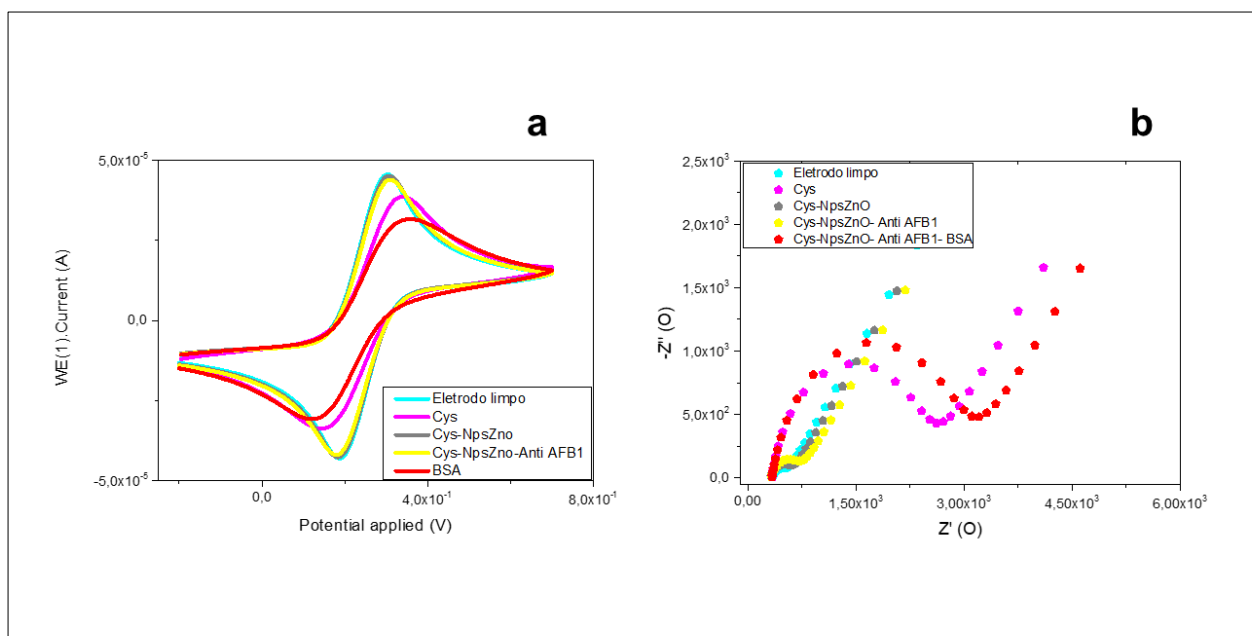
A natureza química das NPsZnO, possibilitou a ancoragem covalente dos anticorpos anti-afla B1 e consequente formação da camada de bioreconhecimento para o analito avaliado durante a segunda etapa do desenvolvimento do

imunossensor. Com o objetivo de bloquear os sítios ativos remanescentes o BSA foi adicionado a este sistema sensor.

O BSA, vem sendo aplicado para construção de diferentes tipos de imunossensores com a mesma finalidade, ou seja, bloquear os sítios onde não houve interação com o anticorpo. O trabalho de Zhang e colaboradores, demonstrou a aplicação do BSA e uma superfície imunossensora para detecção ultrasensível de vitelogenina, comprovando que este agente bloqueador auxilia no aumento de sensibilidade do sistema (Zhang *et.al.*, 2021).

Para o imunossensor desenvolvido foi utilizado 2 μ L de BSA a 10% (p/v). Foi observado para o voltamograma cíclico uma diminuição da resposta amperométrica do sistema (figura 17 a), e um novo aumento da impedância total do sistema (figura 17 b), sendo proporcional a quantidade de material imobilizada sob a superfície do eletrodo. Este comportamento demonstra que a camada sensora foi obtida com sucesso.

Figura 17- Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de montagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1.



Fonte: autor próprio.

Durante a segunda etapa do desenvolvimento do imunossensor foi realizado o estudo da bioatividade do anticorpo imobilizado. A avaliação foi realizada com 5

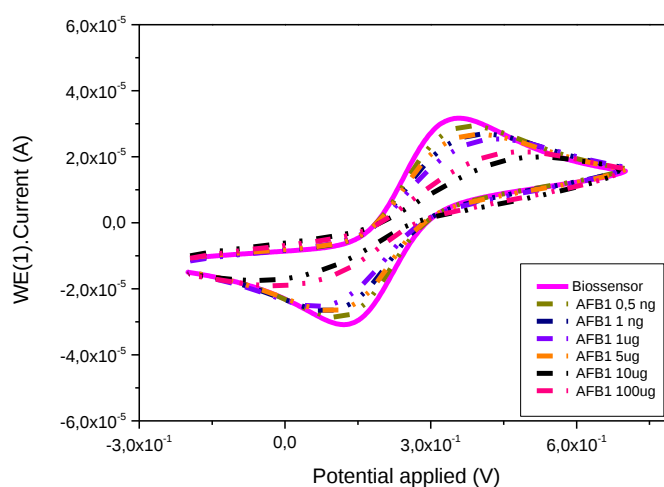
concentrações da toxina (0,5 e 1 ng.mL; 1, 10, 5,100 μg . mL), na quantidade de 2 μL , no tempo fixo de 30 minutos para cada incubação (figura 18 a).

Na figura 18 evidencia-se o processo de bioreconhecimento do imunossensor para as diferentes concentrações de AFB1, com os respectivos voltamogramas cíclicos revelando uma diminuição gradual das correntes pico e um aumento na separação dos picos com o aumento da concentração da AFB1.

Na figura 18 b é mostrado o aumento na resposta da impedância proporcional ao acúmulo de toxina no eletrodo, estando de acordo com as análises voltamétricas. Os valores de R_{ct} (tabela 4) demonstram o bloqueio a passagem de elétrons na interface do eletrodo/solução.

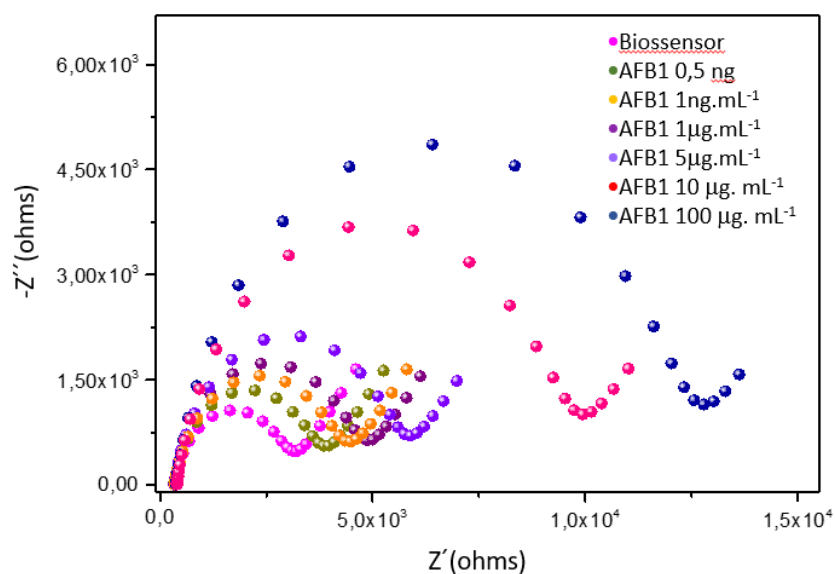
Figura 18 - Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 para diferentes concentrações da aflatoxina.

(a)



Fonte: autor próprio.

(b)



Este bloqueio está relacionado com a formação das interações anticorpo-antígeno, na superfície do eletrodo de ouro, demonstrando após a adsorção química o anticorpo manteve sua atividade biológica.

A plataforma desenvolvida demonstrou ser uma estratégia promissora para avaliação futura de alimentos contaminados com AFB1 com possibilidade de detecção na faixa de ng.mL^{-1} .

5 CONCLUSÃO

- Um biossensor eletroquímico baseado em monocamadas automontadas de Cys, nanopartícula de óxido de zinco e anticorpo monoclonal foi desenvolvido, apresentando um baixo custo, realizando uma detecção sensível e específica da micotoxina AFB1.
- O emprego das nanopartículas de óxido de zinco permitiu a manutenção da taxa de transferência de elétrons o que favoreceu à condutividade do sistema, propiciando um aumento da área de superfície para o adequado ancoramento do anticorpo anti-aflatoxina A e manutenção estrutura e capacidade de bioreconhecimento.
- As imagens obtidas através da microscopia de força atômica juntamente com as medições pelas técnicas eletroquímicas, revelaram a imobilização das camadas, formando assim o imunossensor Cys- NpsZno- Anti AFB1, na superfície do eletrodo de ouro.
- Observou-se que as técnicas eletroquímicas apresentam uma ótima detecção das diferentes concentrações da AFB1, com um limite de detecção na escala ng.mL^{-1} .
- O imunossensor foi capaz de diferenciar cada bicomponente a partir de suas características estruturais e físico-químicas.
- Esse imunossensor mostrou seu reconhecimento específico para as seis diferentes concentrações de AFB1.
- O sensor desenvolvido exibiu uma boa sensibilidade, sendo assim um forte candidato para desenvolvimento de protótipo inovador.
- Porém a necessidade da realização de futuros testes para avaliação de tempo de prateleira, avaliação de reprodutibilidade e miniaturização, serão necessários.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, Silvia ML et al. The supporting electrolyte and its multiple functions on electrode processes. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 813-817, 2004.

AHMED, A. et al. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 3, p. 631–646, 2014.

ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavarin A for bacterial detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015.

ANKLAM, Elke; STROKA, Joerg; BOENKE, Achim. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, [s.l.], v. 13, n. 3, p.173-183, abr. 2002. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0956-7135\(01\)00098-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-7135(01)00098-6).

ARAKAWA, T. et al. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino acids*, v. 33, n. 4, p. 587-605, 2007.

ASHIQ, Samina. Natural Occurrence of Mycotoxins in Food and Feed: Pakistan Perspective. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, [s.l.], v. 14, n. 2, p.159-175, 12 dez. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12122>.

BALKENHOHL, T.; LISDAT F., Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, p. 50–57. 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.041>

BARD, Allen J. et al. Fundamentals and applications. *Electrochemical methods*, v. 2, n. 482, p. 580-632, 2001.

BENNETT, J. W.; KLICH, M.. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, New Orleans, La, v. 16, n. 3, p.497-516, jun. 2003

BINDER, E.m.; TAN, L.m.; CHIN, L.j.; HANDL, J.; RICHARD, J.. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science And Technology*, [s.l.], v. 137, n. 3-4, p.265-282, out. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.005>.

BINNIG, Gerd; QUATE, Calvin F.; GERBER, Ch. Atomic force microscope. *Physical review letters*, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.

BOK, Jin Woo; KELLER, Nancy P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, v. 3, n. 2, p. 527-535, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 03 mar. 2021.

CALDERONE, R. A., and R. L. Cihlar (ed.). 2002. Fungal pathogenesis: principles and clinical applications. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

CARVALHO, Liliane A. de; ANDRADE, Adalgisa R. de; BUENO, Paulo R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous reactions at dimensionally stable anodes. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

CASTILLO, Gabriela; SPINELLA, Katia; POTURNAYOVÁ, Alexandra; INEJDÁRKOVÁ, Maja; MOSIELLO, Lucia; HIANIK, Tibor. Detection of aflatoxin B 1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control*, [s.l.], v. 52, p.9-18, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.008>

CHANG, B. Y.; PARK, S. M. Electrochemical impedance spectroscopy. *Annual review of analytical chemistry*, v. 3, p. 207–229, 2010.

CHAUHAN, Ruchika; SINGH, Jay; SACHDEV, Tushar; BASU, T.; MALHOTRA, B.d.. Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors And Bioelectronics*, [s.l.], v. 81, p. 532-545, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.004>.

COSTENARO, D. et al. Preparation of luminescent ZnO nanoparticles modified with aminopropyltriethoxy silane for optoelectronic applications. *New Journal of Chemistry*, v. 37, n. 7, p. 2103-2109, 2013.

CREPPY, Edmond E.; CHIARAPPA, Patrizia; BAUDRIMONT, Isabelle; BORRACCI, Pietro; MOUKHA, Serge; CARRATÙ, Maria R.. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. : are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. *Toxicology*, [s.l.], v. 201, n. 1-3, p. 115-123, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.04.008>.

CUNNINGHAM, Brian T.; CHAN, Leo; MATHIAS, Patrick C.; GANESH, Nikhil; GEORGE, Sherine; LIDSTONE, Erich; HEERES, James; HERGENROTHER, Paul J.. Photonic crystals: a platform for label-free and enhanced fluorescence biomolecular and cellular assays.: A platform for label-free and enhanced fluorescence biomolecular and cellular assays. *Mrs Proceedings*, [s.l.], v. 1133, p. 1-10, 2008. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1557/proc-1133-aa04-01>.

DAMOS, Flavio Santos; MENDES, Renata Kelly; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Química Nova*, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 970-979, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000600023>.

DILKIN, Paulo. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 187-191, dez. 2002.

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.

DOS SANTOS AVELINO, Karen Yasmim Pereira; DE OLIVEIRA, Maria Danielly Lima. Desenvolvimento de imunossensor voltamétrico para detecção do vírus

dengue 1 baseado em camada automontada de cisteína e nanopartículas de ouro modificadas.

DUFRENE, Yves F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of bacteriology*, v. 184, n. 19, p. 5205-5213, 2002.

ELGRISHI, Noémie et al. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, v. 95, n. 2, p. 197-206, 2018.

FATIBELLO- FILHO, O.; CAPELATO, M.D.; *Química Nova*, 1992, 15, 8.

FENG, Peter. Emergence of Rapid Methods fo Identifying microbial pathogens in foods. *Journal Of Aoac International*, Washington, v. 79, n. 3, p.809-812, nov. 1996.

FERREIRA, Antonio Aparecido Pupim; YAMANAKA, Hideko. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FINK-GREMMELES, Johanna. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, [s.l.], v. 25, n. 2, p.172-180, fev. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030701823142>.

FOGUEL, Marcos Vinicius. Desenvolvimento de imunossensores para aflatoxina B1. 2011.

Forgacs, J. 1962. Mycotoxicoses—the neglected diseases. *Feedstuffs* 34:124-134

Forgacs, J., and W. T. Carll. 1962. Mycotoxicoses. *Adv. Vet. Sci.* 7:273-382.

FREIRE, Renato S.; PESSOA, Christiana A.; KUBOTA, Lauro T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

GAGLIARDI, Serena; RAPONE, Bruno; MOSIELLO, Lucia; LUCIANI, Domenico; GERARDINO, Annamaria; MORALES, Piero. Laser-Assisted Fabrication of Biomolecular Sensing Microarrays. *Ieee Transactions On Nanobioscience*, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 242-248, set. 2007. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/tnb.2007.903485>.

GAU, Vincent; MA, Shu-ching; WANG, Hua; TSUKUDA, Joni; KIBLER, John; HAAKE, David A.. Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. *Methods*, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 73-83, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.008>.

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.

GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J.m.; MOLTÓ, J.c.; MAÑES, J.. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 108, n. 1, p.272-276, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.013>.

GRASSET, F. et al. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 360, n. 1, p. 298-311, 2003.

GRIESHABER, Dorothee et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

HONG, J. D. et al. Layer-by-layer deposited multilayer assemblies of polyelectrolytes and proteins: from ultrathin films to protein arrays. *Progress In Colloid & Polymer Science*, Mainz, v. 93, n. 11, p. 98-102, nov. 1993.

HOSU, Oana; SELVOLINI, Giulia; CRISTEA, Cecilia; MARRAZZA, Giovanna. Electrochemical Immunosensors for Disease Detection and Diagnosis. *Current Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 25, n. 33, p. 4119-4137, 24 out. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170727104429>.

IAMANAKA, Beatriz Thie; OLIVEIRA, Idjane Santana; TANIWAKI, Marta Hiromi. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 7, p. 138-161, 2010.

JAFARI, Safiye et al. Detection of *Aeromonas hydrophila* DNA oligonucleotide sequence using a biosensor design based on Ceria nanoparticles decorated reduced graphene oxide and Fast Fourier transform square wave voltammetry. *Analytica chimica acta*, v. 895, p. 80-88, 2015.

KANAZAWA, K. Keiji.; GORDON, Joseph G.. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 57, n. 8, p. 1770-1771, jul. 1985. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac00285a062>.

KHAN, Shams Tabrez; AHMAD, Javed; AHAMED, Maqsood; MUSARRAT, Javed; AL-KHEDHAIRY, Abdulaziz A.. Zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress, inhibit growth, and attenuate biofilm formation activity of *Streptococcus mitis*. *Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 295-303, 2 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-016-1339-x>.

KUMAR, Sandeep et al. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 70, p. 498-503, 2015.

LA ESCOSURA-MUÑIZ, Alfredo de; MERKOÇI, Arben. Electrochemical detection of proteins using nanoparticles: applications to diagnostics. : applications to diagnostics. *Expert Opinion On Medical Diagnostics*, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 21-37, 15 dez. 2009. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17530050903386661>.

LI, X.; JU, H.Q.; DING, C.F.; ZHANG, S.S.; *Anal. Chim. Acta* 2007,582,158.

LIMA SANTANA, Luana Kelly et.al., Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações. *Scientia Amazonia*, Amazonia, v. 6, n. 1, p. 1-12, 03 11 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Philipi-Cavalcante-Ricardo-2/publication/309677436_Imunossensores_eletroquimicos_e_suas_aplicacoes_Elect

rochemical_immunosensors_and_their_applications/links/581cd24a08ae12715af20e18/Imunossensores-eletroquimicos-e-suas-aplicacoes-Electrochemical-immunosensors-and-their-applications.pdf. Acesso em: 24 mar. 2021.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, 2008.

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 selfassembled cysteine monolayers *Sensors and Actuators B: Chemical*. v. 220, p. 565-572, 2015.

MAGLIULO, Maria; MIRASOLI, Mara; SIMONI, Patrizia; LELLI, Rosella; PORTANTI, Ottavio; RODA, Aldo. Development and Validation of an Ultrasensitive Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Aflatoxin M1 in Milk. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, [s.l.], v. 53, n. 9, p.3300-3305, maio 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0479315>.

MARIN, S.; RAMOS, A.j.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V.. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 60, p.218-237, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>.

MEDEIROS, Roberta Antigo; ROCHA-FILHO, Romeu C.; FATIBELLO-FILHO, Orlando. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 123, n. 3, p. 886-891, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.010>.

MIGLIORINI, Fernanda L. et al. Desenvolvimento de biossensor para a detecção de ureia baseado em nanofibras condutoras modificadas com nanopartículas de óxido de zinco. In: *Embrapa Instrumentação-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 9., 2017, São Carlos. Anais... São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017. p. 74-77. Editores: Caue Ribeiro de Oliveira, Elaine Cristina Paris, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, Marcelo Porto Bem querer, Maria Alice Martins, Odílio Benedito Garrido de Assis., 2017.

MISHRA, Pawan K.; MISHRA, Harshita; EKIELSKI, Adam; TALEGAONKAR, Sushama; VAIDYA, Bhuvaneshwar. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. : a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, [s.l.], v. 22, n. 12, p. 1825-1834, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006>.

MOINE, Carlos ; YBARRA , Gabriel . Fundamentals and Applications of Immunosensors: Advances In Immunoassay Technology . *Croácia* , v. 1, p. 65 - 80. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=cNKZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA65&dq=moina+e+ybarra+2012&ots=frRYLDH8n3&sig=69OWJb7kP5MyJrdaXMvtYw4oOVM&redir_esc=y#v=onepage&q=moina%20e%20ybarra%202012&f=false. Acesso em: 24 mar. 2021.

MONSIELLO, Lucia ; LAMBERTI, Iaria. Aflatoxins: Detection, Measurement and Control. 1.ed. Croácia : Interchopen,v. 1, 2011. 361 p. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=MrqZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA147&dq=biosensors+for+detecting+aflatoxins,+lucia&ots=ZY1DcRYkSo&sig=LywcpPOH_NM8SeRpMzNIP24xIEw#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 3 mar. 2021.

MOREIRA, Cleumar S. et al. Biosensores: tecnologia e aplicações. In: V Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação [online]. 2010.

MORELLO, Luis Gustavo; SARTORI, Daniele; MARTINEZ, André Luiz de Oliveira; VIEIRA, Maria Lúcia Carneiro; TANIWAKI, Marta Hiromi; FUNGARO, Maria Helena Pelegrinelli. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. International Journal Of Food Microbiology, [s.l.], v. 119, n. 3, p.270-276, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.009>.

MORENO-GUZMÁN, M.; OJEDA, I.; VILLALONGA, R.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic modified electrochemical immunosensors. Biosensors and Bioelectronics, v. 35, p. 82–86. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.01>

MORGAN, C L; NEWMAN, D J; PRICE, C P. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. : technology and opportunities in laboratory medicine. Clinical Chemistry, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 193-209, 1 fev. 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/42.2.193>.

MUKDASAI, Siriboon et al. A highly sensitive electrochemical determination of norepinephrine using l-cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 236, p. 126-135, 2016.

MULCHANDANI, Ashok; BASSI, Amarjeet S.. Principles and Applications of Biosensors for Bioprocess Monitoring and Control. Critical Reviews In Biotechnology, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 105-124, jan. 1995. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07388559509147402>.

OLIVEIRA, Idjane Santana; SILVA JUNIOR, Alberto Galdino da; ANDRADE, Cesar Augusto Souza de; OLIVEIRA, Maria Danielly Lima. Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. Current Opinion In Food Science, [s.l.], v. 29, p. 64-79, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.004>

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q.. Voltammetry: a brief review about concepts: A Brief Review About Concepts. Revista Virtual de Química, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>.

PALLARONI, Lea; VON HOLST, Christoph. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–

electrospray mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, [s.l.], v. 993, n. 1-2, p. 39-45, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00381-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00381-9).

PANIEL, Nathalie; RADOI, Antonio; MARTY, Jean-louis. Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M1 in Milk. *Sensors*, [s.l.], v. 10, n. 10, p.9439-9448, 20 out. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s101009439>.

PEREIRA, Arnaldo César. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, Campinas, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 29 jan. 2002.

PEREZ, Florência Sainz et al. Nanotecnologia: aplicações na área de alimentos. *Disciplinarum Scientia| Saúde*, v. 13, n. 1, p. 97-110, 2012.

PERUMAL, Veeradasan; HASHIM, Uda. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of applied biomedicine*, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PIERMARINI, S.; VOLPE, G.; RICCI, F.; MICHELI, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; FÜHRER, M.; KRSKA, R.; BAUMGARTNER, S.. Rapid Screening Electrochemical Methods for Aflatoxin B1 and Type-A Trichothecenes: a preliminary study. : A Preliminary Study. *Analytical Letters*, [s.l.], v. 40, n. 7, p. 1333-1346, maio 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00032710701326692>.

PINTO, Erveton Pinheiro; RAMOS, Glenda Quaresma; DA FONSECA FILHO, Henrique Duarte. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2015.

PORTO, Renato Cesar Tobias; UCHÔA, Patrícia Zigoski; PESCHEL, Lana Taíse; JUSTI, Bruno; KOSLOWSKI, Luciano André Deitos; NOGUEIRA, André Lourenço. Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. : caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. *Matéria (rio de Janeiro)*, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 1-8, 8 jan. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620170005.0248>.

RADOI, A.; TARGA, M.; PRIETO-SIMON, B.; MARTY, J.-I.. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection. *Talanta*, [s.l.], v. 77, n. 1, p.138-143, 19 out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.048>.

RIBEIRO, D.v.; SOUZA, C.a.c.; ABRANTES, J.c.c.. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Revista Ibracon de Estruturas e Materiais*, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 529-546, ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1983-41952015000400007>.

RICCARDI, Carla dos Santos et al. IMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO. *Quim. Nova*, Araraquara -sp, v. 25, n. 2, p. 316-320, 17 out. 2001.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, v. 84, p. 74–83. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>

RICCI, Francesco; VOLPE, Giulia; MICHELI, Laura; PALLESCHI, Giuseppe. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 605, n. 2, p. 111-129, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.046>.

SAKATA, Renata Akemi Prieto; SABBAG, Sandra Papesky; MAIA, Janini. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer-Goiânia*, v. 7, n. 13, p. 1477-1498, 2011.

SAMANTA, D.; SARKAR, A. Immobilization of bio-macromolecules on selfassembled monolayers: methods and sensor applications. *Chemical Society reviews*, v. 40, n. 5, p. 2567–2592, 2011.

SCHOLZ, F. *Electroanalytical Methods*. [s.l.] Berlin-Heidelberg: Springer, 2010a.

SERRA, Rita. Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. 2005.

SHANMUGAM, Nandhinee R; MUTHUKUMAR, Sriram; PRASAD, Shalini. A review on ZnO-based electrical biosensors for cardiac biomarker detection. *Future Science Oa*, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 1-15, nov. 2017. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fsoa-2017-0006>.

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.

SIMÃO, Estéfani P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin B1 in Rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, p. 1040-1047, 2016.

SIMÃO, Estefani P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. *Talanta*, v. 208, p. 120338, 2020.

SIMÃO, Estéfani P.; BARBIERI, Gilcelia J. L. S.; ANDRADE, Cesar A. S.; OLIVEIRA, Maria D. L.. Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B1in Rice. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, [s.l.], p.1040-1047, 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150361>

SIMÃO, Estefani Pontes. Nanobioeletrodos baseados em nanopartículas de óxido de zinco, ConA e WGA para detecção de arbovirose. 2021.

SKLÁDAL, Petr et al. Electrochemical immunosensors for detection of microorganisms. *Int. J. Electrochem. Sci, Czech Republic*, v. 8, n. 0, p. 1635-1649, 1 fev. 2013.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Principios de Análise Instrumental*, 5 ed. Porto Alegre/São Paulo. Artmed-Bookman, p.806, 2002

TANIMOTO, Sachiko; ICHIMURA, Akio. Discrimination of inner-and outer-sphere electrode reactions by cyclic voltammetry experiments. *Journal of Chemical Education*, v. 90, n. 6, p. 778-781, 2013.

TURNER, Nicholas W.; SUBRAHMANYAM, Sreenath; PILETSKY, Sergey A.. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 632, n. 2, p. 168-180, jan. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>.

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

Wang, J.; *Analytical Electrochemistry*, 2a. ed., Wiley-VCH: New Jersey, 2000.

WANG, Jianling; CHEN, Guihua; JIANG, Hui; LI, Zhiyong; WANG, Xuemei. Advances in nano-scaled biosensors for biomedical applications. *The Analyst*, [s.l.], v. 138, n. 16, p. 4427-4447, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC).
<http://dx.doi.org/10.1039/c3an00438d>.

WANG, L. et al. Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 51, p. 201-207, 2014.

WANG, Q.; LI, N.; *Talanta* 2001, 55, 1219.

ZANONI, Maria Valnice Boldrin et al. Panorama da eletroquímica e eletroanalítica no Brasil. *Química Nova*, v. 40, n. 6, p. 663-669, 2017.

ZHANG, Zhenzhong et al. Ultrasensitive label-free electrochemical immunosensors for detecting marine medaka (*Oryzias melastigma*) vitellogenin based on novel Cu₂O–BSA nanoparticles and anti-lipovitellin monoclonal antibody. *Sensors and Actuators B: Chemical*, p. 130358, 2021.

PERSPECTIVAS

- Realizar avaliação com o controle negativo;
- Realizar a detecção da micotoxina em alimentos, sendo: arroz, farinha de milho e outros cereais;
- Realizar as avaliações estatísticas através do estudo de circuito equivalente de Randles.

- Porém a necessidade da realização de futuros testes para avaliação de tempo de prateleira, avaliação de reprodutibilidade e miniaturização, serão necessários.

APÊNCIDE A

Artigo publicado no periódico Brazilian Journals of Development.



Plataforma nanoestruturada baseada em nanopartículas de óxido de zinco para imunodeteção de Aflatoxina B1

Nanostructured platform based on zinc oxide nanoparticles for aflatoxin B1 immunodetection

DOI:10.34117/bjdv7n1-453

Recebimento dos originais: 18/12/2020

Aceitação para publicação: 18/01/2021

Beatriz Santiago Guerra

Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica- UFPE, Recife, PE

E-mail: guerrabsantiago@gmail.com

César Augusto Souza de Andrade

Departamento de Bioquímica- Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados- UFPE
Recife, PE

E-mail: csrandade@gmail.com

Maria Danielly Lima de Oliveira

Departamento de Bioquímica- Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados- UFPE
Recife, PE

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

RESUMO

As micotoxinas (MTXs), são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, como fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. A biodeteção de AFB1 possui importância para a saúde pública, devido aos efeitos que ocasiona na saúde humana, além de apresentar ocorrência em boa parte dos gêneros alimentícios. Dessa forma, novos métodos de detecção são de interesse por possibilitarem uma avaliação rápida e precisa dos contaminantes de alimentos com destaque para os imunossensores. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biodispositivo nanoestruturado para biodeteção eletroquímica da AFB1 baseado em camadas automontadas de cisteína (cys) e nanopartículas de óxido de zinco (NPsZnO). As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para o desenvolvimento do imunossensor. Inicialmente, as NPsZnO foram aminadas para propiciar ancoragem na superfície eletródica e posterior imobilização do anticorpo anti-AFB1(anti-AFB1). A superfície do eletrodo foi modificada com Cys e subsequente ativação de grupos carboxi-terminais com N-hidroxissuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC). Em seguida, as NPsZnO aminadas foram adicionadas na monocamada auto-organizada de Cys e, posteriormente, moléculas de anti-AFB1 foram quimicamente ligadas. Variações das correntes de pico anódicas e catódicas e na resistência de transferência de carga foram avaliadas após cada etapa de modificação para obtenção do biossensor. Assim, uma plataforma sensora (Cys/NPsZnO/anti-AFB1) foi obtida com efetividade para detectar AFB1. O sensor proposto mostrou sensibilidade e especificidade para as moléculas de AFB1.

Palavras-chave: Imunossensor, Aflatoxina B1, Micotoxinas e Eletroquímica.



ABSTRACT

Mycotoxins (MTXs), are secondary metabolites produced by some species of fungi, such as *Aspergillus* and *Penicillium*. The biodegradation of AFB1 has importance for public health, due to its effects on human health, in addition to its occurrence in most foodstuffs. Thus, new detection methods are of interest because they allow a fast and accurate evaluation of food contaminants with emphasis on immunosensors. The present work aimed at the development of a nanostructured bio-device for AFB1 electrochemical biodegradation based on self-assembled layers of cysteine (cys) and zinc oxide nanoparticles (NPsZnO). Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques were used for the development of the immunosensor. Initially, the NPsZnO were aminated to provide anchorage on the electrode surface and subsequent immobilization of the anti-AFB1(anti-AFB1) antibody. The electrode surface was modified with Cys and subsequent activation of carboxy-terminal groups with N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDC). Next, the amino NPsZnO were added to the self-organized monolayer of Cys and, later, anti-AFB1 molecules were chemically bound. Variations in the anodic and cathodic peak currents and load transfer resistance were evaluated after each modification step to obtain the biosensor. Thus, a sensing platform (Cys/NPsZnO/anti-AFB1) was effectively obtained to detect AFB1. The proposed sensor showed sensitivity and specificity for AFB1 molecules.

Keywords: Immunosensor, Aflatoxin B1, Mycotoxins and Electrochemistry.

1 INTRODUÇÃO

O termo micotoxina é usado para designar um grupo de compostos altamente tóxicos, produzidos por alguns fungos ou leveduras (Bennett & Klich, 2003), se desenvolvem condições de campo, transporte ou durante o período de armazenamento dos alimentos (Fink-gremmels, 2008), sendo prejudiciais à saúde humana; estas podem causar doenças ou morte quando ingeridas pelo homem. As micotoxinas (MTXs) mais proeminentes são da família das aflatoxinas, e o interesse no estudo das MTXs presentes em alimentos e rações advém do interesse em garantir a saúde humana (Wild & Gong, 2019).

A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais tóxica das aflatoxinas, causando uma variedade de efeitos adversos e, em alguns casos, podem ser letais, apresentam propriedades carcinogênica, teratogênica, mutagênicas e imunossupressoras (Anklam et al., 2002).

O uso de imunoensaio tornou-se uma eficiente ferramenta analítica na análise de MTXs em alimentos, destacando-se os ensaios imunoenzimático (ELISA), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de massa, dentre outras (GONZÁLEZ-OSNAYA et al., 2008), no entanto, a demanda de reagentes com elevado



grau de pureza destinado à análise cromatográfica e o alto custo da instrumentação e manutenção impossibilita uma análise rápida e de baixo custo (Khan et al., 2009).

Em adição, há a necessidade de se aplicar novas ferramentas analíticas para o desenvolvimento de biossensores para MTXs, como a AFB1, e os imunossensores demonstram ser úteis para a detecção, por fazerem uso de interações específicas entre um anticorpo e um antígeno. Estas interações são de natureza não covalente, porém fortes, apresentando como propriedades o favorecimento de um diagnóstico sensível, precoce e confiável, visando a diminuição de gastos com a saúde pública e tratamento medicamentoso, melhorando a qualidade de vida do paciente, possibilitando a geração de um novo produto comercial voltado para o diagnóstico (Hosu et al., 2018).

A associação de óxidos de metais como a nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO) aos biossensores se destaca em biossensores, uma vez que, as NpsZnO apresentam características semicondutoras, uma elevada razão superficial, alta eficiência catalítica e não toxicidade (Khan et al., 2016).

Os métodos eletroanalíticos, tais como voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (potencial, carga e corrente) e podem ser utilizadas para o estudo da interação entre biomoléculas e plataformas nanoestruturadas (Wang et al., 2013).

Portanto, o presente trabalho tem por objeto a exposição de resultados preliminares da construção de um sistema imunossensor para detecção de Aflatoxina B1, baseado na utilização de nanoestruturas, e os dados obtidos através de técnicas eletroanalíticas.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

A ocratoxina A (*Aspergillus ochraceus*), aflatoxina B1, imunoglobulina para AFB1, N-hidroxissuccinimida (NHS), hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), soro albumina bovina (BSA), nanopartículas de óxido de zinco, a imunoglobulina para AFB1 e as micotoxinas foram obtidos da Sigma.

2.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO

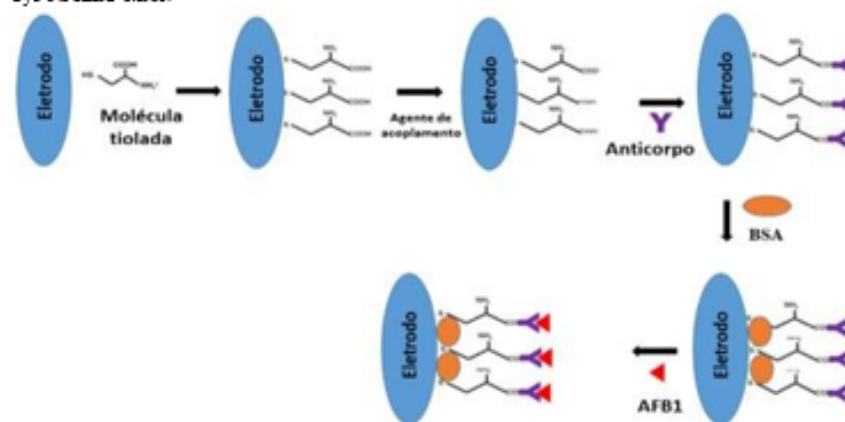
O eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5mm e sonificado por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N₂). Em seguida, o eletrodo de ouro foi imerso em tampão fosfato contendo 10mM de Cys por 30 min a temperatura



ambiente para a automontagem da Cys. Posteriormente, o eletrodo modificado com Cys foi imerso numa solução aquosa de 0.4M de EDC e 0.1M de NHS numa proporção de 1:1 (Safina et al., 2008). Em seguida, o eletrodo foi modificado com NPsZnO e reagido com EDC:NHS para a ligação

do MAb. Após a obtenção do eletrodo modificado com Cys- NPsZnO -MAb (Figura 1), este sistema foi submetido a incubação com as micotoxinas de interesse (Simão et al., 2016).

Figura 1- Esquema das etapas de modificação da superfície do eletrodo de ouro para obtenção do sistema Cys- NPsZnO -MAb.



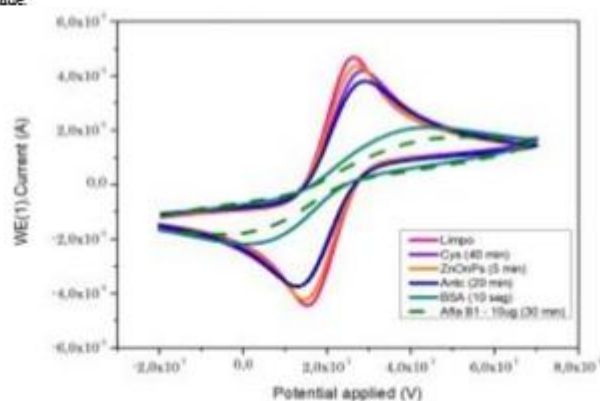
Fonte: Autor

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos na caracterização de EIS estão representados na forma de um diagrama de Nyquist e foram ajustados utilizando o software NOVA. As curvas obtidas demonstram o comportamento eletroquímico do eletrodo limpo e após a adição das camadas de Cys, NPsZnO , Anticorpo e avaliação do analito-alvo. A análise do eletrodo limpo reflete o comportamento característico de um sistema limitado por difusão.



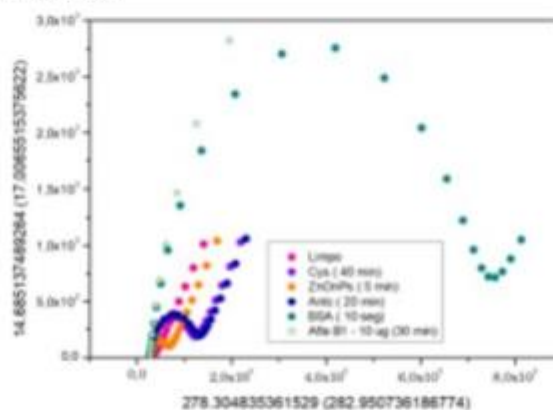
Figura 2- Gráfico de Voltametria Cíclica do processo de montagem do sensor e de avaliação da bioatividade.



Fonte: Autor

Após a adição de Cys verifica-se uma redução na magnitude das correntes de pico anódica e catódica. A característica condutora das NPsZnO foi revelada pelo aumento da condutividade da superfície eletroquímica. Após a imobilização do anticorpo foi evidenciada a manutenção da bioatividade do sistema refletida pela queda da resposta eletroquímica devido a formação do complexo anticorpo-Aflatoxina.

Figura 3 - Gráfico de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica do processo de montagem do sensor e de avaliação da bioatividade.





Na figura 3 podemos observar que análise impedimétrica corrobora com os resultados obtidos via VC. A EIE é considerada padrão ouro para sistemas biossensores. É possível observar um aumento do diâmetro do semicírculo quando o sistema foi exposto à solução de Afla B1. Este processo reflete o bioreconhecimento representado pelo aumento da resistência de transferência de carga propiciado pelo bloqueio da passagem de elétrons na superfície do eletrodo de ouro.

4 CONCLUSÃO

O sensor desenvolvido foi capaz de interagir com aflatoxina B1 e demonstra ser bastante útil na avaliação de alimentos contaminados e consequente prevenção de micotoxicoses. A associação com as NPsZnO melhora o desempenho analítico na superfície do transdutor, pois permite a um melhor trânsito de elétrons nas SAMs e favorecem a adsorção das biomoléculas na superfície eletroquímica. Portanto, o sistema desenvolvido demonstrou que o anticorpo imobilizado manteve sua bioatividade, e é uma nova alternativa para detecção de AFB1.



REFERÊNCIAS

1. ANKLAM, Elke; STROKA, Joerg; BOENKE, Achim. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, v. 13, n. 3, p. 173-183, 2002.
2. BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16, 2003.
3. FINK-GREMMEIS, Johanna. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008.
4. GONZÁLEZ-OSNAYA, L. et al. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. *Food Chemistry*, v. 108, n. 1, p. 272-276, 2008.
5. HOSU, Oana et al. Electrochemical immunosensors for disease detection and diagnosis. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 33, p. 4119-4137, 2018.
6. KHAN, Raju; DHAYAL, Marshal. Chitosan/polyaniline hybrid conducting biopolymer base impedimetric immunosensor to detect Ochatoxin-A. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 6, p. 1700-1705, 2009.
7. KHAN, Shams Tabrez et al. Zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress, inhibit growth, and attenuate biofilm formation activity of *Streptococcus mitis*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 295-303, 2016.
8. SIMÃO, Estéfani P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin B1 in Rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 6, p. 1040-1047, 2016.
9. WANG, Jianling et al. Advances in nano-scaled biosensors for biomedical applications. *Analyst*, v. 138, n. 16, p. 4427-4435, 2013.
10. WILD, Christopher P.; GONG, Yun Yun. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.